



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas-Programa de Doctorado en
Ciencias Biológicas, Área Botánica

**Efecto de la radiación UV-B sobre la morfología funcional y
el perfil químico de metabolitos secundarios en hongos
aislados de la zona centro y sur de Chile**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, Área
Botánica

SOLANGE KATHERINE TORRES GALÁN
CONCEPCIÓN-CHILE
2017

Profesor Guía: José Becerra Allende
Dpto. de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

La tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, Área Botánica titulada “Efecto de la radiación UV-B sobre la morfología funcional y el perfil químico de metabolitos secundarios en hongos aislados de la zona centro y sur de Chile” de la Srta. Solange Torres Galán fue realizada en la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción y presenta como comisión evaluadora de tesis:

Dr. José Becerra Allende

Profesor Guía

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción

Dr. Goetz Palfner

Profesor Co-guía

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción

Dra. Claudia Pérez Manríquez

Profesor Co-guía

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción

Dr. Víctor Hernández Santander

Miembro Comité de Tesis

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción

Dr. Marcelo González Ortiz

Evaluador Externo

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Dr. Pablo Guerrero Martin

Director de Programa

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción



Agradecimientos

Agradezco enormemente a mi profesor guía, Dr. José Becerra por la confianza, los conocimientos y valiosos comentarios entregados, por su tiempo y dedicación otorgada a mi persona durante todos estos años y por su atención a mis dudas y/o consultas que presenté durante el desarrollo de mi tesis.

Agradezco a mi profesor co-guía, Dr. Goetz Palfner, por las veces que toqué su puerta en busca de una respuesta y me concedió su tiempo y espacio. Gracias por acercarme al mundo de los hongos y por sus sabios conocimientos en torno a éstos.

Agradezco a la Dra. Claudia Pérez por sus conocimientos en el área de la química. Gracias por las veces que solicité de su ayuda y tuvo la prestancia en todo momento.

Gracias al Dr. Víctor Hernández, por todo su tiempo dedicado en realizar sus diferentes observaciones constructivas y el análisis de diferentes puntos de vista en torno a la temática de mi tesis.

Gracias al Dr. Marcelo González, por atender todas mis dudas, por su prestancia y por permitirme formar parte de su laboratorio.

Agradecer al profesor Norbert Arnold por permitirme realizar una pasantía en el Leibniz Institute of Plant Biochemistry y realizar parte de mi tesis. Gracias por sus valiosos conocimientos en torno a la Química de los Productos Naturales.

Gracias a todos los integrantes del Laboratorio de Química de Productos Naturales, por los lazos de amistad generados y por que cada uno de ellos fue parte de mi tesis, con análisis de resultados, sugerencias y conocimientos.

Quiero agradecer a Ricardo Oliva, por todos sus conocimientos, sus consejos, por las veces que me escuchaste, por el tiempo que dedicaste en ayudarme, pero principalmente gracias por no soltar de mi mano cuando más lo necesité. Gracias por tanto amor.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, a mi abuelita, padres, hermanos y a mi sobrina adorada que forman parte de mí día a día otorgándome el apoyo y el amor hacia mi persona.

INDICE GENERAL

LISTADO DE FIGURAS	vi
LISTADO DE TABLAS.....	ix
Resumen.....	x
Abstract	xii
1. Introducción.....	1
2. Influencia de la radiación UV en hongos	2
3. Radiación UV y actividad antioxidante.....	4
4. Zona de estudio.....	6
5. Problemática de estudio	7
6. Hipótesis.....	9
7. Objetivo general.....	9
Capítulo I: Influencia de diferentes dosis de radiación UV-B sobre el crecimiento micelial	10
1. Introducción.....	10
2. Metodología.....	12
3. Resultados	16
4. Discusión.....	29
5. Bibliografía.....	32
Capítulo II. Efecto de la radiación UV-B sobre la morfología funcional durante el crecimiento micelial	35
1. Introducción.....	35
2. Metodología.....	37
3. Resultados	39
4. Discusión.....	48
5. Bibliografía.....	51
Capítulo III. Evaluación de los cambios en el perfil de metabolitos con actividad antioxidante en hongos expuestos a la radiación UV-B.	55
1. Introducción.....	55
2. Metodología.....	55
3. Resultados	61
4. Discusión.....	71
5. Bibliografía.....	74
Capítulo IV.....	78
Changes in secondary metabolites profiles and biological activity of the fresh fruiting bodies of <i>Stereum hirsutum</i> exposed to high-dose UV-B radiation	78

1. Introduction	79
2. Materials and Methods	80
3. Results and Discussion.....	82
4. Conclusion.....	87
5. References	87
Capítulo V	90
Steroidal composition and cytotoxic activity from fruiting body of <i>Cortinarius xiphidipus</i>	90
1. Introduction	91
2. Materials and Methods	92
3. Results and Discussion.....	94
4. Conclusion.....	97
5. References	98
DISCUSIÓN GENERAL	100
CONCLUSIONES GENERALES	103
REFERENCIAS	1035



LISTADO DE FIGURAS

CAPITULO I

- Figura 1: Material biológico recolectado (A la izquierda). Mapa que señala los tres sitios de recolección del material biológico correspondientes a la zona centro sur de Chile (A la derecha)..... 13
- Figura 2: Datos fotométricos de tubo fluorescente UV-B TL 20W/12 RS SLV con emisión en el espectro UV (290 a 315 nm). 14
- Figura 3: Macro y micromorfología de *Armillaria sparrei*. a) Basidiomas, b) Esporas, c) Cultivo *in vitro* Rizomorfos, d) Microscopía óptica de las hifas, e) Microscopía electrónica de barrido (SEM) que determina el ancho de las hifas y f) diámetro de las hifas que constituyen el cordón micelial (rizomorfo). 18
- Figura 4: Macro y micromorfología de *Cordyceps cuncunae*. a) Estroma, b) Esporas, c) Cultivo *in vitro* Macroconidióforos, d) Microscopía óptica, e) Microscopía electrónica de barrido (SEM) que determina el ancho de las hifas y f) diámetro de los conidios. 19
- Figura 5: Macro y micromorfología de *Serpula himantioides*. a) Basidioma resupinado, b) Esporas c) Cultivo micelial *in vitro*, d) Microscopía óptica de las hifas, e) Microscopía electrónica de barrido (SEM) que determina el ancho de las hifas. 21
- Figura 6: Efecto de diferentes dosis de radiación UV-B sobre la velocidad de crecimiento (mm día^{-1}) de diferentes especies fúngicas. Para una misma especie, letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, $P < 0,05$). Los datos representan la media \pm S.D de tres réplicas por tratamiento. 25
- Figura 7: Porcentaje de inhibición del crecimiento para *Armillaria sparrei*, *Cordyceps cuncunae* y *Serpula himantioides* expuestas a cuatro diferentes dosis de radiación UV-B en el día 5. Datos fueron analizados por ANOVA de dos vías (Tukey, $P < 0,05$). Los datos representan la media \pm S.D de tres réplicas por tratamiento. 26
- Figura 8: Porcentaje de inhibición del crecimiento para *Armillaria sparrei*, *Cordyceps cuncunae* y *Serpula himantioides* expuestas a cuatro diferentes dosis de radiación UV-B en el día 15. Datos fueron analizados por ANOVA de dos vías (Tukey, $P < 0,05$). Los datos representan la media \pm S.D de tres réplicas por tratamiento. 27
- Figura 9: Porcentaje de inhibición del crecimiento para *Armillaria sparrei*, *Cordyceps cuncunae* y *Serpula himantioides* expuestas a cuatro diferentes dosis de radiación UV-B en el día 25. Datos fueron analizados por ANOVA de dos vías (Tukey, $P < 0,05$). Los datos representan la media \pm S.D de tres réplicas por tratamiento. 28

CAPITULO II

- Figura 1: Cambios morfológicos en el número y longitud de rizomorfos en cultivos miceliales de *Armillaria sparrei* a los 30 días de incubación de a) Cultivo sin irradiar, b) Cultivo irradiado a una dosis de 0,09 mW/cm² y c) Cultivo irradiado a una dosis de 0,12 mW/cm². Los principales cambios detectados durante el crecimiento tienen relación al número y longitud de los rizomorfos..... 39
- Figura 2: Número promedio de rizomorfos observados bajo diferentes dosis de radiación UV-B. Los cultivos *in vitro* sin irradiar son considerados como control. Los datos representan la media ± S.D de tres réplicas por tratamiento. 40
- Figura 3: Longitud promedio de rizomorfos observados bajo diferentes dosis de radiación UV-B. Los cultivos *in vitro* sin irradiar son considerados como control. Los datos representan la media ± S.D de tres réplicas por tratamiento. 40
- Figura 4: Cambios morfológicos en cultivos miceliales de *Cordyceps cuncunae* a los 30 días de incubación de a) Cultivo sin irradiar, b) Cultivo irradiado a una dosis de 0,09 mW/cm² y c) Cultivo irradiado a una dosis de 0,12 mW/cm². Los principales cambios detectados durante el crecimiento tienen relación al número y longitud de los coremios..... 41
- Figura 5: Número de macrononidióforos formados en cultivos miceliales de *Cordyceps cuncunae* a los 25 días de exposición a los diferentes tratamientos. Los datos representan la media ± S.D de tres réplicas por tratamiento..... 42
- Figura 6: Longitud de macrononidióforos formados en cultivos miceliales de *Cordyceps cuncunae* a los 25 días de exposición a los diferentes tratamientos. Los datos representan la media ± S.D de tres réplicas por tratamiento..... 42
- Figura 7: Cambios en la pigmentación desarrollada en cultivos *in vitro* de *Serpula himantioides*. a) Cultivo sin irradiar, b) Cultivo irradiado a una dosis de 0,12 mW/cm². Los principales cambios detectados durante el crecimiento tienen relación a la abundancia del pigmento sintetizado bajo los diferentes tratamientos. 43
- Figura 8: Microscopía electrónica de barrido de conidios obtenidos de *Cordyceps cuncunae*. a) y b) Conidios sin irradiar (Control), c) y d) Conidios bajo condiciones de radiación UV-B (0,12 mW/cm²). 44
- Figura 9: Cortes transversales de coremios obtenidos de cultivos *in vitro* de *Cordyceps cuncunae* a) y b) Control (sin irradiar), c) y d) Radiación UV-B (0,12 mW/cm²). 45
- Figura 10: Histogramas obtenidos de cortes transversales de macroconidióforos de cultivos *in vitro* de *Cordyceps cuncunae* a) sin irradiar y b) irradiados a una dosis de 0,12 mW/cm²..... 45
- Figura 11: Cortes transversales de hifas obtenidas de cultivos *in vitro* de *Serpula himantioides* bajo diferentes tratamientos de radiación UV-B. a) y b) Control (sin irradiar), c) Radiación UV-B (0,12 mW/cm²), d) Radiación UV-B (0,09 mW/cm²), e) Radiación UV-B (0,06 mW/cm²) y f) Radiación UV-B (0,03 mW/cm²). Diferentes patrones de distribución del pigmento se observan a incrementadas dosis de radiación UV-B. 46

Figura 12: Histogramas obtenidos de cortes transversales del micelio de cultivos *in vitro* de *Serpula himantioides* a) sin irradiar y b) irradiados a una dosis de 0,12 mW/cm². 47

CAPITULO III

Figura 1: Estructura de los principales compuestos pirrólicos detectados bajo cultivos *in vitro*. 62

Figura 2: Cromatograma LC-MS de extracto total obtenido en medio de cultivo de *Serpula himantioides*. 63

Figura 3: Espectro de masas de los pigmentos detectados en cultivos de *Serpula himantioides*. a) m/z del Ácido xerocómico y b) m/z del Ácido variegático. 64

Figura 4: Caracterización de pigmentos por cromatografía capa fina. A) TLC de extractos totales obtenidos de *Serpula himantioides* bajo cultivos *in vitro* irradiados (+UVB) y sin irradiar (-UVB), b) Ácido xerocómico obtenido de cultivo sin irradiar y c) Ácido xerocómico obtenido de cultivos irradiados. 65

Figura 5: Cromatograma HPLC-DAD de fracción conteniendo pigmentos: Ácido variegático (tR: 7,86 min) y Ácido xerocómico (tR: 10,48 min). 66

Figura 6: Espectro de absorción de las fracciones obtenidas de cultivos irradiados. A) Ácido variegático (7.874 min) y b) Ácido xerocómico (10,491 min). 67

CAPITULO IV

Figure 1: GC-MS steroid profile of *S. hirsutum* at different UV radiation times. 82

Figure 2 : Sterol structures present in the acetonic extract before UV-B radiation. 83

Figure 3: DPPH scavenging assay of acetonic extract of *S. hirsutum* at different UV radiation times. 84

Figure 4: GC-MS profile of *S. hirsutum* at different UV radiation times. a) Fatty acids trace at 6 and 24 h of UV-B radiation and b) Phenolic compounds trace at 48 h of UV-B radiation. 86

CAPITULO V

Figure 1: Cytotoxic effect of (22E)-ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one on tumor cell lines. Cells Neuro-2A, MCF7, Saos-2, and LNCap/C42 were cultured in plates of 96 wells and incubated for 24 hours with different concentrations of the compound (0.6 µg/mL to 118 µg/mL). Cell survival was measured with MTT. Results are presented as cell survival compared to the control group (non-treated cells). 96

LISTADO DE TABLAS

CAPITULO I

Tabla 1: Registro de especies fúngicas utilizadas para estudios *in vitro*..... 16

Tabla 2: Efecto de las diferentes dosis de radiación UV-B sobre el crecimiento (mm) de *Armillaria sparrei* en el tiempo bajo condiciones *in vitro*. 22

Tabla 3: Efecto de las diferentes dosis de radiación UV-B sobre el crecimiento (mm) de *Cordyceps cuncunae* en el tiempo bajo condiciones *in vitro*..... 23

Tabla 4: Efecto de las diferentes dosis de radiación UV-B sobre el crecimiento (mm) de *Serpula himantioides* en el tiempo bajo condiciones *in vitro*..... 24

