

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Efecto inhibitorio de extractos orgánicos de hongos endófitos
sobre el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis***

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en
Ciencias Biológicas**

ANDREA CAROLINA CASTRO CEVALLOS

QUITO, 2016

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Andrea Carolina Castro Cevallos ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

M.Sc. Alexandra Narvárez Trujillo

Directora de la Disertación

Quito, 2 de junio de 2016

*“Vive como si fueras a morir mañana,
Aprende como si fueras a vivir siempre”*

-Mahatma Gandhi

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque creo firmemente que atrás de cada puerta que la ciencia logra abrir se encuentra Él.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por el financiamiento para realizar este proyecto.

A Alexandra Narváez, Directora de mi proyecto de disertación, por acogerme en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal desde los inicios de mi carrera, por la confianza depositada al permitir involucrarme en varios proyectos del laboratorio y así aprender más del fascinante mundo de la investigación, por su guía, consejos, correcciones, paciencia, durante estos últimos años.

A Iliana Alcocer y Oscar Pérez, por abrirme las puertas de sus laboratorios y guiarme con sus conocimientos técnicos para el avance de este proyecto.

A Andrés Merino y Miryan Rivera por permitirme usar sus instalaciones y material, lo cual fue indispensable para el desarrollo de este proyecto.

A Ailin Blasco, por facilitar el patógeno sobre el cual se realizó este ensayo, así como el conocimiento técnico sobre el cultivo del mismo.

A Fernanda Yauri y Belén Proaño por su oportuna ayuda, consejo y guía durante estos dos años y medio de duración del proyecto.

A Carolina Portero por ser mi maestra, consejera y amiga en estos últimos cuatro años, por sacar tiempo y paciencia para pulir cada día la investigadora que hay en mí. Caro sin tu comprensión, guía, consejos y desvelos este proyecto no se hubiera materializado.

A Stephy Villota, Eliana Veloz y Fernando Marín, por todos sus comentarios, consejos y guía para pulir este trabajo. Chicos muchas gracias por esa sincera amistad y alentarme a cada paso. A Berenice Benavides, Sofía López, David Cajas y Katherine Rosales, por

su ayuda oportuna y poner una pizca de alegría en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

A Jessica Lacson y Gladys Cevallos, mis tías y amigas, por apoyar emocional y económicamente mi carrera, siempre desear lo mejor para mi vida, y ser un apoyo inigualable. Sin ustedes no hubiera sido posible el sueño de la investigación, gracias las amo.

A Fernando Castro, Beatriz Cevallos, Israel Castro y Nico Matías, mi amada familia, por ser mi pilar, aliento y esperanza a lo largo del camino, por nunca rendirse y enseñarme que la vida es una carrera de perseverancia y lucha.

A Karen y Cindy, mis hermanas de vida, gracias, por ser más que amigas, unas cómplices y aliadas, enseñarme el significado de la verdadera amistad en los buenos y malos momentos. A tu memoria Karen.

A Sofía Amores, Paola, Michelle y Josué, mis amigos y compañeros en el emocionante mundo universitario, gracias por compartir muchos gratos momentos y experiencias inolvidables.

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. MANUSCRITO PARA PUBLICACIÓN.....	3
INTRODUCCIÓN	6
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Cultivo de hongos endófitos y obtención de extractos orgánicos	9
Cultivo de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	9
Estandarización del ensayo de microdilución colorimétrica.....	9
Evaluación de la actividad antifúngica mediante microdilución colorimétrica....	12
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida	12
Determinación de bioactividad antifúngica en agar	13
Evaluación de la citotoxicidad de extractos orgánicos de hongos endófitos con células germinales de anfibios.....	14
Compuestos Orgánicos Volátiles de hongos endófitos	14
RESULTADOS	16
Estandarización del ensayo de microdilución colorimétrica.....	16
Evaluación de la actividad antifúngica mediante microdilución colorimétrica....	17
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida	17

Determinación de bioactividad antifúngica en agar	18
Evaluación de la citotoxicidad de extractos orgánicos de hongos endófitos en células germinales de anfibios	18
Compuestos Orgánicos Volátiles de hongos endófitos	18
DISCUSIÓN	19
Actividad fungicida de extractos orgánicos de hongos endófitos contra <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> mediante microdilución colorimétrica	19
Bioensayos de actividad antifúngica en agar	23
Compuestos Orgánicos Volátiles de hongos endófitos	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
4. FIGURAS	34
5. TABLAS	40
6. GUÍA DE AUTOR	49

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
<i>Bd</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CMF	Concentración Mínima Fungicida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
EtOAc	Etil Acetato
g	Gramos
h	Horas
l	Litros
LRC	Longitud Rostro-Cloaca
MeOH	Metanol
min	Minutos
ml	Mililitros
mmol	Milimolar
nm	Nanometros
PDA	Medio nutritivo agar papa dextrosa
PDB	Medio líquido dextrosa papa
SB	Solución Buffer isotónica para anfibios
TGhL	Medio Triptona Gelatina hidrolizada de Lactosa

LISTA DE ABREVIATURAS (CONTINUACIÓN).

Abreviatura	Significado
VOCs	Compuestos Volátiles Orgánicos
°C	Grados Centígrados
µl	Microlitros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variación del porcentaje de reducción de alamarBlue® a lo largo del ensayo (oxidado/azul, reducido/rosado).....	35
Figura 2. Desarrollo de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en medio TGhL líquido con 8ul de metanol.....	36
Figura 3. Relación porcentaje de reducción de alamarBlue® y porcentaje de zoosporas de <i>Bd</i> vivas.....	37
Figura 4. Evaluación de la actividad antifúngica mediante microdilución colorimétrica.....	38
Figura 5. Efecto de los VOCs producidos por hongos endófitos sobre <i>Bd</i>	39

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de extractos orgánicos obtenidos de hongos endófitos de la CEQCA.....	41
Tabla 2. Estandarización de la metodología para evaluar la actividad antifúngica de extractos de hongos endófitos de la CEQCA mediante microdilución colorimétrica.....	45
Tabla 3. Endófitos de la CEQCA seleccionados para las pruebas de inhibición de <i>Bd.</i>	46
Tabla 4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF).....	47
Tabla 5. Comparación de bioactividad antifúngica: microdilución colorimétrica, difusión con disco y difusión en agar en <i>Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)</i>	48

1. RESUMEN

Las biomoléculas orgánicas presentes en los extractos de hongos endófitos, por sus capacidades antimicóticas, entre otras, podrían ser una alternativa innovadora para combatir al patógeno de anfibios *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Se estandarizó una metodología usando alamarBlue® con *Bd* en bioensayos de microdilución colorimétrica para obtener resultados de forma rápida y eficiente. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada usando 6 extractos orgánicos. Se utilizó las CMIs de los extractos orgánicos para evaluar su posible citotoxicidad usando células espermáticas de anfibios. Finalmente, se probó si los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de hongos endófitos inhiben a *Bd*. El rango de los CMIs encontrados fueron de 25 a 200 µg/ml y su concentración mínima fungicida (CMF) de <1,6 a 100 µg/ml. En los bioensayos de difusión se utilizaron los extractos para las variantes de difusión en disco y difusión en agar. Un extracto mostró inhibición contra *Bd* usando su CMI. El menor efecto de citotoxicidad sobre células germinales de anfibios fue del extracto CEQCA-O0751d1. Todos los endófitos en los ensayos de VOCs tuvieron un efecto micofumigador al inhibir el crecimiento de *Bd*. Los endófitos pueden producir metabolitos secundarios útiles para la erradicación de *Bd*, y podrían ser una alternativa al uso de fungicidas sintéticos en centros de rescate y de reproducción de anfibios. Los efectos *in vivo* de los compuestos orgánicos volátiles producidos por los hongos endófitos aún deben ser evaluados.

Palabras clave: *Batrachochytrium dendrobatidis*, hongos endófitos, extractos orgánicos, anfibios.

2. ABSTRACT

Endophyte extracts may contain organic biomolecules with antifungal characteristics; these organic extracts could become an innovative alternative against the amphibian pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Bioassays using a colorimetric microdilution method using alamarBlue®, in order to detect *Bd* viability, was standardized to obtain quick and reliable results. The minimum inhibitory concentration (MIC) for 6 endophyte organic extracts against *Bd* was determined. Additionally, selected extracts at their MIC concentrations were evaluated for possible cytotoxicity using amphibian sperm cells. Finally, the effects of endophyte volatile organic compounds (VOCs) were tested against *Bd*. MIC concentration ranged from 25 to 200 µg/ml and their minimal fungicidal concentration (MFC) was between <1,6-100 µg/ml. Agar diffusion bioassays using these same extracts were done by the diffusion disc method and by direct diffusion in agar; in these bioassays, only the extract showing the lowest MIC concentration inhibited *Bd*. The lowest cytotoxicity percentage over amphibian sperm was found with CEQCA-O0751d1. All of the endophytes in the VOC assay exhibited a mycofumigation effect over *Bd* growth. Endophytes can produce useful secondary metabolites to eradicate *Bd* and may be used as an alternative to synthetic fungicides in amphibian rescue and reproduction centers. *In vivo* effects of these endophytes metabolites and VOCs must still be evaluated.

Keywords: *Batrachochytrium dendrobatidis*, endophyte, organic extracts, amphibians.

3. MANUSCRITO PARA PUBLICACIÓN

REVISTA

Latin American Journal of Aquatic Research (Artículo de Investigación)

TÍTULO

Latin American Journal of Aquatic Research

AUTORES

Carolina Castro¹, Carolina Portero¹, & Alexandra Narváez-Trujillo¹

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Pontificia Universidad Católica del Ecuador,
Av. 12 de Octubre y Roca. Quito, Ecuador

Corresponding autor: Alexandra Narváez-Trujillo, anarvaez@puce.edu.ec

Tel. +593 2 2991700 ext. 1810

Fax. +593 2 2991687

Efecto inhibitorio de extractos orgánicos de hongos endófitos sobre el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*

Carolina Castro¹, Carolina Portero¹, & Alexandra Narváez-Trujillo¹

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Av. 12 de Octubre y Roca. Quito, Ecuador

Corresponding autor: Alexandra Narváez-Trujillo (anarvaez@puce.edu.ec)

RESUMEN. Las biomoléculas orgánicas presentes en los extractos de hongos endófitos, por sus capacidades antimicóticas, entre otras, podrían ser una alternativa innovadora para combatir al patógeno de anfibios *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Se estandarizó una metodología usando alamarBlue® con *Bd* en bioensayos de microdilución colorimétrica para obtener resultados de forma rápida y eficiente. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada usando 6 extractos orgánicos. Se utilizó las CMIs de los extractos orgánicos para evaluar su posible citotoxicidad usando células espermáticas de anfibios. Finalmente, se probó si los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de hongos endófitos inhiben a *Bd*. El rango de los CMIs encontrados fueron de 25 a 200 µg/ml y su concentración mínima fungicida (CMF) de <1,6 a 100 µg/ml. En los bioensayos de difusión se utilizaron los extractos para las variantes de difusión en disco y difusión en agar. Un extracto mostró inhibición contra *Bd* usando su CMI. El menor efecto de citotoxicidad sobre células germinales de anfibios fue del extracto CEQCA-O0751d1. Todos los endófitos en los ensayos de VOCs tuvieron un efecto micofumigador al inhibir el crecimiento de *Bd*. Los endófitos pueden producir metabolitos secundarios útiles para la erradicación de *Bd*, y podrían ser una alternativa al uso de fungicidas sintéticos en centros de rescate y de reproducción de anfibios. Los efectos *in vivo* de los compuestos orgánicos volátiles producidos por los hongos endófitos aún deben ser evaluados.

Palabras clave: *Batrachochytrium dendrobatidis*, hongos endófitos, extractos orgánicos, anfibios.

**Inhibitory effect of organic extracts of endophytic fungi on the fungal pathogen
*Batrachochytrium dendrobatidis***

ABSTRACT. Endophyte extracts may contain organic biomolecules with antifungal characteristics; these organic extracts could become an innovative alternative against the amphibian pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Bioassays using a colorimetric microdilution method using alamarBlue®, in order to detect *Bd* viability, was standardized to obtain quick and reliable results. The minimum inhibitory concentration (MIC) for 6 endophyte organic extracts against *Bd* was determined. Additionally, selected extracts at their MIC concentrations were evaluated for possible cytotoxicity using amphibian sperm cells. Finally, the effects of endophyte volatile organic compounds (VOCs) were tested against *Bd*. MIC concentration ranged from 25 to 200 µg/ml and their minimal fungicidal concentration (MFC) was between <1,6-100 µg/ml. Agar diffusion bioassays using these same extracts were done by the diffusion disc method and by direct diffusion in agar; in these bioassays, only the extract showing the lowest MIC concentration inhibited *Bd*. The lowest cytotoxicity percentage over amphibian sperm was found with CEQCA-O0751d1. All of the endophytes in the VOC assay exhibited a mycofumigation effect over *Bd* growth. Endophytes can produce useful secondary metabolites to eradicate *Bd* and may be used as an alternative to synthetic fungicides in amphibian rescue and reproduction centers. *In vivo* effects of these endophytes metabolites and VOCs must still be evaluated.

Keywords: *Batrachochytrium dendrobatidis*, fungal endophytes, organic extracts, amphibians.

INTRODUCCIÓN

El hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) es causante de la enfermedad denominada quitridiomycosis (Longcore et al., 1999), la cual ha contribuido a la disminución dramática de diferentes especies de anuros en todo el mundo (Blooi et al., 2013). *Bd* puede crecer en un amplio rango de temperatura, de 4 °C a 25 °C (Longcore et al., 1999; Bales et al., 2015), lo cual ha propiciado la colonización de extensas áreas geográficas. Su transmisión entre continentes podría haber sido facilitado por la venta mundial de anfibios como mascotas (Johnson & Speare, 2003) y por hospederos secundarios usando las células queratinizadas de aves y cangrejos de río (McMahon et al., 2013) como reserva alimenticia hasta encontrar un anfibio al cual parasitar (Johnson & Speare, 2005).

A nivel mundial, grupos específicos son más susceptibles a la enfermedad, por ejemplo las familias: Ranidae (Briggs et al., 2010; Forzán et al., 2010), Dendrobatidae (Martel et al., 2011), Alytidae (Van Rooij et al., 2012), Hylidae (Rollins-Smith et al., 2002; Hamilton et al., 2012), entre otros (Olson et al., 2013). En el Ecuador, la última información colectada sugiere que al menos 26 especies de anfibios han enfermado hasta casi su extinción a causa de la quitridiomycosis (Ron & Merino, 2000; Ron et al., 2011). Las familias más afectadas por la quitridiomycosis en el Ecuador son Bufonidae, Centrolenidae, Craugastoridae, Dendrobatidae, Hemiphractidae, Hylidae, Leptodactylidae, Pletodontidae y Telmatobiidae (A. Merino, coordinador del Proyecto Balsa de los Sapos, com. pers.).

Bd se aloja en las células epidérmicas de los anfibios evitando el intercambio iónico, gaseoso y de agua, llegando a causar hiperqueratosis en las células y desencadenando la muerte del anfibio por asfixia (Piotrowski et al. 2004, Berger et al. 2005, Brucker et al. 2008, Ramsey et al. 2010, Muijsers et al. 2012). Cuando las células epidérmicas mueren, las nuevas zoosporas flageladas salen a través del talo del zoosporangio maduro y se liberan en el medio acuoso para así colonizar a otro anfibio (Longcore et al., 1999; Rosenblum et al., 2008). Aún es incierto cuál es el mecanismo exacto que usa *Bd* al momento de colonizar las células epiteliales; probablemente existe un gran complejo de enzimas digestivas capaces de desintegrar el citoplasma celular como fue descrito por Berger et al. (2005), siendo éste un mecanismo similar al usado por el patógeno humano, *Candida albicans* (Martel et al., 2011).

No existe un tratamiento totalmente eficaz contra *Bd* que pueda ser usado en cualquier estadio del ciclo de vida del anfibio (Berger et al., 2016). Una estrategia que podría salvar a los anfibios de vida libre infectados con *Bd*, es coleccionar especímenes afectados, tratarlos y mantenerlos en cautiverio hasta reproducirlos para luego repoblar zonas específicas (Baitchman & Pessier, 2013). Cuando los animales se encuentran en cautiverio se los puede tratar con medios físicos como cambios de temperatura (Rohr et al., 2008) o el uso de quimioterapéuticos sintéticos como cloranfenicol (Venisse et al., 2008), terbinafina (Harris et al., 2006), florfenicol (Muijsers et al., 2012) y el más usado, itraconazol (Hardy et al., 2015).

Los estudios con antimicóticos sintéticos presentan resultados prometedores combatiendo a *Bd* en pruebas *in vitro*, sin embargo, no sucede de la misma forma con las pruebas *in vivo* (Ramsey et al., 2010), ya que producen un efecto adverso en la fisiología del anfibio (Brown, 2013). Por lo tanto, las biomoléculas, provenientes de diversas fuentes, son una opción innovadora para combatir el *Bd*; un ejemplo de esto son las recientes investigaciones para la erradicación de quitridiomycosis usando péptidos de la flora bacteriana de anfibios resistentes a *Bd* como *Plethodon cinereus*, *Hemidactylium scutatum* (Harris et al., 2006), *Plethodon cinereus* (Brucker et al., 2008), *Lithobates pipiens* (Tenessen et al., 2010), *Xenopus laevis* (Ramsey et al., 2010), *Atelopus* sp. (Flechas et al., 2012), *Anaxyrus boreas* (Park et al., 2014).

Una fuente poco explorada de metabolitos secundarios con capacidades antibióticas, antiparasitarias, anticancerígenas, antioxidantes, biopesticidas, entre otras, son los hongos endófitos (Huang et al., 2001). Los hongos endófitos son microorganismos que viven dentro de los tejidos de las plantas y poseen mayormente una relación simbiótica con sus hospederos (Guo et al., 2008). Estos microorganismos producen gran cantidad de metabolitos secundarios y son sintetizadores naturales de compuestos bioactivos antimicóticos, los cuales pueden ser usados para adaptarse y para combatir o protegerse de factores bióticos o abióticos (Buatong et al., 2011; Harun et al., 2011). Por estas razones los hongos endófitos podrían ser una fuente de biomoléculas útiles para la erradicación de *Bd*.

La Colección de Endófitos Quito-Católica (CEQCA) tiene aproximadamente 5000 hongos endófitos aislados de diferentes plantas representativas de diversos ecosistemas

ecuatorianos. Algunos de los hongos endófitos de la CEQCA presentan actividad antibiótica contra patógenos de humanos y de plantas (Forcina et al., 2015; Patridge et al., 2015; Rundell et al., 2015).

El objetivo de este estudio es identificar hongos endófitos que tengan un efecto antifúngico contra el patógeno de anfibios *Bd* y que además no sean tóxicos para el anfibio; con la finalidad de desarrollar bioproductos aplicables contra *Bd* en centros de reproducción o rescate de anfibios *ex situ*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de hongos endófitos y obtención de extractos orgánicos

Se seleccionaron 22 hongos endófitos de la Colección de Hongos Endófitos Quito Católica - CEQCA (Tabla 1). Cada endófito se cultivó en medio nutritivo agar papa dextrosa (PDA) (Harun et al., 2011) hasta lograr un cultivo axénico. Para la extracción orgánica se cultivaron los hongos endófitos en caldo líquido dextrosa papa (PDB) a temperatura ambiente hasta obtener el 80% de micelio (Buatong et al., 2011) y se filtró el endófito en crecimiento en dos fases: fase líquida y fase micelial. En la primera fase se usaron los solventes diclorometano (CH_2Cl_2) y etil acetato (EtOAc), en relación 1:2; en la segunda fase se homogenizó el micelio usando metanol (MeOH) como solvente (Rodrigues et al., 2000; Rhoden, 2012). Una vez realizada la extracción, los extractos orgánicos se concentraron mediante rotoevaporación y fueron disueltos en metanol hasta obtener una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ (Valgas et al., 2007).

Cultivo de *Batrachochytrium dendrobatidis*

La cepa JEL 423 (Universidad de Maine, Orono, EE.UU) de *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) fue aislada de la rana lémur, *Phyllomedusa lemur* (Hylidae) en los bosques de tierras bajas en Panamá. Esta cepa fue donada a la PUCE y criopreservada a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Retirado de criopreservación, el aislado se mantuvo en medio Agar Triptona-Gelatina Hidrolizado de Lactosa estéril TGhL (16 g triptona, 2 g gelatina hidrolizada, 4 g lactosa, 1 l agua destilada). Después 3 a 4 días de cultivo se procedió a inundar la placa con 2 ml de medio líquido TGhL para colectar zoosporas y obtener un inóculo inicial de 1×10^6 zoosporas/ml (Cheatsazan et al., 2013), contadas en microscopio óptico 20x con una cámara de Neubauer Micro Counter®.

Estandarización del ensayo de microdilución colorimétrica

El indicador de óxido-reducción alamarBlue® se usa con éxito en ensayos de viabilidad celular, el cual provee un resultado rápido, eficiente y sensible en bioensayos de proliferación, citotoxicidad celular y susceptibilidad antimicrobiana en

bacterias, hongos y líneas celulares (Franzblau et al., 1998; O'Brian et al., 2000; Silva et al., 2013). Al ser un indicador colorimétrico, alamarBlue® se torna de color azul en estado oxidado total, es decir, cuando existe 0% de actividad celular, y de color rosa en su estado reducido, cuando hay un 100% de actividad celular (AbD Serotec®, 2007).

Para evaluar si los extractos de los hongos endófitos presentaron bioactividad antifúngica contra *Bd*, se utilizó el reactivo alamarBlue® en un ensayo de microdilución colorimétrica basado en la normativa del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio “*Clinical Standard and Laboratory Institute*” CLSI M38-A (CLSI 2002b), con modificaciones basadas en Pettit et al., 2005; AbD Serotec®, 2007 y Bell et al., 2013, mencionadas a continuación.

No hay reportes en la literatura acerca del uso de este reactivo en pruebas de microdilución colorimétrica con *Bd* por lo que fue necesario estandarizar varios parámetros para su uso en este estudio. Todos los ensayos utilizando alamarBlue® se realizaron en placas de poliestireno de 96 pocillos con base plana (Pettit et al., 2005; AbD Serotec®, 2007; Bell et al., 2013) en un volumen total de 110 µl; cuando *Bd* estaba presente en el ensayo se utilizó 50 µl de una concentración de 1×10^6 zoosporas/ml. El medio de cultivo usado en los ensayos fue TGhL y se variaron los componentes de acuerdo al parámetro a estandarizar según lo descrito en la Tabla 2. En todos los ensayos se utilizaron cuatro controles: dos controles para monitorear el crecimiento del hongo (control positivo y negativo) y dos que miden el comportamiento del reactivo alamarBlue® (control oxidado, control reducido) (AbD Serotec® 2007). Todos los ensayos se realizaron en triplicado y las mediciones se tomaron con el lector de microplacas Microplate Manager 6, con filtros de absorbancia 570 nm y 600 nm (AbD Serotec®, 2007). El porcentaje de reducción del alamarBlue® en cada uno de los ensayos de microdilución colorimétrica se obtuvo siguiendo los cálculos sugeridos por AbD Serotec® (2007).

Los parámetros estandarizados fueron:

- 1) Concentración de metanol que no afecte la supervivencia de *Bd*. Debido a que los extractos orgánicos se disuelven en metanol, se determinó primeramente la concentración del solvente que no tiene efecto sobre *Bd*, de tal manera que los

resultados observados sean los producidos por el extracto orgánico de cada hongo endófito. Para esto se usaron siete diferentes volúmenes de metanol y su concentración porcentual final, según el detalle en la Tabla 2, en cada pocillo. (20 μ l = 0,91%; 18 μ l = 0,68%; 15 μ l = 0,59%, 10 μ l = 0,45%; 8 μ l = 0,36%; 5 μ l = 0,23%; 3 μ l = 0,14%) en cada pocillo respectivamente. El efecto de cada concentración de metanol se expresa como la diferencia en el porcentaje de reducción de alamarBlue® (cuando el control positivo alcanzó el 100% de reducción) y se analizaron mediante ANOVA-DCA y pruebas Post Hoc (Tukey). En este ensayo el reactivo alamarBlue® se aplicó al inicio del ensayo.

2) Determinación temporal de la fase de crecimiento exponencial de *Bd* en medio TGHl y metanol. El inicio de la fase exponencial marca el momento de añadir el reactivo alamarBlue® y el final de esta fase de crecimiento es el punto en el cual se hace la comparación de las lecturas de los tratamientos y determina el final del ensayo.

Se cultivó a *Bd* según las condiciones de ensayo descritas en la Tabla 2 y se observó bajo microscopio óptico de contraste de fases a 90x diariamente por siete días consecutivos hasta determinar el momento de la liberación de zoosporas (fase de crecimiento exponencial), tiempo en el cual se considera el punto óptimo para la colocación del reactivo alamarBlue®.

Además, se evaluó la variación en la reducción del reactivo alamarBlue® durante el crecimiento de *Bd* hasta obtener un crecimiento fúngico que no sobrepase la fase exponencial. El fin de la fase exponencial se alcanza cuando se ha obtenido la reducción del 100% del control positivo (Fig. 1) (AbD Serotec®, 2007). Este tiempo determina el final del ensayo y es el punto en el cual se hace la comparación de las lecturas de los tratamientos. El tiempo de exposición del alamarBlue® con el organismo o células a ser analizadas es un factor importante debido a que cuando pasa la fase exponencial tiende a degradarse (reduciendo su curva de reducción) y puede producir resultados erróneos.

Adicionalmente, se estandarizó la relación entre viabilidad de *Bd* (contaje de zoosporas vivas de *Bd*) y el porcentaje de óxido-reducción del reactivo alamarBlue® adaptando la metodología descrita por McMahon & Rohr (2014). Para esto se trabajó

con diferentes porcentajes de zoosporas de *Bd* con una concentración de 1×10^6 zoosporas/ml (100% vivas, 75% vivas con 25% muertas, 50% vivas con 50% muertas, 25% vivas con 75% muertas y 100% muertas) (Tabla 2). Para obtener las zoosporas muertas para este tratamiento se incubó a *Bd* a 60° C por 60 min (Bell et al., 2013; McMahon & Rohr, 2014). Los ensayos se realizaron por triplicado en placas de poliestireno de 96 pocillos de base plana.