CAPITULO III

Tabla 1: Principales compuestos pirrólicos detectados en cultivo y micelio bajo los diferentes tratamientos. 62

Tabla 2: Propiedades de derivados del ácido pulvínico en Boletales..... 65

Tabla 3: Pigmentos detectados en cultivos *in vitro* de *Serpula himantioides*..... 68

Tabla 4: Actividad antioxidante y determinación de fenoles en extractos obtenidos del medio de cultivo. 69

Tabla 5: Actividad antioxidante y determinación de fenoles en extractos obtenidos del micelio. 70

Tabla 6: Actividad antioxidante del pigmento Ácido xerocómico. 70

CAPITULO IV

Table 1: IC₅₀ values of *S. hirsutum* extract at different UV-B radiation times to scavenge DPPH radical. 85

Table 2: Antibacterial activity of acetonic extracts of *S. hirsutum* at different UV-B radiation times. . 87

CAPITULO V

Table 1: Main compounds identified by GC-MS at different retention times. 95

Table 2: Cytotoxic effect of ergostanone against four tumor cell lines. 97

Resumen

El agotamiento de la capa de ozono provoca que altas intensidades de radiación UV-B estén llegando a la superficie terrestre, siendo los organismos sésiles los más afectados al estar expuestos a la radiación ultravioleta (UV), debido que afecta su crecimiento, desarrollo y reproducción. Para aminorar los daños que pueda provocar la radiación UV, estos organismos han desarrollado diferentes respuestas y se ha vuelto un tema de interés el estudiar el tipo de respuesta generada al exponer un organismo a la radiación UV tanto en condiciones de cultivo *in vitro* como también sobre los basidiomas de diferentes especies fúngicas. Referente a esta temática, los hongos han sido poco estudiados, aún conociéndose las diferentes respuestas generadas en especies de hongos filamentosos, ya sea en cambios morfo-anatómicos de la estructura hifal y/o en la síntesis de compuestos fotoprotectores. En los basidiomas de hongos comestibles, se ha estudiado los efectos de la radiación UV-B sobre el cambio en la composición de ácidos grasos y la conversión de ergosterol en vitamina D₂.

Como efecto indirecto se ha señalado que la radiación UV genera estrés oxidativo lo que activaría el sistema defensivo antioxidante en los organismos expuestos a la radiación UV, todo esto conllevaría a sintetizar compuestos fotoprotectores con actividad antioxidante.

El presente estudio tiene como objetivo principal estudiar en diferentes especies fúngicas el efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento micelial y síntesis de metabolitos fotoprotectores con actividad antioxidante bajo condiciones *in vitro* así como también evaluar las variaciones en la composición química de los basidiomas expuestos a estrés abiótico y la actividad biológica asociado a ellos. Para ello, tres especies de hongos fueron analizados bajo la influencia de la radiación UV-B. Dos de ellas, *Armillaria sparrei* (Sing.) Herink y *Cordyceps cuncunae* Palfner fueron aislados de la zona sur de Chile, y *Serpula himantioides* (Fr) P. Karst. fue aislada de la zona central. Para las tres especies en estudio, no existen trabajos que señalen el efecto de la radiación UV en el crecimiento de estos hongos, así como la síntesis de los metabolitos secundarios con propiedad antioxidante. Por otro lado, basidiomas de *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. y *Cortinarius xiphidipus* M. M. Moser & E. Horak fueron evaluados en relación a los cambios en la composición de ácidos grasos y esteroides y su actividad biológica.

Para los estudios bajo condiciones *in vitro*, las especies fueron cultivadas en medio sólido para la determinación de la velocidad (mm día⁻¹) y porcentaje de inhibición del crecimiento junto

con la detección de cambios morfo-anatómicos que experimentaron durante el periodo de exposición a la radiación UV-B. Este análisis se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) para estudios de ultraestructura y por microscopía electrónica de barrido (SEM) para la caracterización morfológica de las hifas. A partir de cultivos en medio líquido, se obtuvieron los extractos totales para la detección de los compuestos UV-B protectores con actividad antioxidante de los hongos expuestos a la radiación UV-B y sin irradiar. El cultivo líquido fue filtrado para separar micelio del medio de cultivo y ambas partes se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (LC-MS).

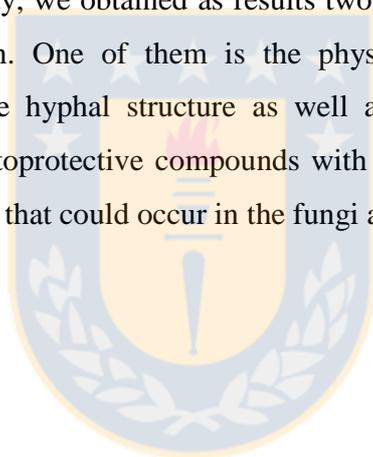
Los extractos conteniendo los compuestos de interés fueron fraccionados por cromatografía en columna (Sephadex LH-20) y analizados por cromatografía en capa fina (TLC). Este fraccionamiento permitió obtener los pigmentos fotoprotectores con actividad antioxidante. Posteriormente, las fracciones fueron analizadas por HPLC-DAD.

Para la evaluación de la actividad antioxidante, se realizaron dos ensayos cuantitativos (DPPH, ABTS) y el método de determinación de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu). En el presente estudio, se obtuvo como resultados dos tipos de respuestas en las especies que son expuestas a la radiación UV. Una de ellas es la respuesta de tipo física que incluye cambios morfológicos en la estructura hifal así como también una respuesta del tipo química que involucra la síntesis de compuestos fotoprotectores con actividad antioxidante. Ambos aspectos permitieron predecir los cambios que podrían ocurrir en los hongos frente a incrementos de radiación UV.

Abstract

Depletion of the ozone layer causes high intensities of UV-B radiation to reach the Earth's surface, with sessile organisms being most affected by exposure to ultraviolet (UV) radiation, as it affects their growth, development and reproduction. In order to lessen the damage caused by UV radiation, these organisms have developed different responses and it has become a matter of interest to study the type of response generated by exposing an organism to UV radiation both in in vitro culture conditions. The basidiomas of different fungal species. Regarding this theme, the fungi have been little studied, even though the different responses generated in species of filamentous fungi are known, either in morpho-anatomical changes of the hyphal structure and / or in the synthesis of photoprotective compounds. In basidiomas of edible fungi, the effects of UV-B radiation on the change in fatty acid composition and the conversion of ergosterol to vitamin D₂ have been studied. As an indirect effect it has been pointed out that UV radiation generates oxidative stress which would activate the antioxidant defense system in organisms exposed to UV radiation, all this would entail the synthesis of photoprotective compounds with antioxidant activity. The present study has as main objective to study in different fungal species the effect of UV-B radiation on mycelial growth and synthesis of photoprotective metabolites with antioxidant activity under in vitro conditions as well as to evaluate the variations in the chemical composition of exposed basidiomas to abiotic stress and the biological activity associated with them. For this, three species of fungi were analyzed under the influence of UV-B radiation. Two of them, *Armillaria sparrei* (Sing.) Herink and *Cordyceps cuncunae* Palfner were isolated from southern Chile, and *Serpula himantioides* (Fr) P. Karst. was isolated from the central zone. For the three species under study, there are no studies that indicate the effect of UV radiation on the growth of these fungi, as well as the synthesis of secondary metabolites with antioxidant properties. On the other hand, basidiomas of *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. and *Cortinarius xiphidipus* M. Moser & E. Horak were evaluated for changes in the composition of fatty acids and sterols and their biological activity. For studies under in vitro conditions, the species were cultured in solid medium for the determination of the rate (mm day⁻¹) and percentage of growth inhibition together with the detection of morpho-anatomical changes that they experienced during the period of exposure to The UV-B radiation. This analysis was performed by transmission electron microscopy (TEM) for ultrastructural studies and by scanning electron microscopy

(SEM) for the morphological characterization of hyphae. From the cultures in liquid medium, the total extracts were obtained for the detection of UV-B protecting compounds with antioxidant activity of the fungi exposed to UV-B radiation and without irradiation. The liquid culture was filtered to separate mycelium from the culture medium and both parts were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography coupled to mass spectrometer (LC-MS). The extracts containing the compounds of interest were fractionated by column chromatography (Sephadex LH-20) and analyzed by thin layer chromatography (TLC). This fractionation allowed to obtain the photoprotective pigments with antioxidant activity. Subsequently, the fractions were analyzed by HPLC-DAD. For the evaluation of the antioxidant activity, two quantitative tests (DPPH, ABTS) and the method of determination of total polyphenols (Folin-Ciocalteu) were performed. In the present study, we obtained as results two types of responses in species that are exposed to UV radiation. One of them is the physical type response that includes morphological changes in the hyphal structure as well as a chemical type response that involves the synthesis of photoprotective compounds with antioxidant activity. Both aspects allowed to predict the changes that could occur in the fungi against increases of UV radiation.



1. Introducción

La radiación ultravioleta es uno de los principales factores abióticos ambientales que afectan la vida en nuestro planeta al controlar muchas de las funciones que se llevan a cabo dentro de un ecosistema ya sean estos acuáticos o terrestres. La radiación UV se divide en tres bandas, según su longitud de onda: UV-C (200–280 nm), UV-B (280–315 nm) y UV-A (315–400 nm). Pese a que la radiación UV-B representa sólo una pequeña proporción del total de la radiación solar que llega a la superficie terrestre, se trata de un rango de radiación altamente activa en términos biológicos, ya que los fotones de estas longitudes de onda son absorbidos por macromoléculas biológicamente importantes, incluyendo a los ácidos nucleicos y proteínas, lo que ha tenido como consecuencia un creciente interés por el estudio de los efectos de la radiación UV-B que es considerada como un factor de estrés abiótico en distintos organismos (Moody et al., 1999). Las altas intensidades de radiación ultravioleta del tipo B que llega a la superficie terrestre pueden afectar a organismos fotosintéticos con una disminución en la fotosíntesis y biomasa como es en el caso de las plantas y organismos acuáticos. Por otro lado, en organismos no fotosintéticos como son los hongos se han observado cambios morfogénéticos relacionados con la inducción de la esporulación (reproducción), cambios en la morfología de las esporas y en la estructura hifal; por lo tanto, la radiación UV afecta el crecimiento, desarrollo y reproducción de estos organismos ya que muchos de ellos se exponen durante todo o en parte de su ciclo de vida a la exposición directa de la radiación solar (Paul y Gwynn-Jones, 2003), y por ende han tenido que generar diferentes respuestas frente a las fluctuaciones de la radiación solar incidente (Hugues et al., 2003). Dichas fluctuaciones son una consecuencia del agotamiento de la capa de ozono estratosférico, entre otras causas (latitud, nubosidad, albedo y altitud), que están provocando un incremento en el flujo de la radiación ultravioleta sobre la superficie terrestre (McKensie et al., 2007).

Las diferentes respuestas de los organismos que son expuestos a este tipo de estrés abiótico ha sido el centro de una amplia investigación que ha permitido evaluar sus efectos tanto en plantas (Schenke et al., 2011) como en organismos acuáticos, haciendo hincapié en que los organismos responden al estrés con alteraciones en la expresión de genes que intervienen en la síntesis de metabolitos de protección; sin embargo, el estudio de tales efectos en hongos ha

sido escaso, por lo que se debe prestar mayor atención a este grupo de organismos frente a este tema ya que son importantes componentes de los ecosistemas terrestres (Fourtouni et al., 1998) y la radiación UV puede no tener un efecto letal sobre ellos, pero si permitiría que los hongos desarrollen diferentes estrategias de protección para su sobrevivencia.

2. Influencia de la radiación UV en hongos

2.1 Respuesta física

De los principales estudios que evalúan los efectos de la radiación UV, cabe destacar a hongos filamentosos, basándose estos estudios a la exposición directa de la radiación durante el crecimiento micelial bajo condiciones *in vitro*. Los primeros estudios basados en los efectos en el crecimiento y desarrollo hifal de hongos filamentosos al ser expuestos a niveles conocidos de radiación ultravioleta fue reportado por Volz y Morris (1973) quienes observaron en *Trichophyton terrestre* y en *Chaetomium globosum* cambios en la morfología hifal específicamente en la sección periférica de los ápices de hifas o en el área activa del crecimiento y desarrollo de estas. Variaciones morfológicas tales como paredes hifales irregulares e hifas onduladas fueron observadas. Por otro lado, el efecto de la radiación UV en el crecimiento micelial y en la formación de esclerocios en *Sclerotinia sclerotiorum* fue reportado por Nagy y Fischl (2002). Los esclerocios son considerados un estado viable en reposo por muchos hongos en ausencia de las condiciones que favorecen su crecimiento (Coley-Smith y Cooke, 1971). Los resultados obtenidos conducen a que la formación de esclerocios no se vio afectada frente a la radiación UV, pero si hubo una disminución en el crecimiento micelial como también fue reportado por Willocquet et al. (1996). De estos resultados se puede deducir que el hongo reduce su crecimiento para lograr una mejor respuesta frente a una condición de estrés, ya sea formando estructuras que le permitan sobrellevar esta condición o bien modificando la estructura hifal para permitir su desarrollo. Otro estudio abarcado por Fourtouni et al. (1998), quienes utilizaron un hongo fitopatógeno *Alternaria solani* expuesto a radiación UV-B indicaron que este hongo emplea una estrategia de protección más morfológica (incrementando su densidad hifal) que química (compuestos que absorben UVB).

En torno a hongos entomopatógenos, se ha evaluado el efecto dañino de la radiación UV-B sobre diferentes géneros tales como: *Metarhizium*, *Beauveria* y *Paecilomyces*. Braga et al.