Evaluación de la actividad antifúngica mediante microdilución colorimétrica

Una vez estandarizado el protocolo de microdilución colorimétrica, se probó el efecto de cada uno de los extractos orgánicos de hongos endófitos contra *Bd* (Tabla 2). Los ensayos se realizaron en microplacas de poliestireno base plana de 96 pocillos en un volumen total de 110 μ l: 42 μ l corresponden a medio TGH, 50 μ l de *Bd* a una concentración de 1×10^6 zoosporas/ml, 8 μ l del extracto a probar (200 μ g/ml) y 10 μ l de alamarBlue®, que se colocó después de incubada la placa durante 96 horas a 20 °C (Fig.1). Las lecturas se realizaron cada 2 horas hasta obtener un porcentaje de reducción igual o cercano al 100% en el control positivo (24-48 h) (AbD Serotec®, 2007). Se aplicó el análisis estadístico ANOVA-DCA con transformación logarítmica de datos y pruebas Post Hoc (Sheffe) para agrupar a los extractos orgánicos de acuerdo a los porcentajes de reducción de alamarBlue® al final del ensayo (Fig.1). Se consideraron extractos orgánicos de hongos endófitos con efecto fungistático (inhibición del crecimiento del hongo) cuando el porcentaje de reducción de alamarBlue® fue menor al del control positivo (Tabla 2) y fungicida (muerte del hongo) cuando el porcentaje de reducción de alamarBlue® fue igual al del control alamarBlue® oxidado (Fig. 1) (Venisse et al., 2008; Bell et al., 2013; Park et al., 2014).

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida

El valor de concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la menor concentración del extracto orgánico que no produjo reducción en el alamarBlue®. La determinación de la CMI se realizó únicamente para los extractos orgánicos que

presentaron actividad fungicida contra *Bd* y que son solubles en solución buffer isotónico para anfibios –SB- (104,4 mmol NaCl, 2,0 mmol KCl, 6,1 mmol Na₂HPO₄, 1,0 mmol KH₂PO₄, pH 7,4). Se usó el método de microdilución colorimétrica empleando diluciones seriadas (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6) µg/ml de los extractos orgánicos de hongos endófitos (Cos et al., 2006; Bell et al., 2013); para lo que se usó tanto metanol como SB. Además, se estableció la concentración mínima fungicida (CMF), es decir la mínima concentración del extracto que produce la muerte del hongo, cultivando el contenido de los pocillos en medio TGhL agar después de 21 días de incubación (Rollins-Smith et al., 2011). El CMI para cada extracto se cuantificó dos veces y se reporta la media de los dos valores.

Determinación de bioactividad antifúngica en agar

Con los resultados positivos de inhibición a *Bd* en microdilución colorimétrica, nuestro interés fue evaluar si ensayos convencionales de susceptibilidad antifúngica en agar podían ser efectivos y estar correlacionados con el nivel de bioactividad observado en los ensayos de microdilución. Para esto, se utilizaron los extractos orgánicos que se catalogaron como fungicidas por microdilución colorimétrica en dos tipos de bioensayos: 1) Difusión directa en agar (Bascom-Slack et al., 2012; Forcina et al., 2015), en el cual 10 µl de cada extracto orgánico disuelto en metanol se colocó directamente sobre el agar, en dos aplicaciones de 5 µl. Una vez que las aplicaciones se secaron, se dispersó uniformemente el inóculo de *Bd* (1 ml de *Bd* 1x10⁶ zoosporas/ml) sobre el área total de la placa; 2) Difusión con disco (CLSI, 2012), para lo cual se dispersó uniformemente el inóculo de *Bd* (1 ml de *Bd* 1x10⁶ zoosporas/ml) sobre el área total de la placa. Una vez seco, se colocó un disco de antibiograma previamente embebido con 10 µl de cada extracto orgánico disuelto en metanol. En ambos métodos cada placa Petri se dividió en cuatro cuadrantes: en tres cuadrantes se colocaron extractos orgánicos y en el restante el control (solo metanol); la concentración del extracto orgánico utilizada fue el valor de la CMI. Las placas se incubaron a 20 °C por un periodo de 21 días y el halo de inhibición se midió a los días 2, 7 y 21 días (Rollins-Smith et al., 2011); los ensayos se realizaron por triplicado. Se consideró un efecto fungicida si el extracto orgánico produjo un halo sin crecimiento de colonias dentro

de la zona inhibitoria y fungistático si hay un crecimiento fúngico dentro del halo de inhibición. El diámetro del halo se utilizó para comparar el grado de inhibición.

Evaluación de la citotoxicidad de extractos orgánicos de hongos endófitos con células germinales de anfibios

Para conocer el nivel de citotoxicidad de los diferentes extractos orgánicos de hongos endófitos con efecto fungicida sobre *Bd* en pruebas *in vitro*, se usaron células germinales de anfibios. Estas células se obtuvieron de los testículos de cinco machos adultos del género *Smilisca* con similar longitud rostro-cloaca (LRC), donados por la iniciativa de conservación de anfibios *ex situ*, “Balsa de los Sapos”, impulsada por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. El sobrenadante con las células espermáticas vivas, obtenido de la previa maceración de los testículos en solución SB, se colocó en tubos eppendorf junto con los extractos orgánicos de hongos endófitos en solución SB con su correspondiente CMI. Para observar los espermatozoides vivos y muertos, sobre los tratamientos se colocó eosina 0,12% con incubación de 10 min; el control positivo fue esperma viva y el control negativo esperma previamente tratada con shock térmico. Se contabilizó el número de espermatozoides vivos (sin color) y muertos (color rosado) en cada tubo a las 0 h y a las 48 h bajo un microscopio óptico de contraste de fases a 40x sobre una cámara de Neubauer (Beesley et al., 1998). Todos los datos tomados fueron expresados en porcentaje de mortalidad. Para comparar los efectos de los extractos orgánicos de hongos endófitos contra los controles positivos a las 0 h y 48 h se realizó un diseño ANOVA-DBCA con submuestras y pruebas Post Hoc.

Compuestos Orgánicos Volátiles de hongos endófitos

Se evaluó el efecto micofumigador de los Compuestos Orgánicos Volátiles VOCs producidos por cuatro endófitos seleccionados de la CEQCA contra *Bd* (Tabla 3). El inóculo de *Bd* (1×10^6 zoosporas/ml) se cultivó en TGhL agar en una sección de una caja bipetri y en el lado opuesto se colocó un plug de 0,3 x 0,3 mm de PDA con hifas del hongo productor de VOCs previamente incubado 4 días (Benerjee et al., 2014; Meshram et al., 2013). El patógeno y el *Muscador* sp. en las cajas bipetri se

incubaron a temperatura ambiente durante 21 días y se registró el crecimiento de *Bd*, en intervalos de 7 días.

RESULTADOS

Estandarización del ensayo de microdilución colorimétrica

1) Volumen de metanol que no afecte la supervivencia de *Bd*.

El análisis de variancia (ANOVA) indica que hay una diferencia significativa en la supervivencia de *Bd* al incubarse con diferentes concentraciones de metanol ($p=0,52$). Se determinó que el uso de metanol entre 0,14% y 0,36% produce un porcentaje de reducción de alamarBlue® igual al control positivo que no posee metanol ($p=0,09$). Concentraciones $>0,36\%$ a $<0,91\%$ tienen un efecto fungistático o fungicida con $\geq 0,91\%$ de metanol. Para los posteriores parámetros de estandarización de susceptibilidad antifúngica contra *Bd* se utilizó 0,36% (8 μ l) de metanol pues en esta concentración se obtiene una disolución de extracto orgánico adecuada sin afectar el crecimiento de *Bd*.

2) Determinación temporal de la fase de crecimiento exponencial de *Bd*.

A las 24 horas se observaron zoosporas móviles (Fig. 2A), las mismas que maduraron (Fig. 2B) y crecieron en tamaño formando el denominado “germling” a las 48 horas. El zoosporangio se formó y maduró en el día 3 (Fig. 2 C, D). Las zoosporas se liberaron a las 96 horas (Fig. 2E), tiempo en el que el número de zoosporas duplicó el número inicial y por lo tanto se considera a este momento como el inicio de la fase exponencial del crecimiento de *Bd*. De esta manera se determinó que el reactivo alamarBlue® debe colocarse a las 96 horas de crecimiento de *Bd* en los ensayos para evaluar la bioactividad antifúngica de los extractos por microdilución colorimétrica. El tiempo en el cual el control positivo con *Bd* alcanza el final de su fase exponencial de crecimiento (100% reducción de alamarBlue®) varía de 24 hasta 48 horas de incubación después de colocado el reactivo alamarBlue®. Pasado este tiempo, las curvas de reducción de alamarBlue® son irregulares (Fig. 1) debido a que el reactivo alamarBlue® pierde su eficacia; este tiempo debe ser determinado en cada ensayo.

A las 120 horas de ensayo, es decir 24 horas después de la incubación con el reactivo alamarBlue® se determinó que hay una correlación positiva entre el

porcentaje de reducción/oxidación de este reactivo y el porcentaje de zoosporas vivas/muertas (Fig. 3).

Evaluación de la actividad antifúngica mediante microdilución colorimétrica

Utilizando 66 extractos orgánicos provenientes de 22 hongos endófitos (Tabla 1) se realizaron ensayos de microdilución colorimétrica con los parámetros previamente estandarizados (Tabla 2). Del total de extractos evaluados, el 9% de los extractos orgánicos son similares al control negativo de crecimiento de *Bd* (0% de reducción) ($p=0,07$), y se considera que tienen un efecto fungicida contra *Bd*; 14% de ellos son similares al control positivo de crecimiento de *Bd* (100% de reducción) ($p=0,52$) sin tener un efecto alguno sobre el patógeno y el 77% de los extractos presentaron una reducción del alamarBlue® entre >3% y <100% de reducción de alamarBlue® (Tabla 1), con mayor o menor efecto fungistático y fungicida (Fig. 4).

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida

Los valores de CMI fueron determinados para tres extractos orgánicos que produjeron un porcentaje de reducción de alamarBlue® igual al control negativo de crecimiento de *Bd*: CEQCA-O0964d1, CEQCA-O0751d1 y CEQCA-O0212e1. Los valores de CMI variaron entre 6,25 a 100 $\mu\text{g/ml}$ cuando se utilizó metanol como solvente y entre 25 a 200 $\mu\text{g/ml}$ cuando se usó SB como solvente, mostrando diferencias significativas entre solventes (Tukey $\alpha=0,05$). Igualmente, los valores de CMF tuvieron un rango de <1,6 a 100 $\mu\text{g/ml}$ y de 6,25 a 200 $\mu\text{g/ml}$, con los mismos solventes, respectivamente. El valor más bajo de CMI y CMF corresponde al extracto orgánico CEQCA-O0964d1 en ambos solventes. En todos los casos, la CMI determinada para cada extracto en cada una de las repeticiones fue la misma, lo cual se muestra en la Tabla 4. Los valores de CMI determinadas para los extractos disueltos en el solvente metanol fueron usados para los posteriores ensayos de bioactividad antifúngica en agar mientras que las CMI determinadas para los extractos disueltos en el solvente SB fueron usados para los ensayos de citotoxicidad sobre células germinales de anfibio.

Determinación de bioactividad antifúngica en agar

Se tomó la medición de los halos de inhibición que presentaron los extractos orgánicos al estar en contacto con el *Bd* inoculado sobre la placa con TGhL agar. Los extractos orgánicos CEQCA-O0212e1 y CEQCA-O0751d1, que mostraron una inhibición fuerte sobre *Bd* en microdilución colorimétrica, no mostraron halos de inhibición con ninguno de los métodos usados, difusión de disco o difusión en agar. El extracto orgánico CEQCA-O0964d1, que basado en los valores del CMI, tiene el mayor efecto antifúngico entre los extractos ensayados, también presenta un efecto fungistático en ambos métodos de difusión en agar, con halos de inhibición menores al usar discos de antibiogramas (Tabla 5).

Evaluación de la citotoxicidad de extractos orgánicos de hongos endófitos en células germinales de anfibios

El conteo espermático de los controles permaneció constante durante las 48 h que duró el ensayo. Hay diferencias significativas ($p=0,12$) entre tratamientos de extractos orgánicos con relación a los controles de esperma vivo a las 0 h y 48 h, los cuales no tuvieron diferencias significativas ($p=0,00$). El extracto orgánico CEQCA-O0964d1 con mayor actividad fungicida, a la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$, es el que más citotoxicidad presentó con las células espermáticas de anfibio provocando un 62,6% de mortalidad. Los extractos orgánicos CEQCA-O0212e1 y CEQCA-O0751d1 producen un 56,4% y 32,2% de mortalidad a concentraciones de 200 y 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Compuestos Orgánicos Volátiles de hongos endófitos

Los resultados de este ensayo son cualitativos. Los cuatro endófitos inhiben completamente el crecimiento de *Bd* en placa, lo que puede considerarse como un efecto de micofumugación que posee el hongo *Muscador* sp. (Fig. 5).

DISCUSIÓN

Actividad fungicida de extractos orgánicos de hongos endófitos contra *Batrachochytrium dendrobatidis* mediante microdilución colorimétrica

Este es el primer estudio que evalúa la efectividad de extractos orgánicos y compuestos volátiles de hongos endófitos para controlar el desarrollo de *Batrachochytrium dendrobatidis* *in vitro*. Para su realización fue necesario estandarizar varios parámetros para la aplicación de la técnica de microdilución colorimétrica considerando que ni el organismo de estudio ni la combinación extractos de hongos endófitos con *Bd* han sido evaluados con esta metodología anteriormente.

Como resultado de la estandarización de parámetros importantes se ha desarrollado una metodología de microdilución colorimétrica para probar el efecto de hongos endófitos sobre *Bd* que es de aplicación rápida, efectiva y confiable y puede ser aplicada en estudios de similar naturaleza.