(2002) señalaron que unas pocas horas de exposición directa a la radiación UV-B son suficientes para que la sobrevivencia de conidios disminuya a dosis incrementadas de radiación UV. Debido a esto, es de importancia conocer las respuestas generadas por hongos patógenos de insectos, ya que muchos de ellos son utilizados como importantes agentes de control biológico y frente a un aumento de radiación ultravioleta, su eficacia como bioinsecticidas disminuiría; por lo tanto, la radiación UV podría ser un factor clave para determinar las distintas respuestas que un organismo pueda presentar frente a esta situación de estrés y de cuáles serían sus estrategias frente a dichas condiciones ambientales.

2.2 Respuesta química

Los estudios mencionados previamente nos entregan información relevante en torno a este tema y por tanto no deja de ser interesante realizar estudios más acabados y que no sólo contemplen mecanismos de protección física sino además química. Con respecto a esto último, una estrategia común en ciertos microorganismos en respuesta a la radiación UV, es la síntesis y acumulación de metabolitos UV-absorbentes para actuar como protectores solares (Gao y García, 2011). La presencia de compuestos fotoprotectores está muy extendida entre diferentes organismos (Oren y Gunde-Cimerman, 2007) y su presencia se ha demostrado para prevenir el fotodaño en aquellos organismos que están expuestos regularmente a altos niveles de radiación ultravioleta. En base a esto, Hessen (2002) señala que la radiación UV puede inducir la síntesis de pigmentos en hongos. Un estudio en este sentido fue llevado a cabo por Libkind et al. (2011) quienes detectaron un pigmento carotenóide, la astaxantina, sintetizado por la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. En estos microorganismos, la síntesis de carotenoides y su incremento durante la fase de crecimiento estacionario permitiría mejorar la supervivencia frente a la radiación UV-B. Otro estudio de exposición experimental a los rayos UV-B fue llevado a cabo en dos especies de levadura y los resultados indicaron que las cepas pigmentadas eran más tolerantes a la radiación (Moliné et al., 2009). Del mismo modo, la síntesis de pigmentos se observó en *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium purpurogenum*, cuya pigmentación en el agar fue desarrollada más rápidamente a dosis de radiación UV-B más altas (Moody et al., 1999). Otro tipo de pigmento que actúa como filtro solar en plantas y en los animales es la melanina, un pigmento de alto peso molecular, ubicuo en la naturaleza y muchos hongos sintetizan la melanina, confiriéndoles una ventaja de supervivencia en el

ambiente mediante la protección contra la radiación UV (Dadachova et al., 2007). Basado en lo anterior, una elevada radiación UV-B provocó la producción de melanina en *Pleospora herbarum* dentro de las 24 h de exposición (Hughes et al., 2003). De igual forma, Ulevicius et al. (2004) señalan que la tolerancia a la radiación UV puede estar relacionada con la pigmentación protegiéndolos así de la radiación solar perjudicial. Los estudios realizados permiten deducir que la síntesis de pigmentos puede ser inducida por la radiación UV lo cual podría llevar a aplicaciones a nivel industrial en la tinción de telas, algodón y lanas (Velmurugan et al., 2010).

En basidiomicetes, los primeros estudios fueron realizados por Tapani (1987), quien en presencia de radiación UV-A observó un aumento en el nivel de Adenosín monofosfato cíclico (AMPc) del cual se sugiere estar involucrado en una serie de procesos morfogénicos y de desarrollo. El aumento de AMPc es considerado uno de los primeros cambios inducidos por la luz que se ha encontrado en *Schizophyllum commune*; Desde otra perspectiva, un estudio realizado por Taupp et al. (2008) en el basidiomicete que crece sobre madera, *Nidula niveo-tomentosa*, evaluaron la respuesta al estrés frente a radiación UV-A. Dicha exposición en cultivos estimula su crecimiento y la síntesis de un compuesto fenólico aromático, cetona de la frambuesa, lo que trae consigo un incremento en la síntesis de dicho compuesto en forma concomitante con el crecimiento (biomasa). Desde entonces han sido muy escasos los estudios que conciernen a hongos lignícolas y entomopatógenos y es por esto que se hace necesaria la búsqueda de nuevos compuestos fotoprotectores a UV-B. A esto se suman antecedentes que dan cuenta de que ciertos metabolitos sintetizados bajo la radiación UV presentan actividad antioxidante (Dimitrova et al., 2013; Fuller et al., 2013).

3. Radiación UV y actividad antioxidante

Anteriormente se mencionó sobre los efectos directos que pueden ocurrir en el hongo durante su crecimiento y desarrollo; sin embargo, el impacto de la radiación UV sobre los organismos puede tener a su vez, un efecto indirecto. Distintos estudios señalan que la radiación UV induce a un estrés oxidativo junto con la activación de mecanismos de defensa (Rybus y Kubis, 2010). El estrés oxidativo es generado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) que corresponden a los subproductos de procesos metabólicos normales en las células, pero que en

condiciones inusuales como lo es la radiación, se producen en exceso provocando daño celular. Debido a esto, hay un creciente interés en la búsqueda de compuestos antioxidantes sintetizados bajo radiación, en particular en los destinados a prevenir los efectos nocivos de los radicales libres. En ambos casos, hay una preferencia por los antioxidantes de origen natural en lugar de aquellos antioxidantes aislados a partir de fuentes sintéticas (Molyneux, 2004). La actividad antioxidante frente a radiación UV sólo ha sido estudiada en plantas y organismos acuáticos en donde las enzimas antioxidantes no se ven afectadas por la radiación UV demostrándose un incremento de la actividad de las enzimas peroxidasa, superóxido dismutasa (SOD), polifenol oxidasa en plántulas irradiadas con UV-B (Ravindran et al., 2010). Esto es debido al mantenimiento del equilibrio entre la producción de los radicales libres y las defensas antioxidantes siendo ésta una condición esencial para el normal funcionamiento del organismo. Sin embargo, el estudio de compuestos con dicha propiedad ha sido determinado en muchos organismos, pero sin este factor de estrés como lo es la radiación UV. En hongos, han sido escasos los estudios en relación a la actividad antioxidante que pueda ser detectada frente a un tipo de radiación. Purwidyantri et al. (2012) utilizaron luz ultravioleta pulsada sobre cultivos miceliales de un hongo entomopatógeno, *Cordyceps militaris*, demostrando la producción de vitamina D₂, metabolitos bioactivos y actividad antioxidante. Tuhai (2011) utilizó un hongo entomopatógeno, *Paecilomyces lilacivus* para determinar una respuesta de enzimas antioxidantes bajo esta condición señalando que la radiación fue un inductor de cambios significativos en la actividad de las enzimas antioxidantes. Resultados similares se obtuvieron para *Aspergillus versicolor*, detectándose altos niveles de la enzima superóxido dismutasa (SOD) de forma concomitante a la síntesis de melanina durante el crecimiento (Tuhai 2011). A partir de estos resultados previos, resulta interesante detectar compuestos fotoprotectores frente a la radiación UV y que a su vez presenten actividad antioxidante. Dimitrova et al. (2013) evaluaron la producción de metabolitos con actividad antioxidante en una cepa antártica de *Sporobolomyces salmonicolor* AL₁. La cepa acumula sustancias fotoprotectoras (pigmentos carotenoides) como una barrera contra la radiación ultravioleta encontrándose además en este estudio actividad antioxidante en el pigmento β -caroteno. A partir de estos estudios, se desprende el interés por la búsqueda de compuestos con propiedad antioxidante en hongos aislados de zonas que están próximas al agujero del ozono antártico como lo son las regiones subantárticas de América del Sur.

4. Zona de estudio

Considerando que la zona sur de Chile está próxima al agujero de ozono y que la reducción en la capa de ozono puede generar, en ciertos períodos del día, un aumento sustancial de la cantidad de radiación UV-B se ha tornado un tema de interés para la comunidad científica poder evaluar los efectos de la radiación UV en los organismos sésiles que allí habitan ya que éstos son los que se verían más afectados (Cuadra et al., 2004; Díaz et al., 2006). Tanto estudios de campo como bajo condiciones *in vitro* de hongos de la zona centro y sur de Chile expuestos a la radiación ultravioleta no han sido considerados.

En el presente estudio, cultivos de tres especies de hongos serán analizados bajo la influencia de la radiación UV-B. Las especies se caracterizan por su crecimiento sobre distintos sustratos como tocones de madera, troncos, a los pies de árboles, sobre ramas delgadas y en las raíces. Por lo general crecen en altura y están más expuestos sobre su sustrato el cual se encuentra en proceso continuo de desintegración. Además estos hongos también pueden colonizar las partes basales de los árboles o tocones formando masas miceliales e incluso algunos, como *Armillaria sparrei*, forman cordones miceliales denominados: rizomorfos, haciendo posible que la radiación UV incida directamente sobre el micelio pudiendo afectar el crecimiento y metabolismo de estos hongos. Por otro lado, el hongo entomopatógeno del género *Cordyceps* se caracteriza por la invasión del micelio en los tejidos del huésped. En particular, *Cordyceps cuncunae* (Ascomycota, Hypocreales) fue descubierto parasitando larvas de lepidópteros nocturnos (Lepidoptera, Hepialidae) que a su vez se alimentan de las raíces de la especie arbórea *Laureliopsis philippiana* (Palfner et al. 2012).

La elección de las tres especies se realizó considerando la exposición del micelio a la radiación UV, ya que a diferencia de aquellos hongos que normalmente crecen inmersos en el sustrato y están protegidos contra la radiación UV, los hongos del presente estudio están más expuestos sobre su sustrato siendo esta la situación por la cual la radiación UV-B tiene relevancia para este tipo de hongos.

Bajo condiciones *in vitro*, las especies fúngicas serán evaluadas frente a diferentes dosis de radiación UV del tipo B. Dos de ellas, *Armillaria sparrei* (Singer) Herink (1973) y *Cordyceps cuncunae* Palfner (2012) fueron aislados de la zona sur de Chile, y *Serpula himantioides* (Fr) P. Karst. (1885) fue aislada de la zona central, específicamente en la comuna de Concepción.

Para los estudios de campo, basidiomas frescos de *Sterum hirsutum* y *Cortinarius xiphidipus* fueron aislados de la zona central y extremo sur de Chile, respectivamente.

Para las especies consideradas en el presente estudio, no existen trabajos que señalen el efecto de la radiación UV en el crecimiento de estos hongos, así como la síntesis de sus metabolitos secundarios con propiedad antioxidante. Los únicos estudios hacen referencia a la síntesis de compuestos sin la influencia de la radiación UV, por ende, los estudios reportados hasta el momento, no se han realizado frente a un factor de estrés como lo es la radiación ultravioleta, pudiéndose detectar frente a estas condiciones, compuestos fotoprotectores con actividad antioxidante.

5. Problemática de estudio

La alta incidencia de la radiación UV que llega a la zona sur de Chile, está provocando que organismos sésiles tengan que adaptarse a estas condiciones y para esto desarrollan una respuesta defensiva para sobrevivir en su entorno debido a las altas intensidades de radiación y cambios en la composición espectral que pueden afectar importantes procesos en los organismos. De los organismos sésiles, las plantas ya han sido bien estudiadas en los efectos de la radiación solar sobre su morfología y metabolismo; De hecho, el factor de estrés abiótico interfiere con el sistema de defensa de la planta como lo señala Vollenweider & Gunthardt-Goerg (2005), lo que provocó diferentes respuestas para minimizar el impacto negativo de la radiación UV sobre ellas. Se ha determinado que cuando las plantas son expuestas a radiación UV-B, se ha detectado un aumento en la producción de metabolitos secundarios (Cuadra et al., 2004) por lo que la radiación UV permitiría obtener un incremento de un determinado compuesto. Sin embargo el tema ha sido descuidado en hongos aún conociendo los efectos de la radiación UV a nivel del crecimiento, desarrollo del hongo así como también su reproducción; por otro lado, también son escasos los estudios que están relacionados a la síntesis de metabolitos secundarios bajo irradianza, salvo los señalados previamente. Debido a esto, esta investigación abordará el tema en forma más completa, en lo que se refiere a no sólo a la determinación de cambios físicos del hongo en las estructuras fúngicas sino que además detectar los compuestos fotoprotectores que son sintetizados bajo la radiación UV, ya que frente a esta condición de estrés pueden ocurrir cambios en la actividad metabólica de las especies expuestas (Ulevicius et al., 2004).. Todos estos aspectos serán

considerados durante la realización del presente estudio para predecir los cambios que podrían ocurrir frente a incrementos de radiación UV sean estos cambios de tipo físico o químicos y comprender las diferentes formas de defensa que generan los hongos frente a un cambio ambiental. Frente a todos estos antecedentes se hace necesario plantear como preguntas: ¿Cómo afecta el incremento de la radiación ultravioleta sobre el crecimiento y la morfología hifal en cultivos de hongos aislados de la zona centro y sur de Chile? ¿ Cuáles metabolitos secundarios de mayor relevancia se ven incrementados en cultivos de hongos expuestos a la radiación UV-B? ¿ Existe una variación en las respuestas específicas generadas por las especies expuestas a la radiación UV-B?



6. Hipótesis

H₁. Los hongos aislados y expuestos a un gradiente de radiación UV-B generan respuestas específicas al estrés con cambios morfo-anatómicos de la estructura hifal asociados a una disminución en el crecimiento micelial.

H₂. Los hongos frente a la exposición UV-B presentan un cambio en el perfil químico de metabolitos secundarios orientando la producción de compuestos que presentan propiedades antioxidantes.

7. Objetivo general

Estudiar en diferentes especies fúngicas respuestas a nivel morfo-funcionales y químicas frente a diferentes dosis de radiación UV-B .

7.1 Objetivos específicos

Determinar la forma y velocidad del crecimiento en hongos expuestos a la radiación UV-B.

Determinar cambios a nivel morfológico y de ultraestructura durante el crecimiento micelial en hongos expuestos a la radiación UV-B.

Evaluar los cambios en el perfil químico de metabolitos fotoprotectores con actividad antioxidante en hongos expuestos a la radiación UV-B.

Capítulo I: Influencia de diferentes dosis de radiación UV-B sobre el crecimiento micelial

1. Introducción

Uno de los cambios atmosféricos más reconocidos ha sido el debilitamiento de la capa de ozono estratosférico. Este fenómeno ha dado lugar a niveles crecientes de radiación ultravioleta del tipo B (280-315 nm) que constituye la longitud de onda más corta y más energética de la luz solar (García et al., 2015). Pese a que la región UV constituye sólo una proporción menor de la luz solar que llega a la superficie de la tierra, sus efectos son desproporcionadamente grandes, debido a que los fotones UV pueden ser absorbidos por varias biomoléculas. Este último aspecto proporciona el interés por investigar los efectos de la radiación ultravioleta (UV) en diferentes organismos. Las diferentes investigaciones en torno a este tema pueden dividirse en dos temáticas principales, siendo una de ellas la relacionada a estudiar los efectos del aumento de la radiación UV-B derivados del agotamiento de la concentración de ozono estratosférico y otra relacionada a estudiar los efectos de la radiación UV en diferentes organismos acuáticos y terrestres (Regvar et al., 2012). De este último tema, diferentes investigaciones se han centrado en evaluar los efectos de diferentes dosis de radiación UV. Los niveles naturales de radiación ultravioleta que alcanza la superficie terrestre puede provocar un daño severo en la mayoría de los organismos sésiles que están expuestos constantemente a estas condiciones ambientales y han tenido que generar respuestas adaptativas frente a una condición de estrés constante. Cada vez hay más estudios de que la radiación UV afecta a muchos organismos y la que a su vez, influye en una variedad de funciones en el ecosistema. La radiación UV-B no solo afecta a los procesos ecosistémicos, sino que además afecta a los procesos biológicos, principalmente dañando el ADN, afectando también el crecimiento y la reproducción en diferentes organismos (Díaz et al., 2010). En consecuencia, existe una necesidad de evaluar los efectos a la prolongada exposición de radiación UV-B y conocer las diferentes estrategias de adaptación que presentan los diferentes organismos. Varios estudios han demostrado los efectos nocivos de esta radiación sobre los organismos y, por lo tanto, no hay duda de los impactos que este tipo de radiación pueda tener sobre la flora y fauna (Regvar et al., 2012, Cuadra et al., 2004). En plantas, la radiación UV-B afecta sobre su productividad (reducción de la biomasa), la fotosíntesis y el crecimiento

(Cuadra et al., 2004; Conner y Neumeier 2002). Por otra parte, los hongos como componentes importantes de los ecosistemas terrestres han sido considerados en diferentes estudios relacionados a ésta temática reportándose una disminución del crecimiento en los hongos en su ambiente natural, debido a la exposición de la radiación. Esto se ha demostrado en diferentes investigaciones sobre los efectos de la radiación UV-B en el crecimiento y esporulación de muchos hongos (Fourtouni et al., 1998; Hugues et al., 2003). En algunos estudios bajo condiciones *in vitro*, la radiación UV-B no sólo redujo la germinación y esporulación en la mayoría de los hongos ensayados, sino que también el diámetro de la colonia (Fourtouni et al., 1998; Moody et al., 1999; Garcia et al., 2015).

La radiación UV es la longitud de onda más perjudicial para hongos, como lo demuestra la evaluación de espectros de acción para varias especies (Braga et al., 2015). La intensidad de los daños causados por el estrés que es generado por la exposición a la radiación UV depende de la especie y su fase de desarrollo, de sus características morfo-anatómicas, de las condiciones ambientales, así como de la dosis y duración de la exposición a la radiación UV-B. Finalmente y de acuerdo a lo señalado en literatura, la influencia de la radiación UV se ha dividido en efectos tanto directos como indirectos. Los efectos directos son aquellos en los que la respuesta de un organismo puede atribuirse a mecanismos inducidos directamente por la exposición directa a los rayos UV (Nigel y Gwynn 2003) y es uno de los efectos a tratar en este capítulo al estudiar diferentes dosis de radiación ultravioleta sobre el crecimiento de las diferentes especies fúngicas bajo condiciones *in vitro*.

El objetivo principal de este capítulo fue determinar si la tasa de crecimiento micelial en diferentes especies fúngicas se ve afectada por la exposición directa de diferentes dosis de radiación UV-B.

2. Metodología

Recolección material biológico

Las especies fúngicas recolectadas correspondieron a un hongo entomopatógeno *Cordyceps cuncunae* del orden Hypocreales; *Armillaria sparrei* del orden Agaricales y *Serpula himantioides* del orden Boletales. Los estromas de *Cordyceps cuncunae* fueron encontrados parasitando larvas de una especie de polilla (Lepidoptera, Hepialidae) en San Pablo de Tregua (Panguipulli) (39°36'31" S y 72°05'48" O). *Armillaria sparrei* fue recolectado en San Ignacio de Huinay, Región de los Lagos (Zona Austral de Chile) (42°23'3" S y 72°24'43" O) y *Serpula himantioides* fue encontrado creciendo sobre madera de conífera en descomposición en Bosque Nativo de la VIII región del Bío-bío (Zona Central de Chile) (36°50'15"S, 73°01'30"O). Para el reconocimiento del material colectado, se estudiaron las características tanto macroscópicas como microscópicas junto con bibliografía micológica especializada. El material de referencia fue depositado en el fungario de la Universidad de Concepción CONCF.

Identificación macro y microscópica

El material recolectado se analizó macroscópicamente en estado fresco tanto *in situ* como *in vitro* para la observación de los caracteres taxonómicos y obtención de fotografías digitales. Se visualizaron características tanto macroscópicas (dimensiones, color esporada, tipo de fructificación, forma píleo, formas del pie, tipo de lamelas) como microscópicas (hifas septadas, presencia de fíbulas, tamaño de las hifas) de los hongos recolectados para el reconocimiento del material biológico. Observaciones microscópicas fueron realizadas sobre material fresco y montado en agua sobre portaobjeto y se documentaron por microfotografías con un aumento de 1000X (Objetivo de inmersión) en un microscopio Leitz Dialux (Leitz, Wetzlar, Alemania), equipado con un adaptador de cámara (Palfner et al., 2012).

Identificación molecular

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de cultivos miceliales puros en medio sólido, según la metodología de CTAB (Doyle y Doyle., 1990). La región correspondiente al espaciador interno transcrito (ITS), fue amplificado por PCR con los partidores ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')-ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al, 1990), según las siguientes condiciones: 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de

(94°C 40 segundos, 60°C 40 segundos, 72°C 1 minutos) y una elongación final de 72°C 10 minutos. Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados por Macrogen (Korea). Posteriormente, se evaluó la identidad y cobertura con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank, usando el algoritmo BLAST (Altschul et al., 1997) disponible en el sitio Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.



Figura 1: Material biológico recolectado (A la izquierda). Mapa que señala los tres sitios de recolección del material biológico correspondientes a la zona centro sur de Chile (A la derecha). Fuente: Elaboración propia.

Condiciones de radiación UV-B

Para determinar los efectos de la radiación sobre el crecimiento en cultivos miceliales se utilizó un gradiente de luz UV-B sobre placas petri con medio sólido. La intensidad de UV aplicado al micelio fue determinado mediante un radiómetro y medido en $W\ m^{-2}$ y se utilizó una lámpara fluorescente UVB Broadband TL (Philips TL 20W/12 RS SLV) (Libkind et al., 2011). Las dosis crecientes de radiación UVB fueron de 0, 03-0, 06-0, 09 y 0,12 mW/cm^2 por 3 horas diarias durante 25 días. Cultivos miceliales sin radiación UV-B fueron considerados como controles (Becerra et al., 2014).

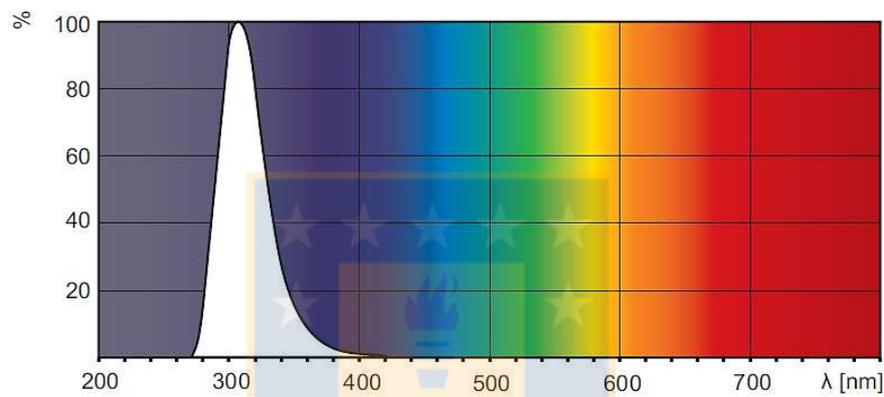


Figura 2: Datos fotométricos de tubo fluorescente UV-B TL 20W/12 RS SLV con emisión en el espectro UV (290 a 315 nm). Fuente: Royal Philips (2013).

Irradiación en cultivos *in vitro*

Se utilizó el método propuesto por Hugues et al. (2003) con algunas modificaciones para determinar los efectos de la radiación en el crecimiento sobre cultivos *in vitro*. Para las 3 especies fúngicas, agar de 4 mm de diámetro fueron puestos en el centro de la placa Petri con medio PDA hasta que se haya observado cultivo micelial con una extensión hifal de 3 mm, los cultivos miceliales fueron expuestos a radiación por 3 horas durante 25 días, tiempo en el cual el micelio de la placa control había alcanzado toda la superficie de la placa. Las placas fueron cubiertas con un film transparente para proteger las placas de la contaminación externa. Por cada periodo de irradiación terminado, las placas fueron incubadas en estufa a 28 C hasta su posterior exposición a la radiación UV.

Determinación del crecimiento

De las placas expuestas a las diferentes dosis de radiación UV-B, se determinó el crecimiento radial del micelio por el reverso de las placas en cuatro direcciones (López et al., 2013). Estas mediciones fueron realizadas día por medio mediante un pie de metro y bajo una lupa estereoscópica con luz incorporada. A partir de los datos de crecimiento (mm) obtenidos, se determinó tanto la velocidad y porcentaje de inhibición del crecimiento para las 4 dosis de radiación UV-B. Para la velocidad del crecimiento, los datos obtenidos se ajustaron a una ecuación de regresión lineal para calcular las pendientes de la curva de crecimiento. La pendiente correspondió a la velocidad media de crecimiento (mm d^{-1}) de cada especie fúngica (Vázquez et al., 2002; Pereira et al., 2007).

El porcentaje de inhibición fue calculado para los días 5, 15 y 25 de cultivos fúngicos bajo las cuatro dosis de radiación UV-B y sin irradiar (control). Para el porcentaje de inhibición de cada especie, se utilizó la fórmula descrita por Becerra et al. (2014):

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Crecimiento control} - \text{Crecimiento muestra}}{\text{Crecimiento control}} \times 100$$

Análisis estadístico

Los resultados de crecimiento obtenidos, así como la velocidad y el porcentaje de inhibición del crecimiento fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías considerando los factores tratamiento y hongo. Se utilizó el test de comparaciones múltiples de Tukey para realizar comparaciones a posteriori. Los supuestos distribucionales de normalidad y homogeneidad de varianzas se verificaron a través de los test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Se utilizó el un nivel de significancia del 0,05.

3. Resultados

Recolección material biológico

Las especies recolectadas fueron identificadas de acuerdo a sus observaciones macroscópicas, microscópicas y por análisis molecular. Las especies identificadas se detallan en la tabla 1.

Tabla 1: Registro de especies fúngicas utilizadas para estudios *in vitro*. Fuente: Elaboración propia.

Especies	Código	Sitio de colecta	Coordenadas
<i>Armillaria sparrei</i>	CONC-F 0901	San Ignacio de Huinay, X Región	42°23'3"S,72°24'43"O
	CONC-F 0204	Panguipulli, XIV Región	39°36'31"S,72°05'48"O
<i>Serpula himantioides</i>	CONC-F 1792	Campus UdeC, Concepción, VIII Región	36°50'15"S,73°01'30"O

CONC-F = Colección de Hongos Fungario Universidad de Concepción

Características macroscópicas y microscópicas de *Armillaria sparrei*

Basidiocarpos de tamaño variable (3.5 a 10 cm de diámetro), carnosos. La superficie del píleo color beige, en el centro color marrón rojizo. Estípite largo de base bulbosa, anillo poco desarrollado. Himenio con láminas adherentes. Crecen en raíces y sobre tacones de madera típicamente en racimos (Figura 3a).

De esporada blanca, esporas 5-6(7) x 4-5 µm, ovoides, lisas y hialinas (Figura 3b).

En cultivos *in vitro*, sobre PDA, se observó escaso micelio junto con la formación de cordones miceliales, tanto sumergidos como en la superficie del agar, denominados: Rizomorfos de longitud (entre 3 a 8 cm) y ancho variable (0.2 a 0.4 cm), a menudo planos, de color marrón oscuro a negro, de contextura leñosa (Figura 3c).

De las observaciones por microscopía óptica de los cultivos *in vitro* se observó un micelio con hifas ramificadas y tabicadas con septos simples y presencia de fíbulas (Figura 3d). De las observaciones por microscopía electrónica de barrido, se observaron los rizomorfos y las hifas

que constituyen el cordón micelial. Las hifas del cordón micelial presentaron un ancho que varía entre 2,37 a 2,70 μm (Figura 3e) y de diámetro entre 1,2 a 1,8 μm (Figura 3f).