La mayoría de los extractos orgánicos de hongos endófitos se disuelven en metanol por lo que es el solvente de elección; sin embargo, en altas concentraciones posee cierto grado de toxicidad que se ha documentado en células del sistema nervioso central en humanos (Kleiman et al., 2009). En este estudio se encontró que una concentración de metanol de $\leq 0,36\%$ no afecta estadísticamente el crecimiento de *Bd* en medio TGhL. En cultivo sin metanol se ha reportado la formación del “germiling” antes de las 24 h de incubación de *Bd* (Berger et al., 2005), a diferencia de este estudio en el que se dio a las 48 horas, por lo que se puede sugerir que hay un posible retraso de la formación de esta estructura en la presencia de metanol; sin embargo, en ambos casos alcanzaron la maduración del zoosporangio y liberación de nuevas zoosporas al tercer y cuarto día (Berger et al., 2005; Longcore et al., 1999), por lo que se concluye que la cantidad de metanol usada no tiene un efecto importante sobre el desarrollo de *Bd* en estas condiciones de cultivo.

El uso del reactivo alamarBlue® es efectivo (AbD Serotec®, 2007) durante la fase de crecimiento exponencial del organismo de estudio. En el caso de *Bd* esta fase corresponde al momento de liberación de nuevas zoosporas, lo cual inicia a las 96

horas (Fig. 2). Este es el tiempo en el cual comienza la fase de crecimiento exponencial (Prapagdee et al., 2008) y por lo tanto es el momento en el cual se debe adicionar el reactivo alamarBlue® para los bioensayos con los extractos orgánicos de los hongos endófitos. Igualmente, fue necesario establecer el tiempo de duración del ensayo con incubación del reactivo debido a que este tiempo varía dependiendo de las características propias de desarrollo y crecimiento de los organismos de estudio.

En organismos de crecimiento rápido, como es el caso de bacterias y levaduras (Tiballi et al., 1995), alamarBlue® tiene un promedio de incubación de 24 horas que puede variar desde una hora en el caso de *Staphylococcus epidermidis* (Pettit et al., 2005) a 48 horas como con *Mycobacterium tuberculosis* (Franzblau et al., 1998). En el caso de *Bd*, el tiempo de incubación con el reactivo alamarBlue® es ligeramente variable y depende en parte del pase de zoosporas a medio enriquecido estéril, ya que en cada pase sucesivo *Bd* tiene un tiempo distinto para alcanzar su reducción completa, por lo que no se puede fijar un tiempo exacto de culminación del ensayo. Se sugiere que este tiempo debe ser determinado en cada ensayo para que los resultados sean confiables, considerando un tiempo máximo de exposición de *Bd* con alamarBlue® entre 24 y 48 horas y se recomienda que se tomen lecturas cada dos horas hasta que el control positivo alcance el 100% de reducción (Fig. 1).

Como se aprecia en la Fig. 3, la correlación entre el porcentaje de reducción del reactivo y el porcentaje de zoosporas muertas es muy definida en el rango alto de reducción del alamarBlue®. Sin embargo, en el rango inferior al 50% de reducción, es decir, donde hay mayor número de zoosporas muertas, no se registraron datos de reducción del alamarBlue®. Lo que se sabe es que hay un bajo porcentaje de zoosporas en este rango y cuando hay un 100% de reducción del reactivo, corresponde a la ausencia completa de individuos vivos de *Bd*. Aunque entre el 100% y el 75% de oxidación del reactivo podría haber un porcentaje mínimo de *Bd* viables, al no tener datos en este rango se consideró solo los hongos endófitos que produjeron el equivalente al 0% de reducción como fungicidas. Este aspecto también es importante si se quiere realizar una aplicación *in vivo* ya que las diferentes especies de anfibios tienen también diferente grado de susceptibilidad a *Bd* por lo que preferencialmente el extracto debe tener un efecto fungicida.

En el Ecuador se conoce que hay una baja diversidad de este patógeno producto, probablemente, de una reciente introducción al país y se sugiere la posibilidad de endemismo (Vizcaíno et al., 2012). Sin embargo, hasta el momento no se ha aislado ni se tiene *in vitro* ninguna forma morfológica ecuatoriana de este patógeno por lo cual en este estudio se utilizó la cepa JEL 423 de *Batrachochytrium dendrobatidis* proveniente de la Universidad de Maine, Orono, EE.UU.

La producción de metabolitos secundarios de hongos endófitos puede estar ligada a condiciones del cultivo como composición nutricional, pH, temperatura o luz. La variación de alguno de estos elementos podrían incrementar la producción de metabolitos secundarios necesarios (Calvo et al., 2002). Del total de los extractos orgánicos, seis presentaron 0% de reducción de alamarBlue® y por lo tanto un efecto fungicida en el tamizaje inicial con microdilución colorimétrica, mientras que 51 mostraron diferente grado de efecto fungistático y sin efecto antifúngico, al igual que diferente porcentaje de reducción del reactivo alamarBlue®. Por lo tanto, se debe considerar que al estar probando extractos orgánicos y no biocompuestos purificados la efectividad de la actividad antifúngica contra *Bd* puede variar. Esto también influirá en la concentración del extracto que se obtiene a partir de diferentes cultivos del mismo hongo y por lo tanto en la concentración mínima inhibitoria cuantificada. Solo al obtener el compuesto purificado se podrá establecer un CMI específico.

Se determinó el valor de CMI para los extractos con efecto fungicida. Según la literatura, no existe una concentración estándar para definir que un extracto orgánico es promisorio o no; por ejemplo, algunos autores han usado extractos orgánicos con valores altos de CMI contra patógenos, expresados en mg/ml (Lee et al., 2007), mientras que otros autores han obtenido inhibición contra patógenos con CMIs menores a 200 µg/ml (Buatong et al., 2011; Guimarães et al., 2008; Harun et al., 2011; Rhoden, 2012); como los resultados de este ensayo con una CMI en un rango de 200 a 6,25 µg/ml y una CMF en un rango <1,6 a 100 µg/ml. En ocasiones, un aumento en la concentración puede lograr que un efecto fungistático pase a ser fungicida. No obstante, tanto los valores de CMI como CMF son importantes a considerar en la evaluación de la efectividad de los extractos usados. Estos resultados muestran que los biocompuestos derivados de hongos endófitos pueden ser

promisorios para combatir patógenos animales como el hongo patógeno de anfibios *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Un aspecto importante para pasar desde los ensayos *in vitro* a los ensayos *in vivo* es establecer la citotoxicidad de los extractos. En este estudio se usaron células germinales de anfibios de la especie *Smilisca* sp. por ser de fácil acceso, pero los ensayos con esperma de anfibio generalmente proveen información relevante sobre viabilidad del esperma después de estar en criopreservación para uso posterior en reproducción (Beesley et al., 1998; O'Connell et al., 2002) o identificar diferencias morfológicas entre especies de anfibios (Vergilio et al., 2013). Es interesante considerar los estudios de citotoxicidad con células espermáticas sobre todo para las especies de anfibios que tienen fecundación externa (Wells, 2010), en el caso de usar desinfectantes a base de extractos orgánicos de hongos endofitos para la limpieza de terrarios donde se encuentren este tipo de anfibios. Los tres extractos CEQCA-O0964d1, CEQCA-O0751d1, CEQCA-O0212e1 mostraron un efecto citotóxico en células germinales de anfibios. El extracto endófito CEQCA-O0964d1 fue el que mayor efectividad tuvo contra *Bd*, sin embargo, también presentó alto nivel de citotoxicidad, mientras que el extracto CEQCA-O0751d1 fue el que provocó la menor mortandad de espermatozoides, a una CMI establecida de 100 µg/ml.

Entre los tres extractos evaluados, los valores menores de CMI y CMF se determinaron para el extracto O0964d1 tanto en el solvente SB como en metanol, siendo el CMF menor al CMI en los dos solventes. A la vez es el extracto que mayor citotoxicidad presentó en las células germinales de anfibios. En el caso del extracto O0751d1 el CMI y el CMF no varían bajo ninguna de las condiciones y fue el que menor citotoxicidad presentó. Se debe continuar con los ensayos *in vitro* usando estos dos extractos para determinar la concentración que sea efectiva como fungicida y a la vez no presente citotoxicidad. Además, se recomienda probar los extractos *in vivo* con anfibios susceptibles para evaluar los posibles efectos fisiológicos o anatómicos (Blanco, 2009; Hardy et al., 2015). Al tratarse de un posible tratamiento para anfibios es posible considerar el uso de los extractos sin proceder a la purificación de los biocompuestos siempre y cuando los estudios *in vivo* indiquen que no hay efectos secundarios de importancia. Por otro lado, se puede pensar en la purificación de los compuestos para conocer la o las biomoléculas activas específicas contra *Bd*.

Bioensayos de actividad antifúngica en agar

Se observaron diferencias entre los métodos de difusión en agar, difusión con disco y microdilución colorimétrica al utilizar extractos de hongos endófitos en una misma concentración (Tabla 5).

Uno de los objetivos de realizar esta comparación entre metodologías era evaluar si los bioensayos en placa eran consistentes con los resultados del método de microdilución. En este caso, solo el extracto con el menor CMI produjo resultados observables en los ensayos en placa. En los ensayos de medio sólido, un factor crucial es la capacidad de difusión del extracto a probar, pues una mayor difusión puede producir un halo de inhibición más grande (Valgas et al., 2007). El proceso de difusión depende de numerosos factores, entre ellos el número de partículas. Existe una correlación positiva entre el número de partículas (concentración de un compuesto) y capacidad de difusión (Heneine, 2000). Este podría ser uno de los factores que expliquen las diferencias vistas al comparar los ensayos. La ausencia de halos de inhibición de los extractos CEQCA-O0212e1 y CEQCA-O0751d1 sobre agar puede deberse a que los ensayos se realizaron utilizando los valores de concentración mínima inhibitoria obtenidos por microdilución colorimétrica y deberían de ser evaluados a mayores concentraciones.

Se observó una menor inhibición en los métodos de difusión en disco que al usar difusión en agar (Tabla 5). El disco de antibiograma estándar (filtro de papel Whatman) utilizado en difusión en disco se compone de celulosa; este sustrato es hidrófilico debido a que posee grupos hidroxilo libres (Burgess et al., 1999). Los extractos orgánicos que se utilizaron para este proyecto son una mezcla de compuestos con distinta naturaleza química; algunos pueden ser mayormente apolares, lo cual les permite ser adsorbidos por el disco y difundirse en el medio sin ser influenciados por los hidroxilos del disco. Mientras que un extracto orgánico mayormente polar puede alterar sus resultados por interacciones con el disco y tener menor capacidad de difusión en el medio. Es así que el método de difusión en disco es muy usado para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana con antibióticos purificados de los cuales se conoce su polaridad (Blanco, 2009; Hindler & Humphries, 2013; Venisse et al., 2008), mientras que el método de difusión en agar es recomendable para compuestos naturales no purificados (Valgas et al., 2007). Por lo

tanto, en este caso, el método de difusión en agar muestra más sensibilidad que la variante de disco para el uso de extractos orgánicos de hongos endófitos en *Bd*.

Según los resultados obtenidos para probar extractos orgánicos en bioensayos de actividad antifúngica, la metodología más sensible es la microdilución, pues mostró inhibiciones que no fueron detectadas en los métodos basados en agar, esto puede deberse a que arroja resultados precisos por ser una metodología cuantitativa (Hindler & Humphries, 2013). Así mismo, al utilizar microdilución colorimétrica usando alamarBlue®, los resultados son detectables de manera cualitativa (azul=fungicida; rosado=sin efecto antifúngico) y cuantitativa (calculando el porcentaje de reducción de alamarBlue®) (AbD Serotec®, 2007; Cos et al., 2006; E Silva et al., 2013).

Compuestos Orgánicos Volátiles de hongos endófitos

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por los hongos endófitos poseen actividad antimicrobiana de amplio espectro (Meshram et al., 2013). El uso más frecuente que se da a los VOCs de los hongos endófitos son micofumigación al usarlos como biopesticidas (Alpha et al., 2015; Strobel et al., 2003). Varias especies de hongos endófitos producen estos compuestos volátiles, algunos ejemplos son: *Hypoxyylon* sp., *Phomopsis* sp., *Muscodor kashayum* o *M. albus*, los cuales poseen gran cantidad de moléculas tipo cetonas, aminas, fenoles, monoterpenos, éster, alcoholes y ácidos que actúan de forma antibiótica sobre algunos patógenos de plantas (Banerjee et al., 2014; Rundell et al., 2015) como *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cinnamomi*, *Cercospora beticola* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Nair & Padmavathy, 2014) o patógenos de humanos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Alpha et al., 2015; Meshram et al., 2013). La acción que producen los VOCs en la biología de los patógenos es a nivel molecular provocando un daño en el material génico durante las etapas de transcripción y replicación del DNA, como en el caso de *M. albus* contra *E. coli* (Alpha et al., 2015). La facilidad de difusión en el ambiente junto con todas las propiedades anteriormente mencionadas que poseen estos VOC producidos por los hongos endófitos, los vuelven una

alternativa innovadora para en un futuro usarlos con los anfibios susceptibles o infectados con quitridiomicosis en cautiverio.