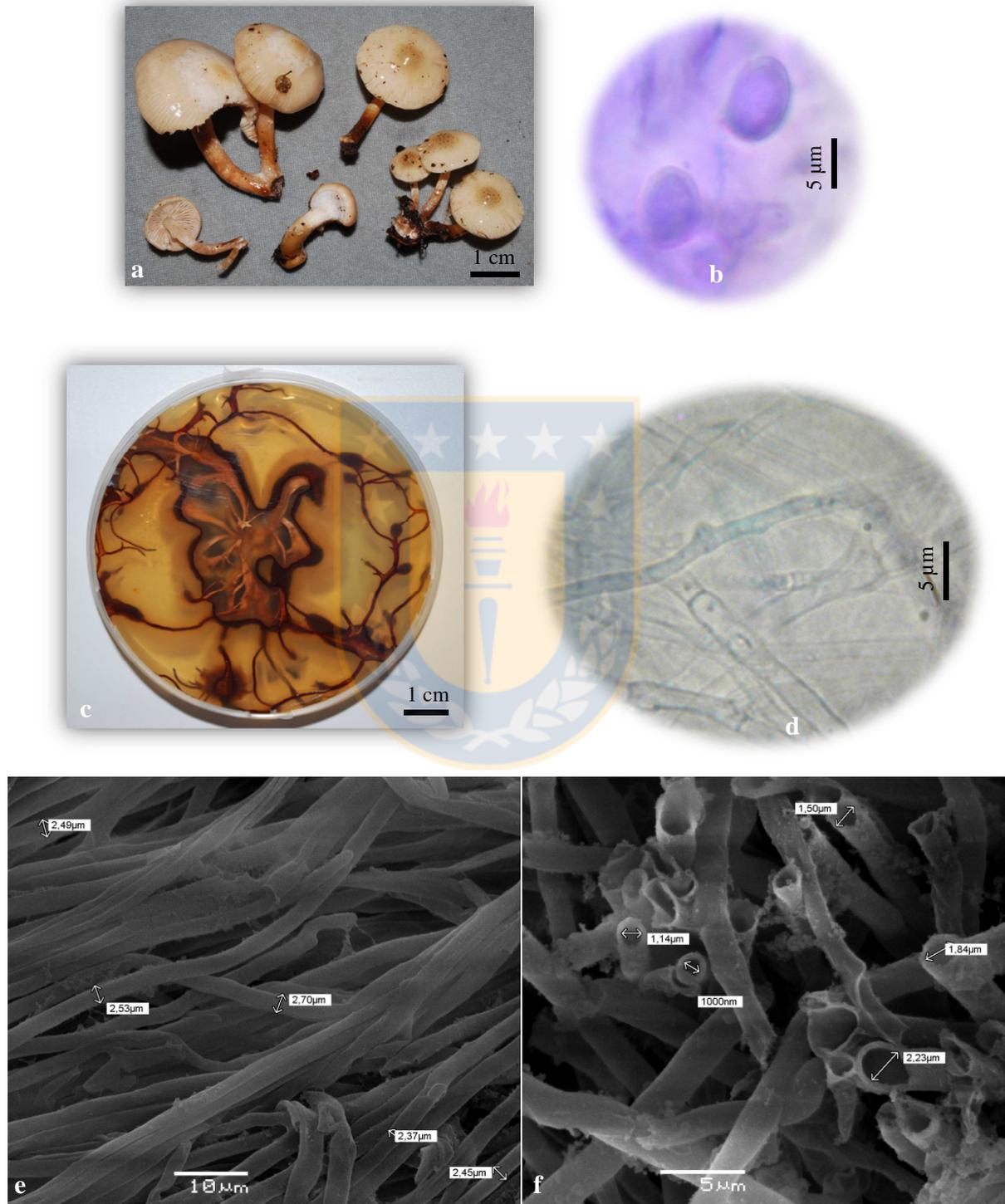


Figura 3: Macro y micromorfología de *Armillaria sparrei*. a) Basidiomas, b) Esporas, c) Cultivo *in vitro* Rizomorfos, d) Microscopía óptica de las hifas, e) Microscopía electrónica de barrido (SEM) que determina el ancho de las hifas y f) diámetro de las hifas que constituyen el cordón micelial (rizomorfo). Fuente: Elaboración propia.

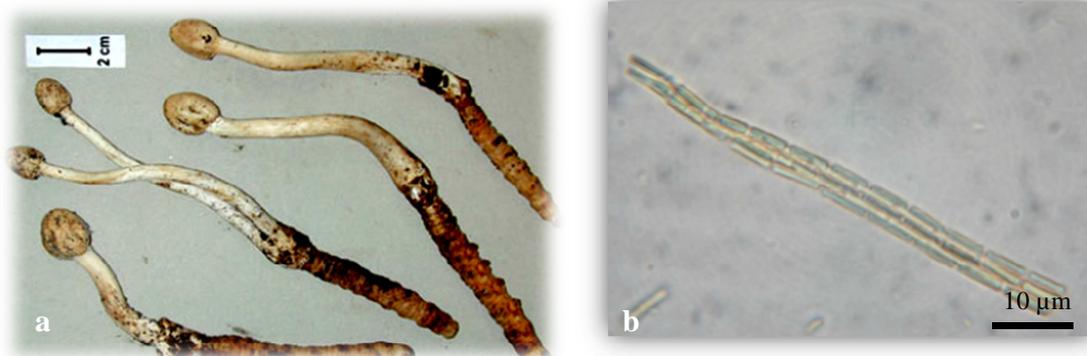
Características macroscópicas y microscópicas de *Cordyceps cuncunae*

Cordyceps cuncunae es un hongo entomopatógeno cuyo rasgo distintivo es su crecimiento sobre larvas de Lepidópteros en bosque nativo. Se distinguieron 2 fases. La fase Teleomorfo consiste en estromas estipitados de color blanco de 8 a 10 cm de alto, con receptáculo ovalado de 1.8 x 1.5 cm, de color ocráceo. Estípite de 9 x 0.8 cm, blanco y liso (Figura 4a).

Las esporas son hialinas, filiformes, de 375 x 2 μm en promedio, consistiendo en 64 células fácilmente separables (Figura 4b).

Sinanamorfo: En cultivos *in vitro*, sobre PDA, se observó abundante micelio en la superficie del agar, de color blanco de crecimiento concéntrico con presencia de estructuras reproductivas asexuales denominadas: Macroconidióforos o Coremios, de 1,5 a 2,0 cm de longitud, blancos, de textura medianamente lisa y solitarios en el centro o en el margen de la placa de cultivo. Los macroconidióforos presentan en su extremo una cabeza redondeada o ramificada de color ocre que consiste en una masa de conidios de forma globosa y hialina (Figura 4c).

De las observaciones por microscopía óptica de los cultivos *in vitro* se observó un micelio con hifas septadas y conidióforos con la presencia de cadenas de conidias hialinas, de forma ovalada o amigdaliforme (Figura 4d). De las observaciones por microscopía electrónica de barrido, se observaron las hifas septadas de 1,2 a 1,6 μm de ancho (Figura 4e). Se observaron abundantes conidios con un tamaño promedio de 1,27 a 1,52 μm (Figura 4f).



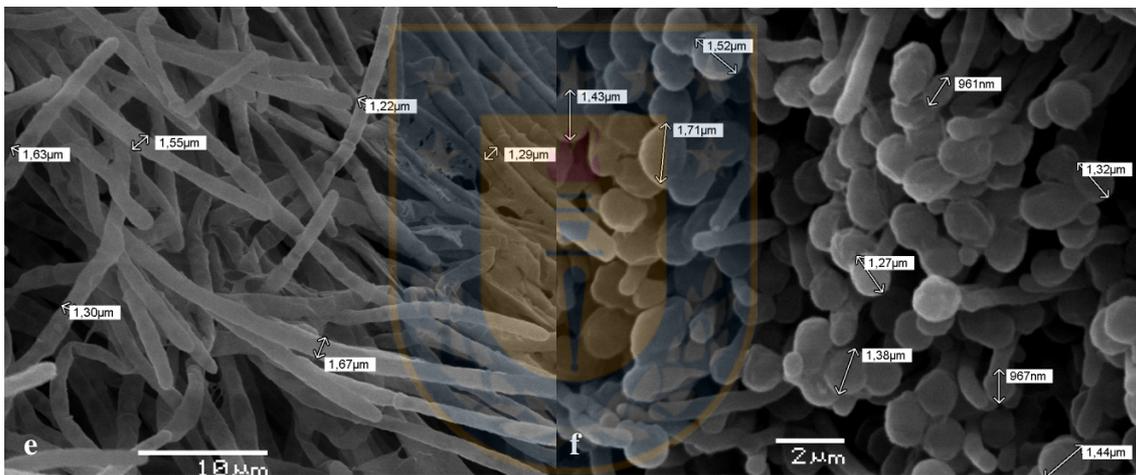
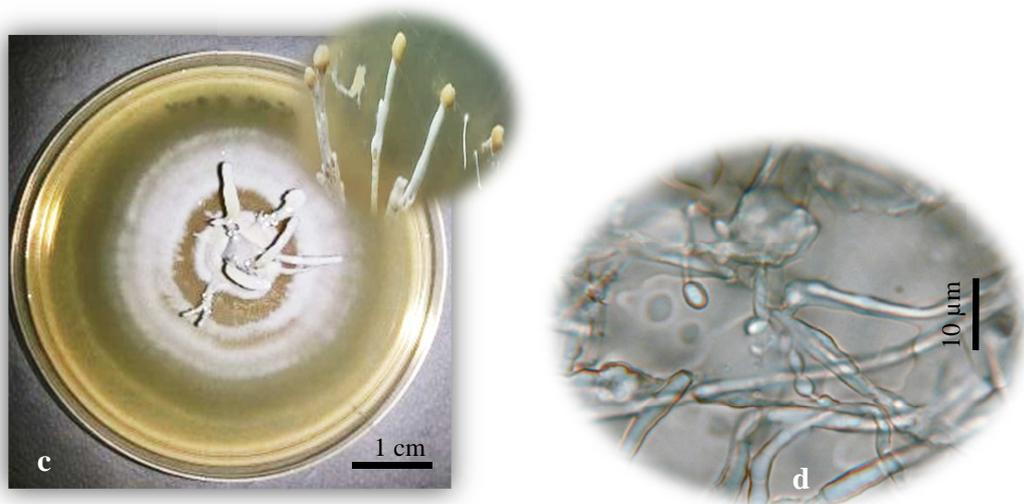


Figura 4: Macro y micromorfología de *Cordyceps cuncunae*. a) Estroma, b) Esporas, c) Cultivo *in vitro* Macroconidióforos, d) Microscopía óptica, e) Microscopía electrónica de barrido (SEM) que determina el ancho de las hifas y f) diámetro de los conidios. Fuente: Elaboración propia.

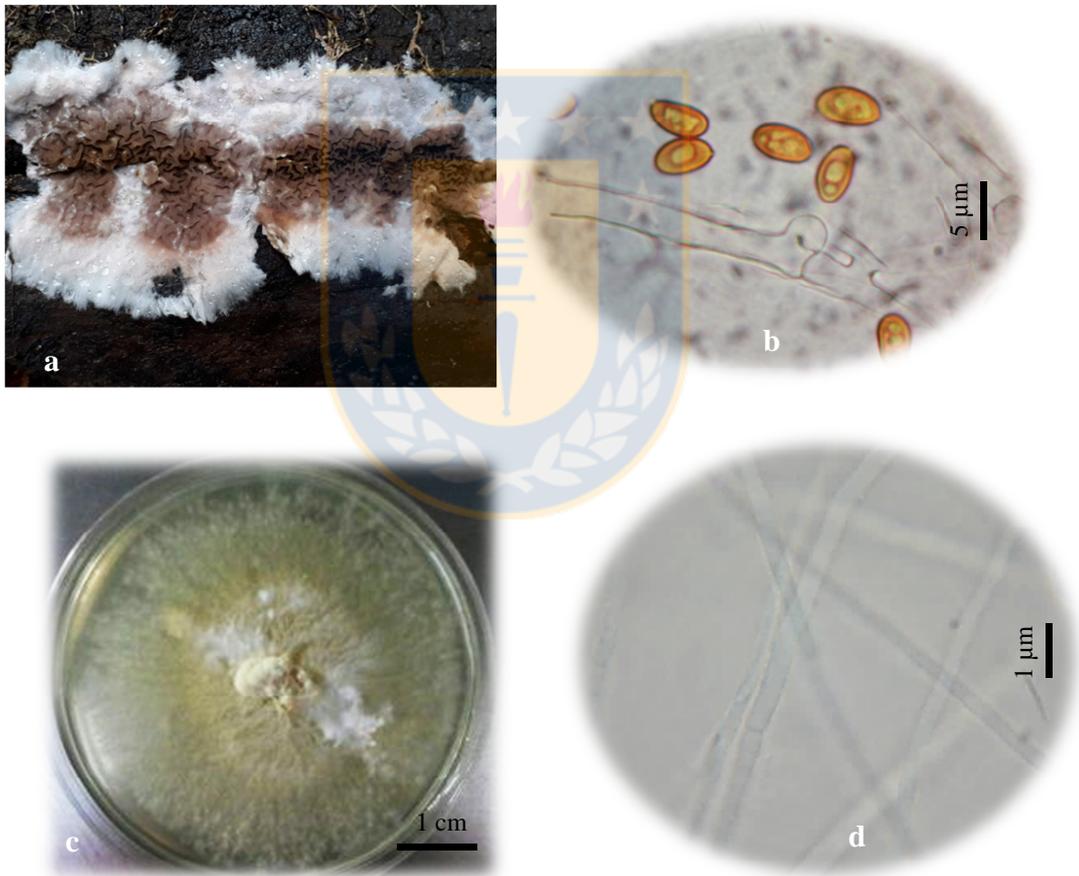
Características macroscópicas y microscópicas de *Serpula himantoides*

Crecimiento sobre madera de coníferas en descomposición. Basidioma irregular y resupinado, de 3-10 mm de espesor. Superficie superior lubricante-tomentosa, tuberculado-inflado de color marrón. Margen blanco con finos rizoides en el extremo inferior (Figura 5a).

Esporas elípticas, de paredes gruesas, lisas, amarillas, 7-9 x 5-6 μm en promedio. Se observó la presencia de hifas hialinas de paredes finas con fíbula (Figura 5b).

En cultivos *in vitro*, sobre PDA, se observó un crecimiento irregular del micelio de textura algodonosa de color blanco en algunas zonas del crecimiento micelial, en otras se torna amarillo a anaranjado por la síntesis de un pigmento del mismo color que es formado por el hongo (Figura 5c). De las observaciones por microscopía óptica de los cultivos *in vitro*, se observaron hifas hialinas de paredes delgadas formados por septos simples (Figura 5d).

De las observaciones por microscopía electrónica de barrido se observaron hifas delgadas, con un ancho que varía entre 715 a 850 nm (Figura 5e).



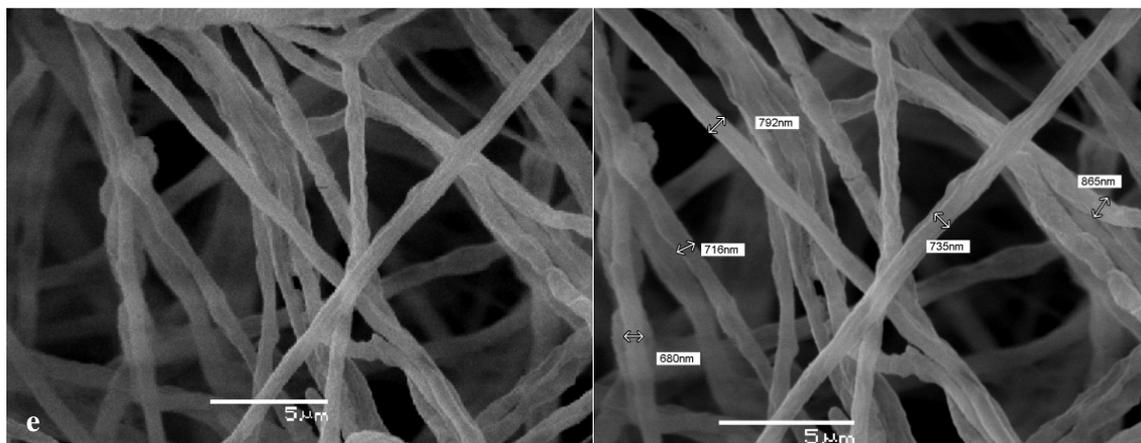


Figura 5: Macro y micromorfología de *Serpula himantioides*. a) Basidioma resupinado, b) Esporas c) Cultivo micelial *in vitro*, d) Microscopía óptica de las hifas, e) Microscopía electrónica de barrido (SEM) que determina el ancho de las hifas. Fuente: Elaboración propia.

Efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento de las diferentes especies fúngicas

Los resultados muestran que para los diferentes tratamientos utilizados, hubo variaciones en el crecimiento micelial de *A. sparrei*, *C. cuncunae* y *S. himantioides* bajo condiciones *in vitro* (Tabla 2, 3 y 4). Se observó una disminución del crecimiento (mm) para las 4 dosis de radiación UV-B utilizadas en el tiempo. Este efecto fue más evidente a dosis crecientes de radiación UV-B, en comparación al control (especies sin irradiar).

Al comparar el control con los diferentes tratamientos, el crecimiento de *A. sparrei* fue fuertemente inhibido a dosis más altas en donde se pudieron observar diferencias significativas; Sin embargo, a dosis más bajas, los valores de crecimiento fueron similares al control (Tabla 2).

Tabla 2: Efecto de las diferentes dosis de radiación UV-B sobre el crecimiento (mm) de *Armillaria sparrei* en el tiempo bajo condiciones *in vitro*. Fuente: Elaboración propia.

Tiempo (días)	Tratamientos				
	Control	0,12 mW/cm ²	0,09 mW/cm ²	0,06 mW/cm ²	0,03 mW/cm ²
3	7,33 ± 0,58 ^a	4,33 ± 0,58 ^b	5 ± 0,00 ^b	6,67 ± 0,58 ^a	6,67 ± 0,58 ^a
5	11,5 ± 0,87 ^a	5,67 ± 0,58 ^d	7,67 ± 0,58 ^c	9,67 ± 0,58 ^a	10,67 ± 0,58 ^a
7	16,7 ± 0,82 ^a	6,83 ± 0,29 ^d	10,33 ± 0,58 ^c	13,3 ± 0,26 ^b	14,47 ± 0,50 ^b
9	20,33 ± 0,58 ^a	8,33 ± 0,58 ^d	12,33 ± 0,58 ^c	17,33 ± 1,15 ^b	17,73 ± 0,25 ^b
11	23,9 ± 0,85 ^a	10,33 ± 0,58 ^d	14,5 ± 0,50 ^c	20,67 ± 0,58 ^b	21 ± 1,00 ^b
13	27,43 ± 1,25 ^a	13,5 ± 0,50 ^d	16,67 ± 0,58 ^c	23,8 ± 1,06 ^b	25,67 ± 0,58 ^{ab}
15	31,17 ± 1,89 ^a	16,33 ± 0,58 ^d	19,13 ± 0,23 ^c	26,33 ± 0,58 ^b	29 ± 1,00 ^{ab}
17	35,17 ± 0,76 ^a	19,1 ± 0,17 ^c	20,53 ± 0,50 ^c	29,67 ± 0,58 ^b	33,5 ± 1,32 ^a
19	39,23 ± 0,68 ^a	22,83 ± 0,76 ^c	24,33 ± 0,58 ^c	32,67 ± 1,53 ^b	35 ± 1,00 ^b
21	41,67 ± 1,53 ^a	25,13 ± 0,23 ^c	28 ± 1,00 ^c	36 ± 2,00 ^b	37,83 ± 0,29 ^b
23	45,33 ± 1,53 ^a	28,27 ± 1,12 ^d	32,67 ± 0,58 ^c	38,8 ± 1,39 ^b	39,47 ± 0,92 ^b
25	49,33 ± 1,53 ^a	31 ± 1,0 ^d	36 ± 1,00 ^c	40,67 ± 1,15 ^b	43 ± 1,00 ^b

Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el crecimiento de *Armillaria sparrei* para las cuatro dosis de radiación UV-B.

Para la mayoría de los tratamientos a los que fue expuesto *Cordyceps cuncunae*, no hubo mayores diferencias significativas (Tabla 3). El crecimiento promedio de *C. cuncunae* fue inferior al control a la dosis más alta de radiación UV-B (0,12 mW/cm²).

Tabla 3: Efecto de las diferentes dosis de radiación UV-B sobre el crecimiento (mm) de *Cordyceps cuncunae* en el tiempo bajo condiciones *in vitro*. Fuente: Elaboración propia.

Tiempo (días)	Tratamientos				
	Control	0,12 mW/cm ²	0,09 mW/cm ²	0,06 mW/cm ²	0,03 mW/cm ²
3	9 ± 0,00 ^a	7,67 ± 1,15 ^a	8,33 ± 0,58 ^a	8,5 ± 0,87 ^a	8,33 ± 1,15 ^a
5	15,5 ± 0,50 ^a	12 ± 1,73 ^b	14 ± 0,00 ^{ab}	12,33 ± 0,58 ^{ab}	12 ± 1,73 ^b
7	22,33 ± 0,58 ^a	15,67 ± 0,58 ^b	17,17 ± 0,29 ^b	16,2 ± 1,06 ^b	17 ± 1,00 ^b
9	27 ± 0,00 ^a	20 ± 2,00 ^b	20,67 ± 0,58 ^b	20,03 ± 0,84 ^b	22 ± 1,00 ^b
11	32,43 ± 0,51 ^a	23,33 ± 1,15 ^c	24,17 ± 0,29 ^c	24,33 ± 0,58 ^c	27,5 ± 0,87 ^b
13	36,67 ± 0,58 ^a	26,33 ± 0,58 ^d	28,67 ± 0,58 ^{cd}	28,83 ± 0,29 ^c	33,33 ± 1,53 ^b
15	43,37 ± 0,32 ^a	30,33 ± 0,58 ^d	34,33 ± 0,58 ^c	32,67 ± 0,58 ^c	37,67 ± 1,15 ^b
17	47,67 ± 1,15 ^a	34,33 ± 1,15 ^d	39,97 ± 0,55 ^c	35,67 ± 0,58 ^d	44,67 ± 0,58 ^b
19	54,67 ± 0,58 ^a	38,33 ± 2,08 ^d	44 ± 0,00 ^c	41,5 ± 0,87 ^c	50,33 ± 0,58 ^b
21	59,33 ± 0,58 ^a	41,97 ± 1,45 ^e	48,33 ± 0,58 ^c	45,33 ± 0,58 ^d	56,5 ± 0,50 ^b
23	65,67 ± 0,58 ^a	45,13 ± 0,81 ^d	52 ± 0,00 ^c	50 ± 2,00 ^c	61,67 ± 0,58 ^b
25	70,33 ± 0,58 ^a	49 ± 1,00 ^d	55,67 ± 0,58 ^c	55 ± 0,00 ^c	66,87 ± 0,81 ^b

Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el crecimiento de *Cordyceps cuncunae* para las cuatro dosis de radiación UV-B.

El crecimiento de *S. himantiodes* fue significativamente afectado por los diferentes tratamientos de radiación UV-B utilizados. La disminución del crecimiento presentó una correlación a incrementadas dosis de radiación (Tabla 4).

Tabla 4: Efecto de las diferentes dosis de radiación UV-B sobre el crecimiento (mm) de *Serpula himantioides* en el tiempo bajo condiciones *in vitro*. Fuente: Elaboración propia.

Tiempo (días)	Tratamientos				
	Control	0,12 mW/cm ²	0,09 mW/cm ²	0,06 mW/cm ²	0,03 mW/cm ²
3	7,67 ± 2,08 ^a	6 ± 1,73 ^a	7,67 ± 0,58 ^a	8 ± 0,00 ^a	8,83 ± 0,29 ^a
5	17,67 ± 0,58 ^a	11 ± 0,87 ^d	10,33 ± 0,58 ^d	13,33 ± 0,58 ^c	15 ± 0,00 ^{bc}
7	25,33 ± 0,29 ^a	15 ± 0,00 ^b	15 ± 0,00 ^b	17 ± 0,00 ^b	16,67 ± 1,53 ^b
9	32,33 ± 0,58 ^a	17,83 ± 0,29 ^d	19,67 ± 1,15 ^c	20,67 ± 0,29 ^c	23 ± 0,00 ^b
11	42 ± 0,00 ^a	22 ± 0,00 ^c	21,83 ± 1,61 ^c	24,67 ± 0,76 ^b	26,33 ± 0,58 ^b
13	50 ± 0,00 ^a	26 ± 1,00 ^d	26 ± 0,00 ^d	31 ± 0,00 ^c	34 ± 0,00 ^b
15	54,33 ± 0,58 ^a	28 ± 1,73 ^d	32 ± 0,00 ^c	35,33 ± 0,58 ^b	37,67 ± 0,58 ^b
17	60 ± 0,00 ^a	32,5 ± 2,29 ^d	37,67 ± 0,58 ^c	41 ± 0,00 ^b	44 ± 0,00 ^b
19	65,33 ± 0,58 ^a	37 ± 1,00 ^e	40,67 ± 0,29 ^d	44,17 ± 0,29 ^c	48 ± 0,00 ^b
21	71,33 ± 2,31 ^a	42,17 ± 0,29 ^d	44 ± 0,00 ^{cd}	47 ± 0,00 ^c	51,17 ± 1,89 ^b
23	77 ± 1,73 ^a	45 ± 0,00 ^d	46,67 ± 2,31 ^{cd}	49,67 ± 0,58 ^c	54 ± 0,00 ^b
25	80 ± 0,00 ^a	48,67 ± 0,58 ^c	50,67 ± 2,31 ^c	53 ± 2,65 ^{bc}	57,33 ± 0,58 ^b

Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el crecimiento de *Serpula himantioides* para las cuatro dosis de radiación UV-B.

Velocidad media del crecimiento bajo diferentes dosis de radiación UV-B

Las especies muestran diferentes comportamientos en la velocidad de crecimiento (mm día⁻¹) para los diferentes tratamientos de radiación UV-B (Figura 6).

Armillaria sparrei presentó la velocidad de crecimiento más baja para las 4 dosis de exposición UV-B en comparación con el control y el resto de las especies fúngicas. Para las dosis 0,12 y 0,09 mW/cm², la velocidad del crecimiento fue de 1,212 y 1,321 mm día⁻¹, respectivamente mientras que para las dosis 0,06 y 0,03 mW/cm² la velocidad fue de 1,595 y 1,686 mm día⁻¹, respectivamente.

Cordyceps cuncunae presentó la velocidad de crecimiento más alta (2,695 mm día⁻¹) a la dosis más baja (0,03 mW/cm²), mientras que para la dosis más alta, la velocidad del crecimiento fue menor (1,861 mm día⁻¹). No hubo diferencias significativas en la velocidad del crecimiento para las dosis 0,09 y 0,06 mW/cm².

Serpula himantioides fue la especie que se vio más afectada al ser expuesta a las diferentes dosis de UV-B al comparar su velocidad de crecimiento con el control (sin irradiar). Para la dosis más alta de radiación UV-B (0,12 mW/cm²), se obtuvo una velocidad de 1,908 mm día⁻¹ mientras que para la dosis más baja (0,09mW/cm²) la velocidad fue de 2,318 mm día⁻¹. Esta especie presentó una disminución significativa en la velocidad de crecimiento en comparación al control (3,327 mm día⁻¹).