Los endófitos tienen la capacidad de producir tanto compuestos orgánicos volátiles (VOCs) como metabolitos secundarios útiles para la erradicación de *Bd*, y podrían ser una alternativa al uso de los fungicidas sintéticos en centros de rescate y de reproducción de anfibios *ex situ*. Los efectos *in vivo* de los compuestos orgánicos volátiles producidos por los hongos endófitos aún deben ser evaluados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AbD Serotec®, B.-R.A., 2007. alamarBlue ® Assay. US Pat. No 5501959. doi:U.S. Patent No. 5,501,959
- Alpha, C.J., M. Campos, C. Jacobs-Wagner & S.A. Strobel. 2015. Mycofumigation by the volatile organic compound-producing fungus *Muscodor albus* induces bacterial cell death through DNA damage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81: 1147–1156.
- Baitchman, E.J. & A.P. Pessier. 2013. Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Amphibian Chytridiomycosis. *Vet. Clin. North Am. - Exot. Anim. Pract.*, 16: 669–685.
- Bales, E.K., O.J. Hyman, A.H. Loudon, R.N Harris, G. Lipps, E. Chapman, K. Roblee, J.D. Kleopfer & K.A. Terrell. 2015. Pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, but not *B. salamandrivorans*, detected on eastern hellbenders. *PLoS One.*, 10: 1–9.
- Banerjee, D., A. Pandey, M. Jana & G. Strobel. 2014. *Muscodor albus* MOW12 an Endophyte of *Piper nigrum* L. (Piperaceae) Collected from North East India Produces Volatile Antimicrobials. *Indian J. Microbiol.*, 54: 27–32.
- Bascom-Slack, C.A., A.E. Arnold & S.A Strobel. 2012. Plant Microbiome and Its Products. *Science*, 80 (338): 485–486.
- Beesley, S.G., J.P. Costanzo & R.E. Lee. 1998. Cryopreservation of spermatozoa from freeze-tolerant and - intolerant anurans. *Cryobiology*, 37: 155–162.
- Bell, S.C., R. Alford, S. Garland, G. Padilla & A.D. Thomas. 2013. Screening bacterial metabolites for inhibitory effects against *Batrachochytrium dendrobatidis* using a spectrophotometric assay. *Dis. Aquat. Organ*, 103: 77–85.
- Berger, L., A.D. Hyatt, R. Speare & J.E. Longcore. 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Organ.*, 68: 51–63.
- Berger, L., A.A. Roberts, J. Voyles, J.E. Longcore, K.A. Murray & L.F. Skerratt. 2016. History and recent progress on chytridiomycosis in amphibians. *Fungal*

- Ecol., 19: 89–99.
- Blanco, M.T. 2009. Actividad in vitro de posaconazol , fluconazol , itraconazol , ketoconazol y voriconazol frente a *Candida glabrata*. In Vitro, 22: 139–143.
- Blooi, M., F. Pasmans, J.E. Longcore, Der Sluijs. Spitzen-Van, F. Vercammen & A. Martel. 2013. Duplex real-Time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples. J. Clin. Microbiol., 51: 4173–4177.
- Briggs, C.J., R. Knapp & V.T. Vredenburg. 2010. Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. Proc. Natl. Acad. Sci., 107: 9695–9700.
- Brown, J., 2013. Net Effects of *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) and Fungicides on Anurans Across Life Stages. Grad. Theses Diss.
- Brucker, R.M., R.N. Harris, C.R. Schwantes, T.N. Gallaher, D.C Flaherty, B. Lam & K.P.C. Minbiole. 2008. Amphibian Chemical Defense: Antifungal Metabolites of the Microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the Salamander *Plethodon cinereus*. J. Chem. Ecol., 34: 1422–1429.
- Buatong, J., S. Phongpaichit, V. Rukachaisirikul & J. Sakayaroj. 2011. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. World J. Microbiol. Biotechnol., 27: 3005–3008.
- Burgess, J.G., E.M. Jordan, M. Bregu, A. Mearns-Spragg & K.G. Boyd. 1999. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. Prog. Ind. Microbiol., 35: 27–32.
- Calvo, A.M., R.A. Wilson, J.W. Bok & N.P. Keller. 2002. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. Microbiol. Mol. Biol., Rev. 66: 447–459.
- Cheatsazan, H., A.P.L.G. de Almedia, A.F. Russell & C. Bonneaud. 2013. Experimental evidence for a cost of resistance to the fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*, for the palmate newt, *Lissotriton helveticus*. BMC Ecol., 13: 27.

- Cos, P., A.J. Vlietinck, D. Berghe & M.L. Vanden. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* “proof-of-concept.” *J. Ethnopharmacol.*, 106: 290–302.
- Flechas, S. V., C. Sarmiento, M.E. Cárdenas, E.M. Medina, S. Restrepo & A. Amézquita. 2012. Surviving Chytridiomycosis: Differential Anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* Activity in Bacterial Isolates from Three Lowland Species of *Atelopus*. *PLoS One*, 7: e44832. doi:10.1371/journal.pone.0044832
- Forcina, G.C., A. Castro, H.R. Bokesch, D.J. Spakowicz, M.E. Legaspi, K. Kucera, S. Villota, A. Narváez-Trujillo, J.B. McMahon, K.R. Gustafson & S.A. Strobel. 2015. Stelliosphaerols A and B, Sesquiterpene-Polyol Conjugates from an Ecuadorian Fungal Endophyte. *J. Nat. Prod.*, 78: 3005–3010.
- Forzán, M.J., R. Vanderstichel, N.S. Hogan, K. Teather & J. Wood. 2010. Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in three species of wild frogs on Prince Edward Island, Canada. *Dis. Aquat. Organ.*, 91: 91–96.
- Franzblau, S.G., R.S. Witzig, J.C. McLaughlin, P. Torres, G. Madico, A. Hernandez, M.T. Degnan, M.B. Cook, V.K. Quenzer, R.M. Ferguson & R.H. Gilman. 1998. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 362–366.
- Guimarães, D.O., W.S. Borges, C.Y. Kawano, P.H. Ribeiro, G.H. Goldman, A. Nomizo, O.H. Thiemann, G. Oliva, N.P. Lopes & M.T. Pupo. 2008. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 52: 134–144.
- Guo, B., Y. Wang, X. Sun & K. Tang. 2008. Bioactive natural products from endophytes: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 44: 136–142.
- Hamilton, P.T., J.M.L. Richardson, P. Govindarajulu & B.R. Anholt. 2012. Higher temperature variability increases the impact of *Batrachochytrium dendrobatidis* and shifts interspecific interactions in tadpole mesocosms. *Ecol. Evol.*, 2: 2450–2459.

- Hardy, B.M., K.L. Pope, J. Piovio-Scott, R.N. Brown & J.E. Foley. 2015. Itraconazole treatment reduces *Batrachochytrium dendrobatidis* prevalence and increases overwinter field survival in juvenile Cascades frogs. *Dis. Aquat. Organ.*, 112: 243–250.
- Harris, R.N., T.Y. James, A. Lauer, M.A. Simon & A. Patel. 2006. Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* Is Inhibited by the Cutaneous Bacteria of Amphibian Species. *Ecohealth*, 3: 53–56.
- Harun, A., R. James, S. Lim, A. Majeed, A.L. Cole & K. Ramasamy. 2011. BACE1 inhibitory activity of fungal endophytic extracts from Malaysian medicinal plants. *BMC Complement. Altern. Med.*, 11: 79.
- Heneine, I.F. 2000. Biofísica básica. In *Biofísica básica*. Editorial Atheneu.
- Hindler, J.A. & R.M. Humphries. 2013. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.*, 51: 1678–1684.
- Huang, Y., J. Wang, G. Li, Z. Zheng & W. Su. 2001. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 31: 163–167.
- Johnson, M.L., & R. Speare. 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: Quarantine and disease control implications. *Emerg. Infect. Dis.*, 9: 922–925.
- Johnson, M.L. & R. Speare. 2005. Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Dis. Aquat. Organ.*, 65: 181–186.
- Kleiman, R., R. Nickle. & M. Schwartz. 2009. Medical toxicology and public health--update on research and activities at the Centers for Disease Control and Prevention, and the Agency for Toxic Substances and Disease Registry inhalational methanol toxicity. *J. Med. Toxicol.*, 5: 158–64.
- Lee, S.H., K.S. Chang, M.S. Su, Y.S. Huang & H.D. Jang. 2007. Effects of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi. *Food Control*, 18: 1547–

1554.

- Longcore, J.E., A.P. Pessier & D.K. Nichols. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. *Mycologia*, 91: 219–227.
- Martel, A., P. Van Rooij, G. Vercauteren, K. Baert, L. Van Waeyenberghe, P. Debacker, T.W.J. Garner, T. Woeltjes, R. Ducatelle, F. Haesebrouck & F. Pasmans. 2011. Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Med. Mycol.*, 49: 143–149.
- McMahon, T., L. Brannelly, M.W.H. Chatfield, P.T.J. Johnson, M.B. Joseph, V.J. McKenzie, C.L. Richards-Zawacki, M.D. Venesky & J.R. Rohr. 2013. Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110: 210–5.
- McMahon, T.A. & J.R. Rohr. 2014. Trypan Blue Dye is an Effective and Inexpensive Way to determine the viability of *Batrachochytrium dendrobatidis* Zoospores.pdf, EcoHealth. Florida., doi:10.1007/s10393-014-0908-0
- Meshram, V., N. Kapoor & S. Saxena. 2013. *Muscodor kashayum* sp. nov. - a new volatile anti-microbial producing endophytic fungus. *Mycology*, 4: 196–204.
- Muijsers, M., A. Martel, P. Vanrooij, K. Baert, G. Vercauteren, R. Ducatelle, P. Debacker, F. Vercammen, F. Haesebrouck & F. Pasmans. 2012. Antibacterial therapeutics for the treatment of chytrid infection in amphibians: Columbus's egg? *BMC Vet. Res.*, 8: 175.
- Nair, D.N. & S. Padmavathy. 2014. Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. *Sci. World J.*, 1: 11.
- O'Brian, J., I. Wilson, T. Orton & F. Pognan. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.*, 267: 5421–5426.
- O'Connell, M., N. McClure & S.E.M. Lewis. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum. Reprod.*, 17: 704–709.

- Olson, D.H., D.M. Aanensen, K.L. Ronnenberg, C.I. Powell, S.F. Walker, J. Bielby, T.W.J. Garner, G. Weaver & M.C. Fisher. 2013. Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Amphibian Chytrid Fungus. PLoS One, 8: 1–13.
- Park, S.T., A.M. Collingwood, S. St-Hilaire & P.P. Sheridan. 2014. Inhibition of *Batrachochytrium dendrobatidis* Caused by Bacteria Isolated from the Skin of Boreal Toads, *Anaxyrus (Bufo) boreas boreas*, from Grand Teton National Park, Wyoming, USA. Microbiol. Insights, 7: 1–8.
- Patridge, E.V., A. Darnell, K. Kucera, G.M. Phillips, H.R. Bokesch, K.R. Gustafson, D.J. Spakowicz, L. Zhou, W.M. Hungerford, M. Plummer, D. Hoyer, A. Narváez-Trujillo, A.J. Phillips & S.A. Strobel. 2015. Pyrrolocin A, a 3-decalinoyltetramic acid with selective biological activity, isolated from amazonian cultures of the novel endophyte diaporthales sp. E6927E. Nat. Prod. Commun., 10: 1649-1654.
- Pettit, R.K., C. Weber, M.J. Kean, H. Hoffmann, G.R. Pettit, R. Tan, K.S. Franks & M.L. Horton. 2005. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. Antimicrob. Agents Chemother., 49: 2612–2617.
- Piotrowski, J.S., S.L. Annis & J.E. Longcore. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. Mycologia, 96: 9–15.
- Prapagdee, B., C. Kuekulvong & S. Mongkolsuk. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. Int. J. Biol. Sci., 4: 330–337.
- Ramsey, J.P., L.K. Reinert, L.K. Harper, D.C. Woodhams & L. Rollins-Smith. 2010. Immune Defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a Fungus Linked to Global Amphibian Declines, in the South African Clawed Frog, *Xenopus laevis*. Infect. Immun., 78: 3981–3992.
- Rhoden S.A., A. Garcia, V.A. Bongiorno, J.L. Azevedo & J.A. Pamphile. 2012. Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Trichilia elegans* A. Juss. J. Appl. Pharm. Sci., 02: 57–59.

- Rodrigues, K.F., M. Hesse & C. Werner. 2000. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *J. Basic Microbiol.*, 40: 261–267.
- Rohr, J.R., T.R. Raffel, J.M. Romansic, H. McCallum & P.J. Hudson. 2008. Evaluating the links between climate, disease spread, and amphibian declines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105: 17436–17441.
- Rollins-Smith, L., L.K. Reinert, V. Miera & J.M. Conlon. 2002. Antimicrobial peptide defenses of the Tarahumara frog, *Rana tarahumarae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 297: 361–367.
- Rollins-Smith, L.A., J.P. Ramsey, J.D. Pask, L.K. Reinert & D.C. Woodhams. 2011. Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: Impacts of changing environments. *Integr. Comp. Biol.*, 51: 552–562.
- Ron, S.R. & A. Merino. 2000. Declinación de anfibios del Ecuador: informacion general y primer reporte de chytridiomycosis para Sudamerica. *FrogLog*, 42:2-3.
- Ron S.R., J.M. Guayasamin & P.A. Menéndez-Guerrero. 2011. Biodiversity and Conservation Status of Amphibians of Ecuador. *Amphibian Biology.*, 6:130-186.
- Rosenblum, E.B., J.E. Stajich, N. Maddox & M.B. Eisen. 2008. Global gene expression profiles for life stages of the deadly amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105: 17034–17039.
- Rundell, S., D. Spakowicz, A. Narváez-Trujillo & S. Strobel. 2015. The Biological Diversity and Production of Volatile Organic Compounds by Stem-Inhabiting Endophytic Fungi of Ecuador. *J. Fungi*, 1: 384–396.
- Silva, A.C.A. de P., H.C. Oliveira, J.F. Silva, F. Sangalli-Leite, L. Scorzoni, M. Fusco-Almeida & M.J.S. Mendes-Giannini. 2013. Microplate alamarBlue assay for *Paracoccidioides* susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.*, 51: 1250–2.
- Strobel, G., D.C. Manker & J. Mercier. 2003. Endophytic fungi and methods of use. United States Pat. No. US 6,911,338 B2 1. doi:10.1016/j.(73)

- Tennessen, J., D.C. Woodhams, P. Chaurand, L.K Reinert, D. Billheimer, Y. Shyr, R.M. Caprioli, M.S. Blouin & A. Louise. 2010. Variations in the expressed antimicrobial peptide repertoire of northern leopard frog (*Rana pipiens*) populations suggest intraspecies differences in resistance to pathogens. *Dev Comp Immunol.*, 33: 1247–1257.
- Tiballi, R.N., X. He, L.T. Zarins, S.G. Revankar & C. Kauffman. 1995. Use of a colorimetric system for yeast susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 915–7.
- Valgas, C., S.M. Souza, E.F Smânia & S.J. Artur. 2007. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Brazilian J. Microbiol.*, 38: 369–380.
- Van Rooij, P., A. Martel, K. D’Herde, M. Brutyn, S. Croubels, R. Ducatelle, F. Haesebrouck & F. Pasmans. 2012. Germ Tube Mediated Invasion of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amphibian Skin Is Host Dependent. *PLoS One*, 7: e41481. doi:10.1371/journal.pone.0041481
- Venisse, N., N. Grégoire, M. Marliat & W. Couet. 2008. Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic models of in vitro fungistatic and fungicidal effects against *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52: 937–943.
- Vergílio, C.S., R.V. Moreira, C.E.V. de Carvalho & E.J.T. de Melo. 2013. Characterization of mature testis and sperm morphology of *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Teleostei) from the southeast of Brazil. *Acta Zool.*, 94: 364–370.
- Vizcaíno M.C., W.C. Barnes & M.E. Ordoñez. 2013. Estructuración genética de muestras del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en Ecuador. *REMC.*, 34: 47-62.
- Wells, K. D. 2010. *The ecology and behavior of amphibians*. University of Chicago Press.