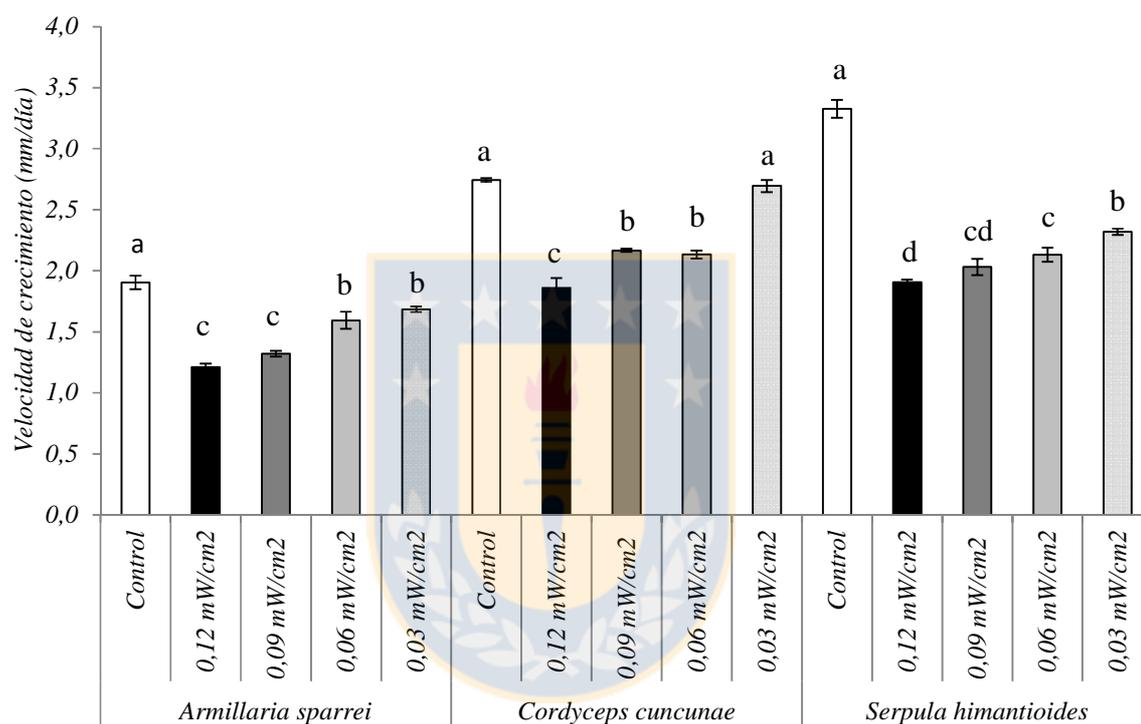


Figura 6: Efecto de diferentes dosis de radiación UV-B sobre la velocidad de crecimiento (mm día⁻¹) de diferentes especies fúngicas. Para una misma especie, letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, P < 0,05). Los datos representan la media ± S.D de tres réplicas por tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

Porcentaje de inhibición de crecimiento para las 3 especies fúngicas expuestas a cuatro diferentes dosis de radiación UV-B.

Los resultados obtenidos de porcentaje de inhibición son consistentes con lo señalado previamente (velocidad de crecimiento).

En el día 5 de exposición a la dosis más alta de radiación UV-B ($0,12 \text{ mW/cm}^2$), el porcentaje de inhibición fue de un 50% para *A. sparrei*, de un 37,8% de inhibición en el crecimiento para *S. himantioides* y de un 22,7% para *C. cuncunae*. A una dosis de $0,09 \text{ mW/cm}^2$, el porcentaje de inhibición más bajo se observó en *Cordyceps cuncunae* (9,61%). A una dosis de $0,06 \text{ mW/cm}^2$, los valores de porcentaje de inhibición fue de un 15,7% para *A. sparrei*, 20,3% para *C. cuncunae* y de un 24,4% para *S. himantioides*. A diferencia de los valores obtenidos a la dosis más alta de radiación UV-B, a una dosis de $0,03 \text{ mW/cm}^2$ el porcentaje de inhibición fue más alto para *C. cuncunae* con un 22,32%, un 15,03% para *S. himantioides* y de un 7,03% para *A. sparrei* (Figura 7).

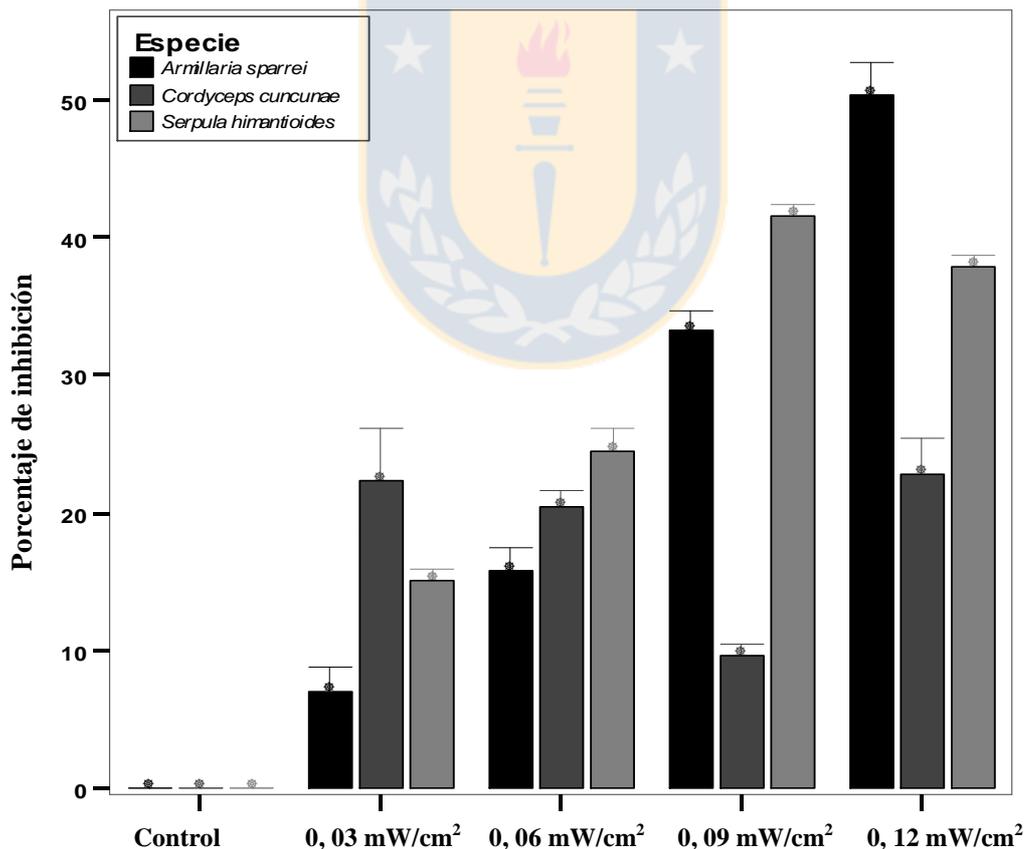


Figura 7: Porcentaje de inhibición del crecimiento para *Armillaria sparrei*, *Cordyceps cuncunae* y *Serpula himantioides* expuestas a cuatro diferentes dosis de radiación UV-B en el

día 5. Datos fueron analizados por ANOVA de dos vías (Tukey, $P < 0,05$). Los datos representan la media \pm S.D de tres réplicas por tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

En el día 15, los porcentajes de inhibición más altos para las 4 dosis de exposición UV-B fueron para *S. himantioides*. El mayor porcentaje de inhibición a la dosis más alta fue de un 48,47% y a la dosis más baja fue de un 30,67%. *Cordyceps cuncunae* presentó los porcentajes de inhibición más bajos en comparación al resto de las especies. Un 30,04% y a una dosis de 0,09 mW/cm² y un 20,83% a una dosis de 0,12 mW/cm².

A. sparrei presentó porcentajes de inhibición de un 47,38 % a una dosis de 0,12 mW/cm² y de un 38.7% a una dosis de 0,09 mW/cm².

A diferencia de los valores obtenidos a la dosis más alta de radiación UV-B, *C. concunae* obtuvo valores de inhibición más altos en comparación a *Armillaria sparrei* que presentó porcentajes de inhibición de un 23,67% a 0,06 mW/cm² y de un 13,12 % a 0,03 mW/cm² (Figura 8).

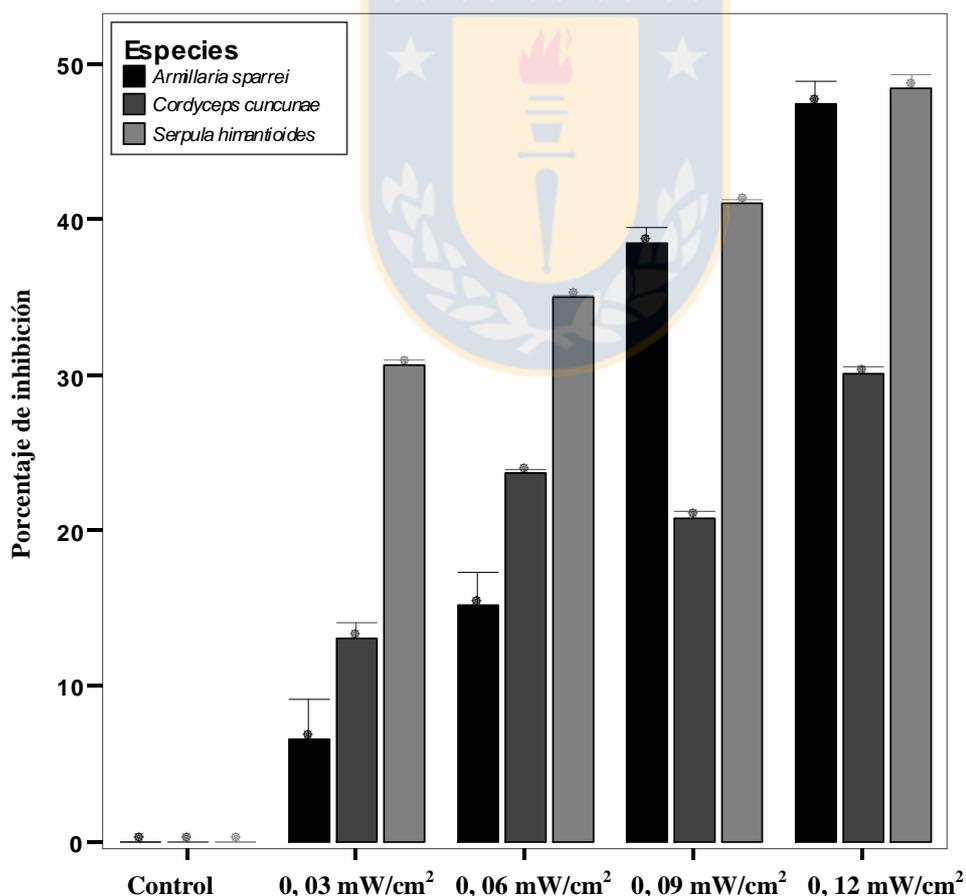


Figura 8: Porcentaje de inhibición del crecimiento para *Armillaria sparrei*, *Cordyceps cuncunae* y *Serpula himantioides* expuestas a cuatro diferentes dosis de radiación UV-B en el

día 15. Datos fueron analizados por ANOVA de dos vías (Tukey, $P < 0,05$). Los datos representan la media \pm S.D de tres réplicas por tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

Similares resultados a lo obtenido en el día 15, fue lo observado en la figura 9. Para todas las dosis de radiación UV-B, *S. himantioides* presentó los valores de porcentaje de inhibición más altos, con un 39,16% a una dosis de 0,12 mW/cm² y de un 28,33 % a la dosis más baja (0,03mW/cm²). *C. cuncunae* presentó los porcentajes de inhibición más bajos en comparación al resto de las especies. Un 20,85 % a una dosis de 0,09 mW/cm² y un 30,32 % a una dosis de 0,12 mW/cm².

A 0,06 mW/cm², *A. sparrei* presentó el menor porcentaje de inhibición (17,48%) en comparación al resto de las especies; Sin embargo, esto varió a la dosis más baja, ya que *Cordyceps cuncunae* presentó el porcentaje de inhibición más bajo con un 4,92% (Figura 9).

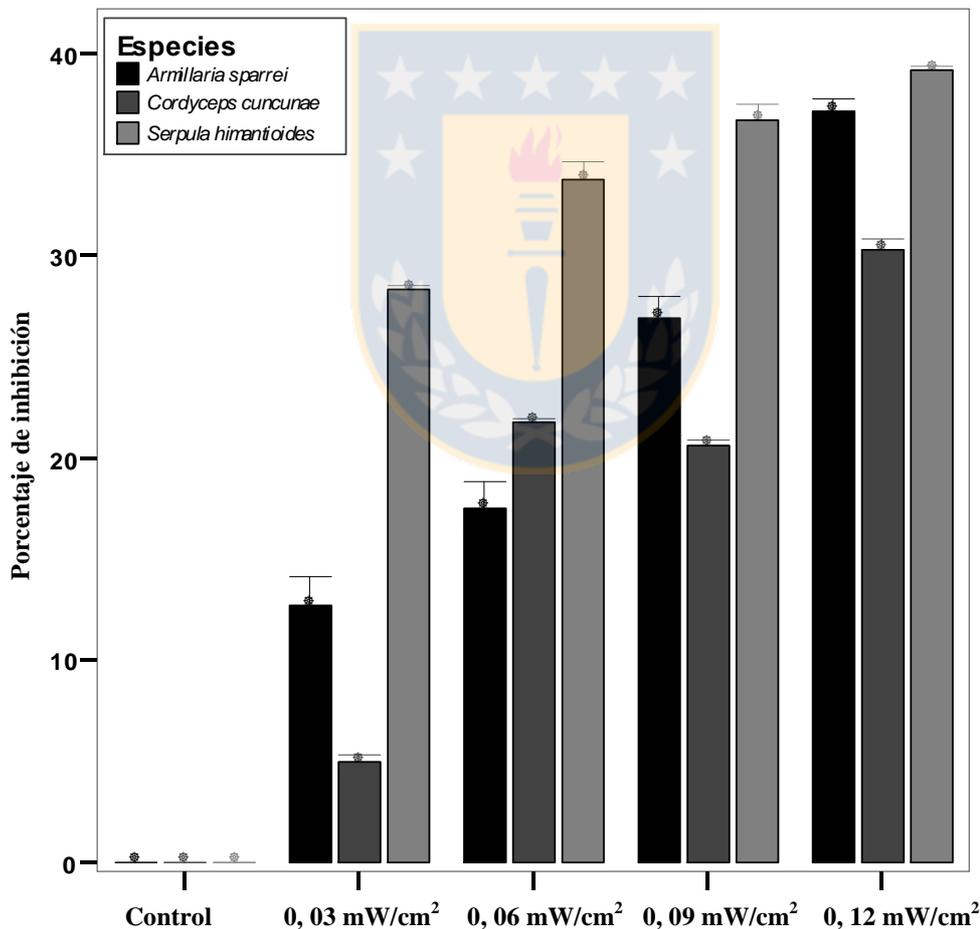


Figura 9: Porcentaje de inhibición del crecimiento para *Armillaria sparrei*, *Cordyceps cuncunae* y *Serpula himantioides* expuestas a cuatro diferentes dosis de radiación UV-B en el

día 25. Datos fueron analizados por ANOVA de dos vías (Tukey, $P < 0,05$). Los datos representan la media \pm S.D de tres réplicas por tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

4. Discusión

Los efectos frente a incrementadas dosis de radiación UV-B se han basado en las respuestas obtenidas de diferentes organismos para su sobrevivencia. Se han reportado efectos significativos de UV-B sobre hongos, y pueden ser negativos (inhibición de la germinación de esporas y crecimiento micelial) o positivos (aumento del crecimiento, inducción del desarrollo reproductivo y esporulación). En este estudio se identificaron tres especies de diferentes grupos filogenéticos que fueron determinadas por observaciones macroscópicas, microscópicas y literatura micológica especializada. Las especies *Armillaria sparrei*, *Cordyceps cuncuane* y *Serpula himantoides* han sido descritas en el centro sur de Chile (Horak E, 1979; Palfner et al., 2012). Se determinó la velocidad del crecimiento y el porcentaje de inhibición para las tres especies fúngicas expuestas a cuatro diferentes dosis de radiación UV-B bajo condiciones *in vitro*.