4. FIGURAS

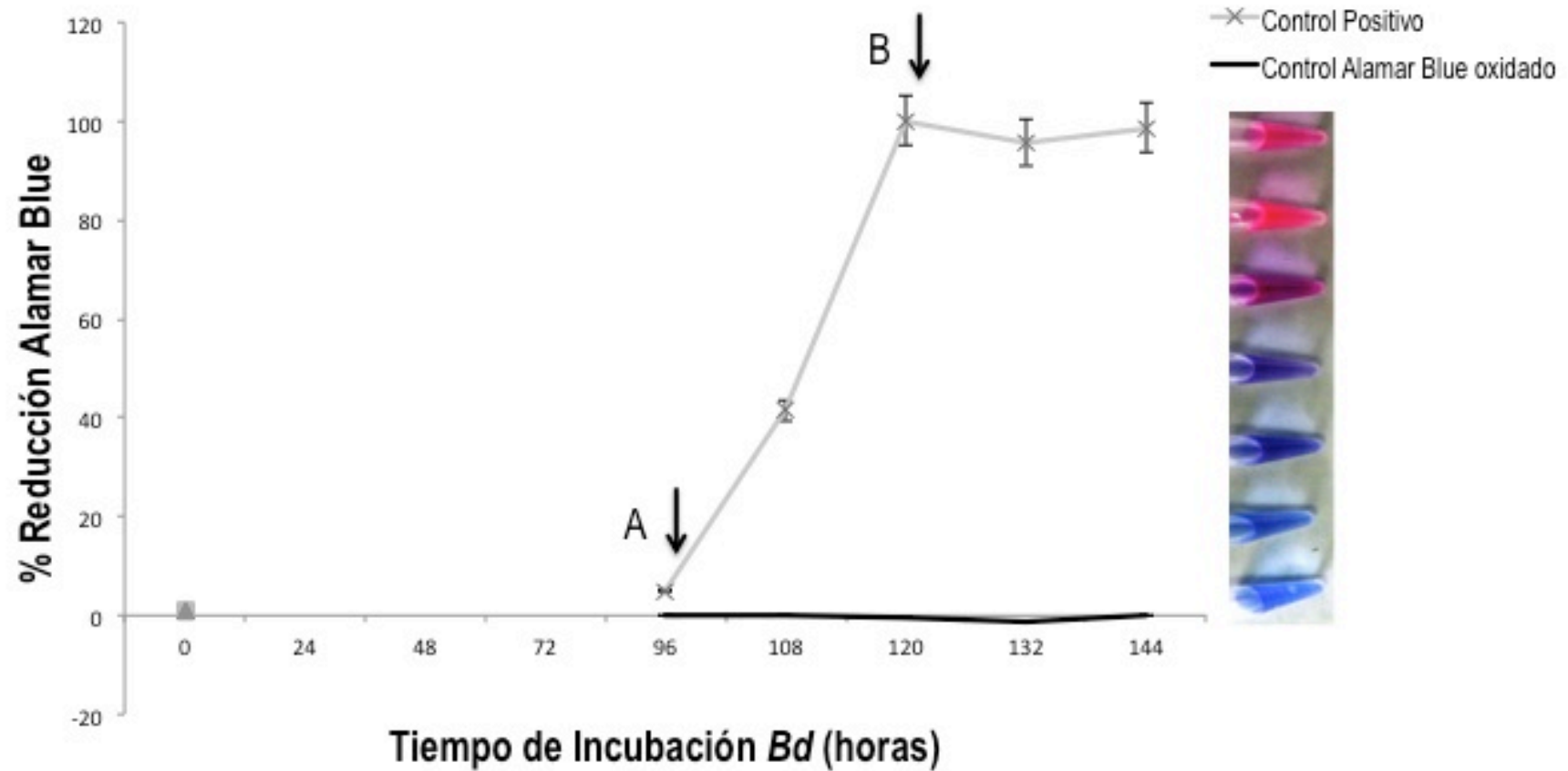


Figura 1. Variación del porcentaje de reducción de alamarBlue® a lo largo del ensayo (oxidado/azul, reducido/rosado). (A) Se colocó alamarBlue® a las 96 horas de crecimiento de *Bd* en cultivo. (B) En el control positivo se observa un crecimiento exponencial de *Bd* hasta las 120 horas, este tiempo determina el final del ensayo.

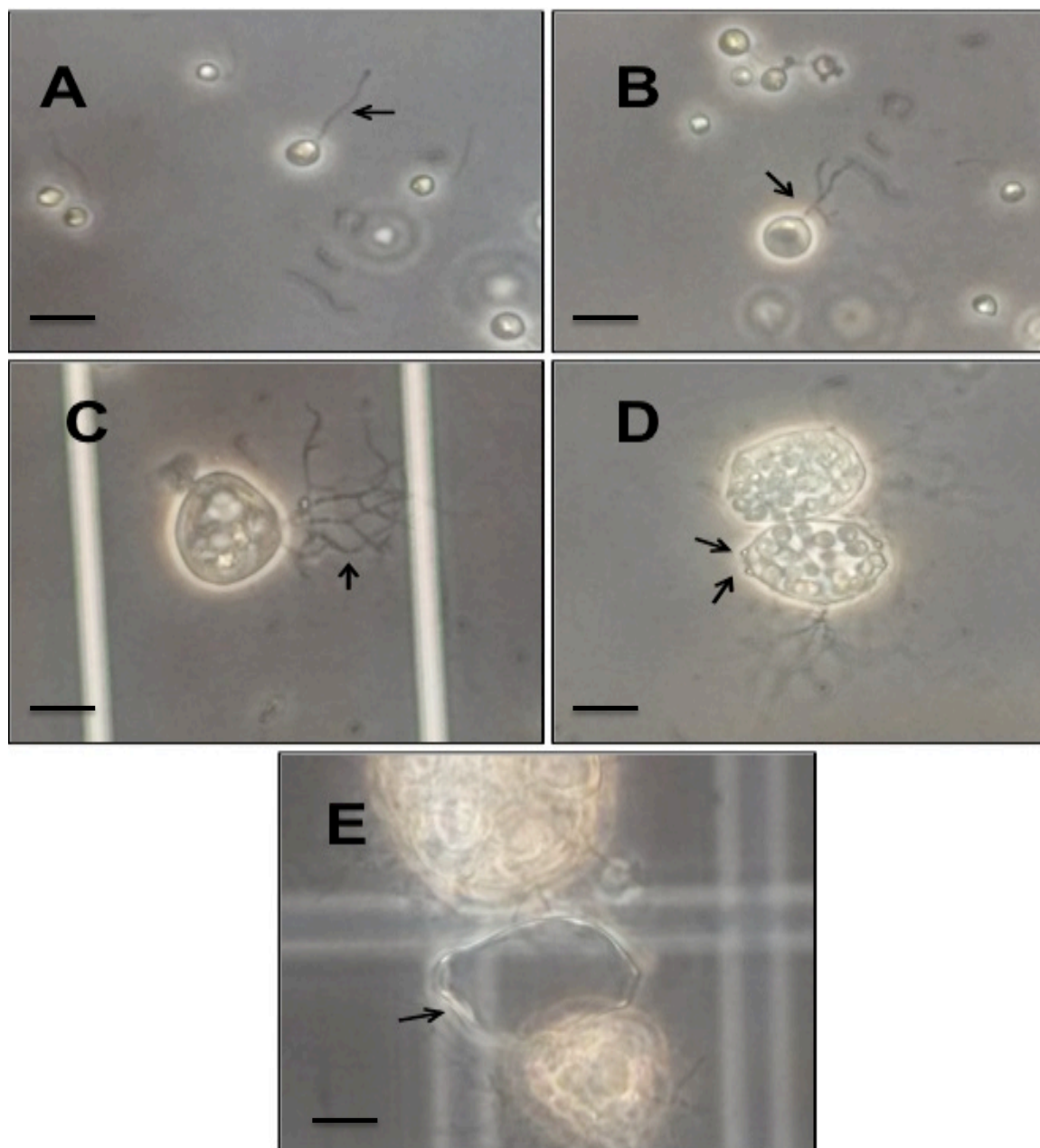


Figura 2. Desarrollo de *Batrachochytrium dendrobatidis* en medio TGhL líquido con 8µl de metanol. Fotografías tomadas con microscopio óptico con contraste de fases 20x, (2,5x obtovar y 1,8x zoom digital). (A) Zoosporas con un flagelo móvil (flecha). (B) Maduración de zoosporas, se observa aumento de tamaño y número de flagelos formando “Germling” (flecha). (C) Formación de zoosporangio con Rizoides filiformes (flecha). (D) Maduración de zoosporangio. (D) Se observan papilas de descarga (flecha). (E) Liberación de zoosporas. La flecha muestra un zoosporangio vacío. Barra de escala = 10 µm para todas las fotografías.

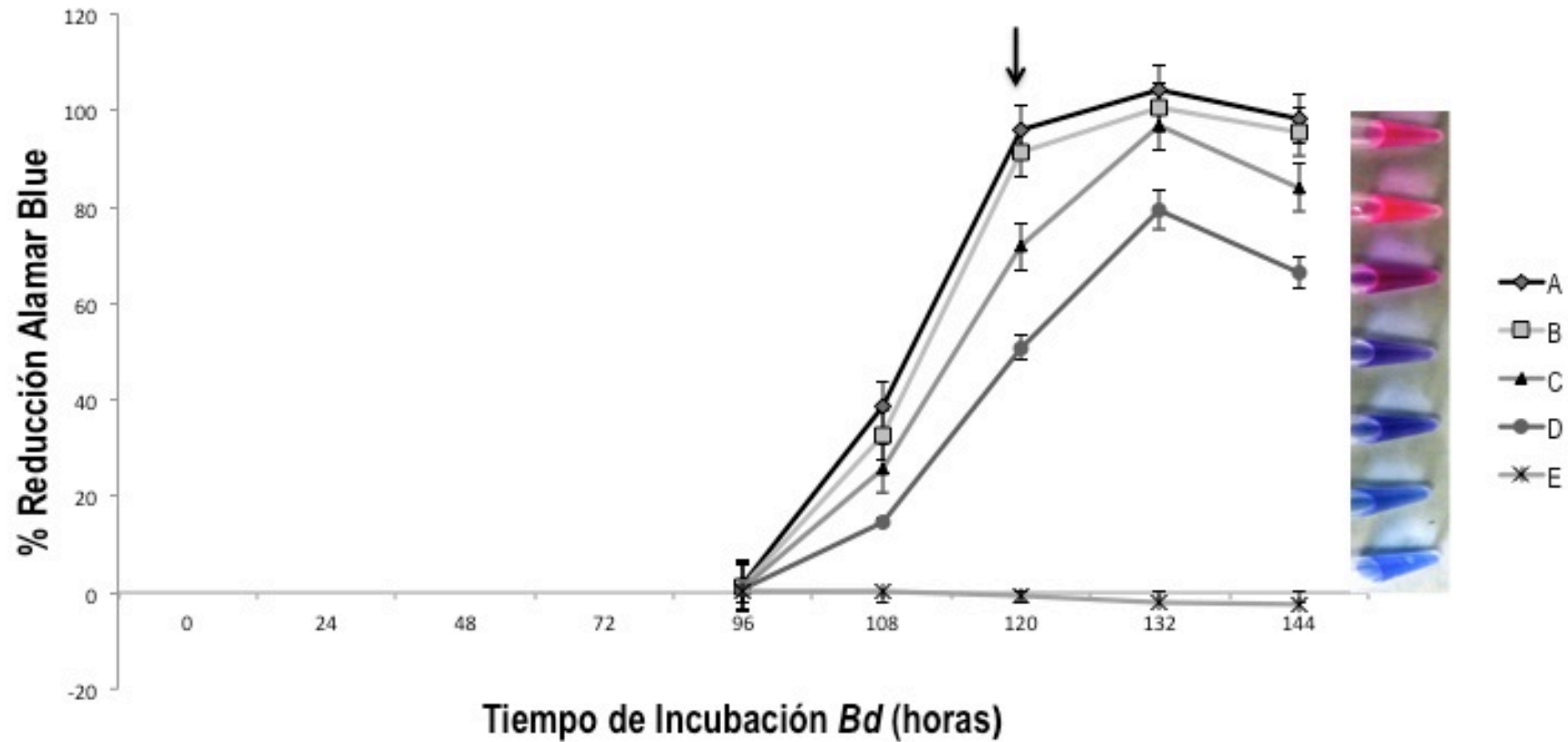


Figura 3. Relación porcentaje de reducción de alamarBlue® y porcentaje de zoosporas de *Bd* vivas. (A) 100% de zoosporas de *Bd* vivo producen $\pm 100\%$ de reducción de alamarBlue®, (B) 75% de *Bd* vivo y 25% de *Bd* muerto produce $\pm 90\%$ de reducción de alamarBlue®, (C) 50% de *Bd* vivo y muerto producen $\pm 70\%$ de reducción, (D) 25% de *Bd* vivos y 75% de *Bd* muertos produce $\pm 50\%$ de reducción, (E) 100% de *Bd* muerto provoca $\pm 0\%$ de reducción de alamarBlue®, a las 24 horas de incubación de alamarBlue® (flecha).

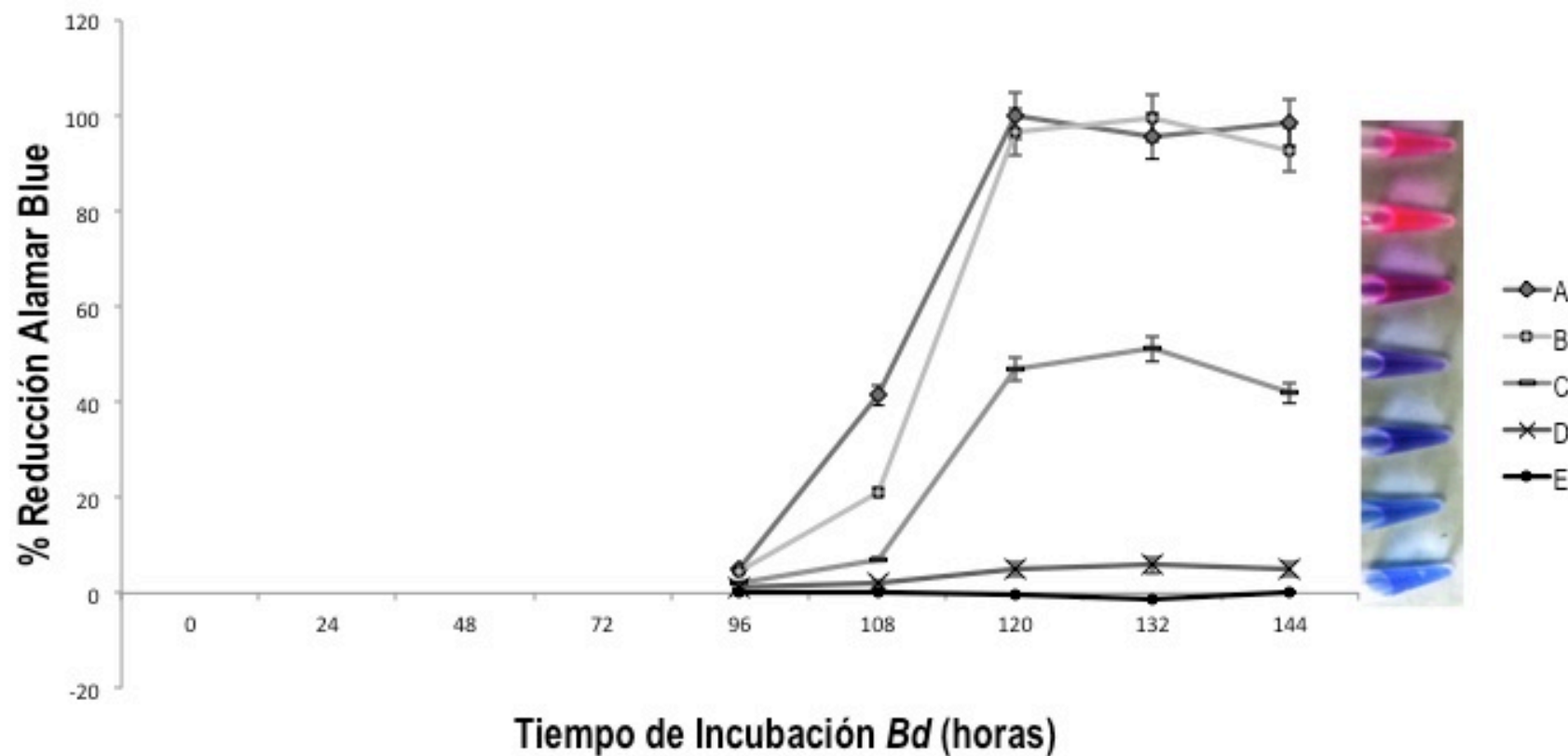


Figura 4. Evaluación de la actividad antifúngica mediante microdilución colorimétrica. (A) Control positivo 100% reducido. (B) CEQCA-G0795e1 no produce efecto antifúngico sobre *Bd*, 96% de reducción. (C) CEQCA-O0764m1 produce un efecto fungistático sobre *Bd*, 47,5% de reducción. (D) CEQCA-O0751d1 con efecto fungicida sobre *Bd*, 2% de reducción. (E) Control alamarBlue® oxidado, 0% de reducción de alamarBlue®, lo que equivale a ausencia de crecimiento de *Bd*.

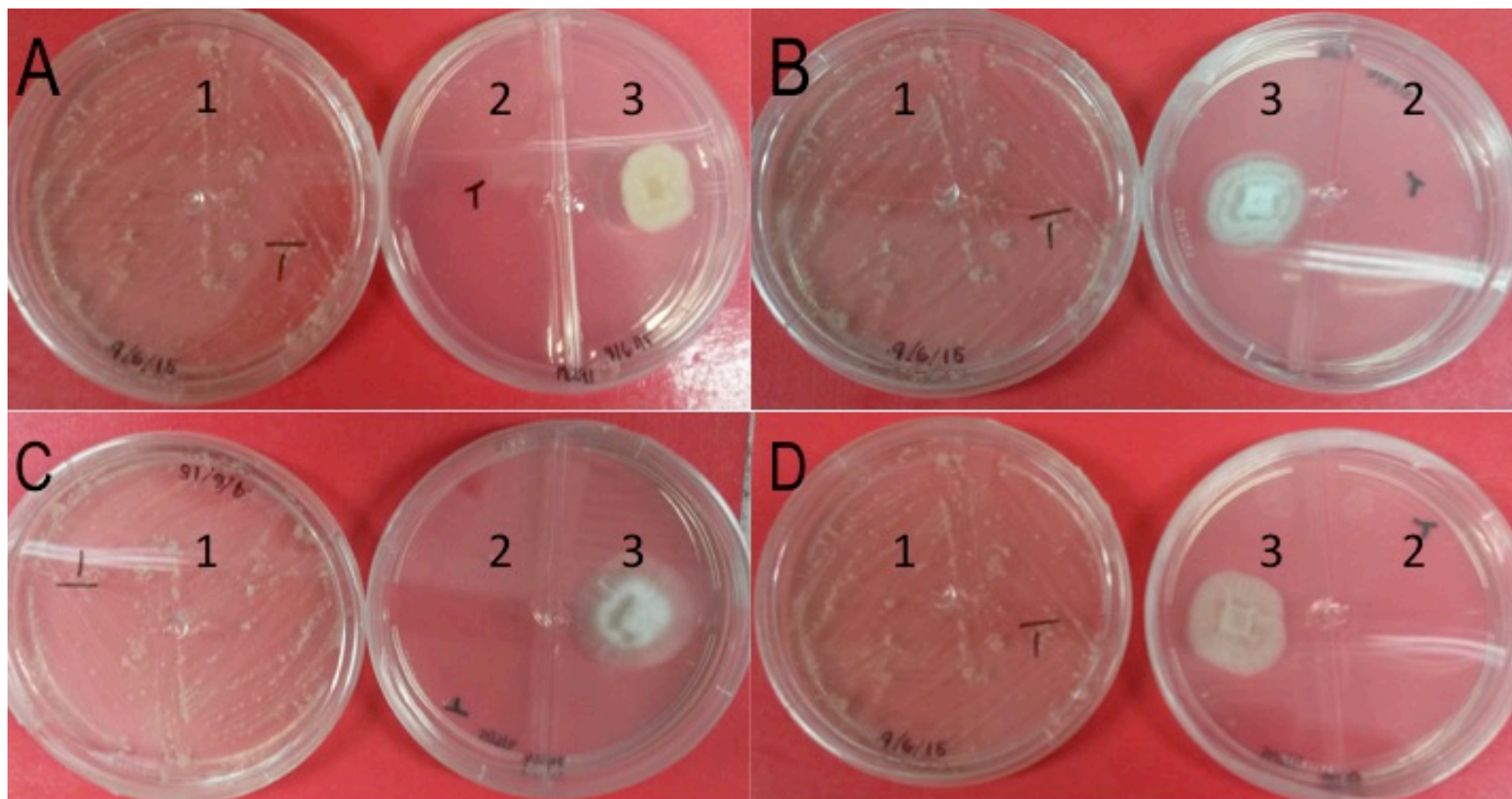


Figura 5. Efecto de los VOCs producidos por hongos endófitos sobre *Bd*. En número los tratamientos utilizados: 1. Control de crecimiento de *Bd*. 2. Sección de placa bipetri donde se cultivó *Bd* en presencia de VOCs 3. Hongo endófito productor de VOCs. Fotografías tomadas a los 7 días de cultivo. Las letras muestran los códigos de los hongos productores de VOCs: A. CEQCA-M1291, B. CEQCA-O0003, C. CEQCA-0224, D. CEQCA O1100.

5. TABLAS

Tabla 1. Características de extractos orgánicos obtenidos de hongos endófitos de la CEQCA. Para cada extracto se presenta pH, peso (mg) y el porcentaje de reducción del reactivo alamarBlue® en las pruebas contra *Batrachochytrium dendrobatidis* por microdilución colorimétrica.

Provincia	Identificación	Código Endófito	Código del Extracto CEQCA ^a	pH Extracción	Peso del Extracto (mg)	% AB reducido
Pichincha	<i>Cadophora</i> sp.	P0004	P0044d1	5	9	18,1
			P0044e1		23	4,1
			P0044m1		67	93,1
Orellana	<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	O0071	O0071d1	5	27,9	78,9
			O0071e1		175,9	83,5
			O0071m1		207	117,5
Pichincha	<i>Neonectria radiculicola</i>	P0116	P0116d1	6,5	10,7	11,6
			P0116e1		22,3	106,3
			P0116m1		639	100,8
Orellana	<i>Pleospora</i> sp.	O0130	O0130d1	6,5	14,4	60,6
			O0130e1		78,9	102,5
			O0130m1		213	113,7
Orellana	Hipocreales	O0156	O0156d1	4,5	137,3	77,2
			O01156e1		61,5	26,9
			O0156m1		243	4,3
Guayas	<i>Xylaria feejeensis</i>	O0165	G0165d1	4,5	44,4	3,8
			G0165e1		67,9	36,5
			G0165m1		923,1	26,2

Tabla 1. Características de extractos orgánicos obtenidos de hongos endófitos de la CEQCA. Para cada extracto se presenta pH, peso (mg) y el porcentaje de reducción del reactivo alamarBlue® en las pruebas contra *Batrachochytrium dendrobatidis* por microdilución colorimétrica (Continuación...)

Provincia	Identificación	Código Endófito	Código del Extracto CEQCA ^a	pH Extracción	Peso del Extracto (mg)	% AB reducido
Orellana	<i>Penicillium radicum</i>	O0185	O0185d1	2,5	23,6	15,5
			O0185e1		49,6	7,6
			O0185m1		930	99,6
Pichincha	Sp. 1	P0211	P0211d1	5	37	22,3
			P0211e1		34	6,5
			P0211m1		1000	111,3
Pichincha	Sp. 2	P0212	P0212d1	8	29,9	37,9
			P0212e1		46,6	2,2
			P0212m1		152	109,1
Orellana	Sp. 3	O0583	O0583d1	7	19,6	2,5
			O0583e1		40,6	6,2
			O0583m1		109,5	38,8
Orellana	Sp. 4	O0666	O0666d1	5,5	5,2	2,2
			O0666e1		15,9	6,2
			O0666m1		751,2	12,9
Guayas	Pleisporales	G0685	G0685d1	4,5	32,3	23,7
			G0685e1		90	40,6
			G0685m1		200	30,5

Tabla 1. Características de extractos orgánicos obtenidos de hongos endófitos de la CEQCA. Para cada extracto se presenta pH, peso (mg) y el porcentaje de reducción del reactivo alamarBlue® en las pruebas contra *Batrachochytrium dendrobatidis* por microdilución colorimétrica (Continuación...)

Provincia	Identificación	Código Endófito	Código del Extracto CEQCA ^a	pH Extracción	Peso del Extracto (mg)	% AB reducido
Guayas	<i>Corynespora</i> sp.	G0686	G0686d1	7,5	12,5	8,9
			G0686e1		15,9	4
			G0686m1		184	23,9
Pichincha	<i>Fusarium</i> <i>Oxysporium</i>	P0688	P0688d1	5,5	64	10,6
			P0688e1		100	2,4
			P0688m1		1600	49
Orellana	Sp. 5	O0751	O0751d1	7	36,2	2
			O0751e1		54	9
			O0751m1		305	115,8
Orellana	Sp. 6	O0764	O0764d1	5,5	23,1	27,9
			O0764e1		37,8	4
			O0764m1		900	45,7
Guayas	Sp. 7	G0795	G0795d1	5	40,4	21,2
			G0795e1		209	69,9
			G0795m1		441	9
Orellana	<i>Fusarium proliferatum</i>	O0808	O0808d1	7,5	36,2	25,5
			O0808e1		87	20
			O0808m1		223	37

Tabla 1. Características de extractos orgánicos obtenidos de hongos endófitos de la CEQCA. Para cada extracto se presenta pH, peso (mg) y el porcentaje de reducción del reactivo alamarBlue® en las pruebas contra *Batrachochytrium dendrobatidis* por microdilución colorimétrica (Continuación).

Provincia	Identificación	Código Endófito	Código del Extracto CEQCA ^a	pH Extracción	Peso del Extracto (mg)	% AB reducido
Orellana	<i>Neonectria westlandica</i>	O0810	O0810d1	6	39	34,6
			O0810e1		81	108,1,
			O0810m1		215	38,9
Pichincha	Sordariomycetes	P0947	P0947d1	7	33	79,9
			P0947e1		44	74,6
			P0947m1		200	> 50
Orellana	<i>Fusarium</i> sp.	O0964	O0964d1	8	38	2,5
			O0964e1		42,5	5,8
			O0964m1		500	15
Orellana	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	O2107	O2107d1	7	80	88,3
			O2107e1		38	3,7
			O2107m1		1100	49,6

^a Las abreviaturas al final de los códigos de los extractos orgánicos, indican el solvente de extracción: diclorometano (d1), etil acetato (e1) y metanol (m1).

Tabla 2. Estandarización de la metodología para evaluar la actividad antifúngica de extractos de hongos endófitos de la CEQCA mediante microdilución colorimétrica. Se detallan los reactivos y volúmenes que se utilizaron para: controles, los parámetros que se estandarizaron (volumen de metanol, determinación temporal de la fase de crecimiento exponencial de *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), tiempo de incubación del reactivo alamarBlue®). En todos los ensayos se utilizaron 4 controles, dos controles encargados de monitorear el crecimiento del hongo (positivo y negativo) y dos controles que miden el comportamiento del tinte (alamarBlue® oxidado y alamarBlue® reducido) (AbD Serotec® 2007).

Tipo de pocillo	Medio TGhL (µl)	<i>Bd</i> (µl) ^a	Metanol (µl)	alamarBlue® (µl)
Control alamarBlue® oxidado	100	0	0	10
Control Negativo	110	0	0	0
Control alamarBlue® reducido	100	0	0	10
Control Positivo	50	50	0	10
Estandarización de concentración de metanol	30-47 ^b	50	20-3 ^b	10 ^c
Estandarización de determinación temporal de la fase de crecimiento exponencial de <i>Bd</i>	46,2	55	8,8	0
Estandarización de tiempo de incubación de AB	42	50	8	10 ^d
Relación porcentaje de reducción de alamarBlue® Vs Viabilidad de zoosporas de <i>Bd</i> .	0	100-0 ^e	0	10

^a Concentración de 1×10^6 zoosporas $\cdot \text{ml}^{-1}$ de *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*).

^b Siete concentraciones de metanol resultaron al colocar (20, 15, 13, 10, 8, 5 y 3) µl de metanol aforados a 50 µl de medio TGhL.

^c Se aplicó al inicio del ensayo.

^d Se aplicó a las 96h del ensayo.

^e Se utilizaron volúmenes de *Bd* vivo de (100, 75, 50, 25, 0) µl, cada volumen aforado a 100 µl con *Bd* muerto de (0, 25, 50, 100) µl, respectivamente.

Tabla 3. Endófitos de la CEQCA seleccionados para las pruebas de inhibición de *Bd*. En ensayos previos se determinó que poseen compuestos orgánicos volátiles (VOCs).

Código CEQCA	Provincia	Endófito			
		Phylum	Orden	Genero	Especie
G0003	Guayas				
O0224	Orellana	Ascomycota	Xylariaceae	<i>Muscodor</i>	<i>vitigenus</i>
O1100	Orellana				
M1291	Manabí				

Tabla 4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF).

Código Extracto CEQCA	Solvente	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMF ($\mu\text{g/ml}$)
O0751d1	MeOH	100	100
O0964d1	MeOH	6,25	< 1,6
O0212e1	MeOH	50	50
O0751d1	SB	100	100
O0964d1	SB	25	6,25
O0212e1	SB	200	200

Tabla 5. Comparación de bioactividad antifúngica: microdilución colorimétrica, difusión con disco y difusión en agar en *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Donde, (1) Efecto Fungicida sobre *Bd*, (2) Efecto Fungistático sobre *Bd* y (3) Sin Efecto Antifúngico sobre *Bd*

Código del Extracto CEQCA	Microdilución Colorimétrica		Difusión con Disco		Difusión en Agar	
	Actividad	% Reducción de alamarBlue®	Actividad	Zona Inhibitoria (mm)	Actividad	Zona Inhibitoria (mm)
O0751d1	1	2	3	0	3	0
O0964d1	1	2,5	2	11	2	15
O0212e1	1	2,2	3	0	3	0

6. GUÍA DE AUTOR

Instrucciones Generales de Publicación a los Autores

Latin American Journal of Aquatic Research - LAJAR es la continuación de la revista *Investigaciones Marinas* publicada desde 1970 por la Escuela de Ciencias del Mar, Facultad de Recursos Naturales de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Esta revista publica artículos originales de investigación, notas científicas y revisiones, en Español o Inglés, en ciencia y tecnología acuática, derivadas de investigaciones realizadas en aguas continentales y marinas de Latinoamérica. La decisión de aceptación de un trabajo se efectuará considerando la opinión de evaluadores anónimos. Posteriormente, los manuscritos serán sometidos a un proceso de evaluación editorial, que se reserva el derecho de introducir los cambios necesarios para mantener los estándares editoriales.

Dirección del Editor Jefe

Latin American Journal of Aquatic Research

Escuela de Ciencias del Mar

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

P.O. Box 1020, Valparaíso, Chile

Teléfono: (56-32) 227-4276. Fax: (56-32) 227-4206

E-mail: lajar@pucv.cl

RECEPCIÓN DE LOS DOCUMENTOS

Los autores deben enviar sus trabajos electrónicamente a <http://www.rljajar.equipu.cl/index.php/rljajar> en formato **Microsoft Word**, escrito a espacio y medio, conteniendo tablas y figuras. Una vez que el trabajo sea aceptado, los autores

deben enviar el texto definitivo en Word, las Tablas en Word o Excel y las Figuras en Corel Draw o Surfer, con sus respectivas leyendas en Español e Inglés en archivos independientes.

Los autores deberán sugerir a los menos tres potenciales evaluadores de reconocida competencia (**nombre, dirección, e-mail**). Los manuscritos deben ser escritos en **Español** o **Inglés**, utilizando **Times New Roman 12 pt**. La organización de los documentos debe seguir el siguiente orden:

Título:

Breve y descriptivo, escrito en inglés o español. Además, indicar un título resumido no mayor de 50 caracteres, para el encabezamiento de las páginas.

Autores:

Indicar nombre, primer apellido, institución, dirección y correo electrónico.

Resumen:

En español e inglés y con un máximo de 250 palabras, que indique los principales resultados o descubrimientos presentados en el texto.

Palabras clave:

Agregar un máximo de seis palabras clave en orden de importancia.

- Introducción
- Materiales y Métodos

- Resultados
- Discusión
- Conclusiones (opcional)
- Agradecimientos

Referencias:

Indicar solamente los trabajos mencionados en el texto, ordenados alfabéticamente por el apellido del primer autor. La inicial del nombre y apellido de los autores se escribirán en mayúsculas-minúsculas. Si la referencia tiene más de un autor, a partir del segundo, la inicial del nombre precederá al apellido y los autores irán separados por coma.

a) Las referencias de artículos deben seguir el orden siguiente: autor(es), año de publicación, título del artículo, nombre abreviado de la revista (Ver: Journal Title Abbreviations), volumen y número entre paréntesis, primera y última página.

Coelho, V., R.A. Cooper & S. Rodrigues. 2000. Burrow morphology and behaviour of the mud shrimp *Upogebia omissa* (Decapoda, Thalassinidea, Upogebiidae). Mar. Ecol. Progr. Ser., 200: 229-240

b) Las referencias de libros deben indicar: autor(es), año de publicación, título del libro, editorial, ciudad, páginas.

Thurman, H. & A. Trujillo. 2002. Essentials of oceanography. Prentice Hall, New Jersey, 524 pp.

c) Las referencias de artículos publicados en libros deben señalar: autor(es), año de publicación, título del artículo, editor(es), nombre del libro, editorial, ciudad, páginas.

Brummet, R.E. & B.A. Costa-Pierce. 2002. Village-based aquaculture ecosystems as a model for sustainable aquaculture development in Sub-Saharan Africa. In: B. Costa-Pierce (ed.). Ecological aquaculture: evolution of the blue revolution. Blackwell Science, Oxford, pp. 145-160.

d) Las referencias de artículos publicados en Internet deben señalar: autor(es), año de publicación, título del artículo, sitio web, fecha de revisión.

Walker, J.R. 1997. MLA-Style citations of Internet sources. [<http://www.cas.usf.edu/english/walker/janice.html>]. Revisado: 24 Enero 2008.

e) Las referencias de artículos o libros publicados en CD-ROM deben señalar: autor(es), año de publicación, (CD-Rom), título del artículo o libro, editorial, ciudad.

Retamal, M.A. 2000. (CD-ROM). Decápodos de Chile. ETI-Universidad de Concepción. Springer-Verlag, Berlin.

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN - PREPARACIÓN DEL DOCUMENTO

- 1 Los trabajos, en lo posible, no deben exceder las 30 páginas, incluidas tablas y figuras, cuya ubicación debe indicarse en el margen de las páginas del texto.
- 2 Las unidades deben expresarse de acuerdo al Sistema Internacional de Unidades. Si es necesario, podrán utilizarse otras, cuyo significado debe ser indicado en la primera oportunidad en que se utilicen.
- 3 Las referencias bibliográficas deben ordenarse cronológicamente indicando el apellido del autor y el año de publicación, según sea un autor, dos autores, más de dos autores o varios trabajos de un autor en un mismo año (Muñoz et al., 2002; Alvarez, 2004; Johnson & Smith, 2004; Palmer, 2006a, 2006b).
- 4 En las citas solo se debe considerar trabajos publicados o en prensa. En este último caso, en las referencias indique el nombre del autor(es), el título y la revista, seguida de las palabras (en prensa). Las comunicaciones personales se citarán sólo en el texto como sigue (autor, com. pers.). Ejemplo (J. Smith, com. pers.).

INSTRUCCIONES PARA FIGURAS Y TABLAS

- 1 Los gráficos, mapas, esquemas, dibujos o fotografías deben denominarse figuras y en el texto se abreviarán como Fig. Las Figuras (Corel Draw, Surfer) se enumerarán en

forma correlativa con números árabes; las leyendas deben ser autoexplicativas y escritas en hoja aparte en Español. Las figuras, letras (en Arial Narrow) y símbolos deben ser de un tamaño que no requieran más de tres reducciones, para ajustarse a su tamaño final y asegurar que los símbolos no sean inferiores a 1,5 mm de alto. El tamaño máximo para las figuras es de 15 cm de ancho por 21 cm de largo (con la leyenda incluida). Las figuras deben ser enviadas en tamaño 1:1 y en resolución de alta calidad.

2 Las fotografías deberán ser enviadas en formato digital (JPG, TIFF O PNG) a 300 dpi, considerando un adecuado rango de tonos y contrastes.

3 Las tablas (Excel o Word) se enumerarán en forma correlativa con números árabes. Las leyendas deben autoexplicativas y escritas en Español. El encabezamiento de cada columna debe expresar claramente su contenido y unidades de medición.

REVISIONES CIENTIFICAS

Las revisiones científicas proveen una síntesis del estado del conocimiento sobre un tópico específico de investigación. La revisión contiene un resumen (máximo de 200 palabras) y palabras claves escritas en español e inglés, más una sección continua en estilo libre. El manuscrito no debe exceder de 20 páginas, incluyendo figuras y tablas.

NOTAS CIENTIFICAS

Los trabajos cortos sobre un tema específico, que describan métodos o resultados preliminares, se publicarán como Notas Científicas. Las Notas deben contener un resumen (máximo de 200 palabras) y palabras clave, escritos en español e inglés. La introducción, metodología, resultados y discusión debe ser escrita en forma continua en una sola sección, sin individualizar los subtítulos. La extensión del manuscrito será inferior a nueve páginas incluyendo las figuras y tablas.

PRUEBAS DE IMPRENTA

Las pruebas de imprenta serán enviadas a los autores para su revisión.

COSTOS DE PUBLICACIÓN

Los artículos aceptados para su publicación tienen un costo de US\$300 en moneda nacional equivalente. Este costo es independiente de su extensión, número de figuras y tablas.

La cancelación del manuscrito es prioritaria para su publicación.

LAJAR es una revista de Acceso Abierto (Open Access) y el proceso de evaluación es gratuito.

PARA GRADOS ACADEMICOS DE LICENCIADOS (TERCER NIVEL)

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL ECUADOR

DECLARACION Y AUTORIZACION

Yo, Andea Carolina Castro Cevallos, C.I. 1711712990 autora del trabajo de graduación titulado: “Efecto inhibitorio de extractos orgánicos de hongos endófitos sobre el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*”, previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de **Ciencias Exactas y Naturales**:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 02 de junio del 2016

Srta. Carolina Castro
C.I. 1711712990