De acuerdo a los datos obtenidos, todas las dosis de UV-B evaluadas (0,12, 0,09, 0,06 y 0, 03 mW/cm²), inhibieron el crecimiento de las especies, al ser comparadas con el crecimiento de las especies sin irradiar. Las tres especies estudiadas, presentaron diferentes comportamientos en el crecimiento frente a las diferentes dosis UV-B. A medida que se incrementan las dosis de radiación, el crecimiento se ve disminuido. Pese a esto, hubo especies que presentaron una mejor respuesta frente al estrés, al presentar valores de crecimiento similares para los diferentes tratamientos. Este fue el caso del hongo entomopatógeno *Cordyceps cuncuane*, al no verse fuertemente afectado a dosis crecientes de radiación UV-B ya que presentó valores de crecimiento micelial similares al control (sin irradiar) y un mayor crecimiento en comparación a las otras especies. Brancini et al. (2016) observaron que una exposición de dos horas a radiación UV-A hubo un rápido crecimiento del micelio que induce tolerancia a la posterior irradiación UV-B. En este estudio se consideró el micelio y el desarrollo de coremios para evaluar la tolerancia al UV durante el crecimiento bajo condiciones *in vitro*. El desarrollo de estas estructuras otorgarían a *C. cuncuane* una ventaja adaptativa frente a estas condiciones de estrés abióticas, de acuerdo a lo señalado por Braga et al. (2015), la exposición directa a la luz UV trae como consecuencias que los organismos tengan que pre-adaptar

estructuras fúngicas tales como conidios y micelios a alto estrés para mejorar la sobrevivencia de estas especies.

Principales investigaciones en torno a hongos entomopatógenos y radiación UV-B se basan en la tasa de germinación de conidias. Mustafa y Kaur (2008) señalan que al aumentar el tiempo de exposición a la radiación UV-B, se observa una disminución en la germinación de conidios en *Beauveria bassiana*, pero esta disminución no fue significativa, a diferencia de lo obtenido en aislados de *Metarhizium anisopliae*, cuyas conidias fueron susceptibles a la radiación UV-B. De esto se deduce que diferentes respuestas adaptativas pueden presentarse en diferentes aislados fúngicos, dependiendo de las condiciones a la que es expuesta la especie. Fernandes et al. (2015) señalan que la variabilidad en la tolerancia al estrés UV entre diferentes especies se debe a la adaptación natural frente a diferentes condiciones. Por lo tanto, la comparación entre el origen de los aislados fúngicos y su tolerancia a la radiación UV ha mostrado una relación positiva para algunas especies de hongos entomopatógenos. La mayoría de las investigaciones se han centrado en la esporulación o germinación de esporas de diversos hongos como se señaló previamente, pero también hay estudios basados en los efectos de la UV en las interacciones entre las plantas y otros organismos, como los hongos patógenos de plantas y descomponedores de madera. En este estudio, *Armillaria sparrei* junto con *Serpula himantoides* presentaron los porcentajes de inhibición del crecimiento más altos a incrementadas dosis de radiación UV-B; sin embargo, *S. himantoides* junto a *C. cuncunae* presentaron una mayor velocidad de crecimiento para estas mismas dosis UV-B.

Armillaria es un género de hongos que se caracteriza por atacar las raíces de diferentes especies vegetales llevándolas hasta su pudrición y en este estudio se determinó la sensibilidad de *A. sparrei* bajo la influencia de la radiación UV-B en el crecimiento que fue fuertemente inhibido a altas dosis de radiación UV-B, lo que señalaría la baja tolerancia frente a este tipo de estrés. El aumento de UV-B puede alterar las interacciones entre plantas y consumidores a través de efectos directos en organismos consumidores (herbívoros, fitopatógenos, descomponedores, etc.)

Nematollahi et al. (2015) señalan que la radiación UV puede inhibir el crecimiento de los hongos en ambientes terrestres y que depende del tiempo y dosis de radiación UV. En este estudio, se observó una correlación entre la dosis UV-B a la que es expuesta el hongo y una disminución del crecimiento.

En este estudio y de acuerdo a los resultados de porcentajes de inhibición, *Armillaria sparrei* y *Serpula himantioides* presentaron valores cercanos al 50% de inhibición del crecimiento a la dosis más alta utilizada de 0,12 mW/cm². Posiblemente dosis superiores a ésta y a tiempos más prolongados, hubiese llevado a un efecto deletéreo en el crecimiento con valores cercanos al 100% bajo condiciones *in vitro*.

Los resultados de porcentajes de inhibición del crecimiento obtenidos son consistentes a lo reportado por Hugues et al. (2003), ya que observaron una disminución del crecimiento hifal al utilizar dosis de radiación > 287 nm sobre cinco hongos aislados de ecosistemas terrestres antárticos. La radiación disminuyó el crecimiento hifal de *Mortierella parvispora* en la superficie del medio y la radiación artificial, aplicada a partir de lámparas fluorescentes, produjo efectos inhibitorios sustanciales sobre el crecimiento hifal de *Geomyces pannorum*, *Pythium* sp. y *Verticillium* sp. en condiciones *in vitro*.

Duaguay y Khlironomos (2000) señalan que la radiación UV-B tiene efectos directos sobre el crecimiento de los hongos precisamente debido a que este tipo de radiación puede inhibir diferentes aspectos durante el desarrollo fúngico tales como la germinación de esporas y la extensión hifal.

Finalmente y de acuerdo a lo expuesto previamente, un factor de estrés abiótico como lo es la radiación UV genera que diferentes especies fúngicas deban regular su crecimiento, para sobrevivir al tiempo prolongado de exposición UV y posiblemente, la disminución en el crecimiento ocurrida para todas las especies analizadas en este capítulo, haya sido para activar mecanismos de reparación que se pueden lograr al reducir su metabolismo para poder sobrevivir frente a estas condiciones.

5. Bibliografía

Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.

Becerra J, Silva M, Becerra J (2014) Efecto de la Radiación UVB en el Crecimiento y Actividad Biológica de Hongos Saprófitos Subantárticos de Chile. *Revista Latinoamericana de Química* 42: 77-81.

Braga G, Rangel D, Fernandes E, Flint E, Roberts D (2015) Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Current Genetics* 61: 405-425.

Conner J, Neumeier R (2002) The Effects of Ultraviolet-B Radiation and Intraspecific Competition on Growth, Pollination Success, and Lifetime Female Fitness in *Phacelia campanularia* and *P. purshii* (Hydrophyllaceae). *American Journal of Botany* 89: 103-110.

Cuadra P, Herrera R, Fajardo V (2004) Effects of UV-B radiation on the Patagonian *Jaborosa magellanica* Brisben. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 76: 61-68.

Diaz V, Albariño R, Graça M (2010) Natural UVR Does Not Affect Decomposition by Aquatic Hyphomycetes. *International Review of Hydrobiology* 95: 1-11.

Doyle J, Doyle L (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Duguay K, Klironomos J (2000) Direct and indirect effects of enhanced UV-B radiation on the decomposing and competitive abilities of saprobic fungi. *Applied Soil Ecology* 14, 157-164.

Fernandes E, Rangel D, Braga G, Roberts D (2015) Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics* 61: 427-440.

Fourtouni A, Manetas Y, Christias C (1998) Effects of UV-B radiation on growth, pigmentation, and spore production in the phytopathogenic fungus *Alternaria solani*. *Canadian Journal of Botany* 76: 2093-2099.

García E, Marin S, Sanchis V, Crespo A, Ramos A (2015) Effect of ultraviolet radiation A and B on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus parasiticus* in grape and pistachio media. *Fungal Biology* 119: 67-78.

Hugues K, Lawley B, Newsham K (2003) Solar UV-B Radiation Inhibits the Growth of Antarctic Terrestrial Fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1488-1491.

Libkind D, Moline M, Van Broock M (2011) Production of the UVB-absorbing compound mycosporine-glutaminol-glucoside by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *FEMS Yeast Research* 11: 52-59.

López S, Greslebin A, González S, Pildain M (2013) Effect of water potential and host defense on the growth of *Amylostereum areolatum* and *A. chailletii*, fungal symbionts of siricididae, and study of wood associated mycobiota of conifers in Patagonia, Argentina. *Bosque* 34: 161-171.

Moody S, Newsham K, Ayres P, Nigel P (1999) Variation in the responses of litter and phylloplane fungi to UV-B radiation (290±315 nm). *Mycological Research* 11: 1469-1477.

Mustafa U, Kaur G (2008) UV-B radiation and temperature stress causes variable growth response in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. *The Internet Journal of Microbiology* 7: 1-8.

Nematollahi A, Badiie P, Nournia E (2015) The Efficacy of Ultraviolet Irradiation on *Trichophyton* Species Isolated From Nails. *Jundishapur Journal of Microbiology* 8: 1-6.

Niguel P, Gwynn D (2003) Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. *TRENDS in Ecology and Evolution* 18: 48-55.

Palfner G, Valenzuela V, Gallardo C, Parra L, Becerra J, Silva M (2012) *Cordyceps cuncunae* (Ascomycota, Hypocreales), a new pleoanamorphic species from temperate rainforest in southern Chile. *Mycological Progress* 11: 733-739.

Pereira G, Herrera J, Machuca A, Sánchez M (2007) Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque* 28: 215-219.

Regvar M, Bukovnik U, Likar M, Kreft I (2012) UV-B radiation affects flavonoids and fungal colonisation in *Fagopyrum esculentum* and *F. tataricum*. *Central European Journal of Biology* 7: 275-283.

Vásquez A, Santiago G, Estrada A (2002) Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica*. 73: 1-15.



Capítulo II. Efecto de la radiación UV-B sobre la morfología funcional durante el crecimiento micelial

1. Introducción

La radiación UV constituye uno de los componentes ambientales de mayor relevancia en este último tiempo al ejercer un efecto considerable en diferentes organismos, los cuales han tenido que desarrollar mecanismos que sean capaces de aminorar los efectos adversos de la radiación UV para adaptarse a estas condiciones. Se han producido avances sustanciales en la comprensión de los efectos de la radiación UV-B en los ecosistemas, especialmente en la elucidación de mecanismos generados en diferentes organismos.

Pese a que la radiación UV-B representa menos del 0,5% de la energía luminosa total que llega a la superficie terrestre, éste tipo de radiación presenta importantes efectos biológicos al inducir cambios en la expresión génica, fisiología, acumulación de metabolitos y morfología (Heijde y Ulm, 2012). Muchos son los efectos atribuibles a este tipo de radiación debido a que puede causar lesiones a ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, y alterar las respuestas fisiológicas y el contenido de pigmentos, además de modificar la organización ultraestructural en aquellos organismos más sensibles y perceptivos a la radiación UV-B (Schmidt et al., 2009; Schmidt et al., 2015). Estudios del crecimiento y respuestas fisiológicas a varios niveles de UV-B solar en grupos de plantas marinas, de agua dulce y en ecosistemas terrestres han sido considerados (Rozema et al., 2002). Basado en esto, las principales investigaciones de los cambios inducidos por la radiación UV-B en la ultraestructura de las células se han centrado en plantas superiores y macroalgas. En plantas, una gran proporción muestran un crecimiento vegetativo reducido (altura de la planta, peso seco, área foliar, etc.), así como también se ve afectada su tasa fotosintética. Las plantas generalmente se adaptan a los cambios en la radiación UV-B activando una serie de respuestas protectoras que incluyen cambios morfológicos (Caldwell et al., 2007). A nivel ultraestructural se ha observado que se producen cambios en los cloroplastos y los peroxisomas en respuesta a la radiación UV (Hosseini et al., 2011).

En macroalgas, se ha descubierto que la radiación ultravioleta afecta de distintas maneras, con efectos sobre la fotosíntesis, lesiones en el ADN, metabolismo del nitrógeno, crecimiento (Franklin y Forster, 1997) y a nivel de ultraestructura y biología celular (Poppe et al., 2002).

En hongos son escasos los estudios relacionados a los cambios morfológicos y/o de ultraestructura frente a dosis de radiación UV-B. En hongos filamentosos, el efecto morfogenético de la irradiación UV en especies microscópicas específicas de Deuteromicetos ha sido ampliamente examinado. Los efectos morfogenéticos están relacionados con la reproducción y formación de conidióforos y conidios y diversos cambios morfológicos incluyendo el cambio morfológico de esporas y esporangióforos. A su vez, la radiación UV afecta la producción de diferentes estructuras reproductivas como conidios, coremios, peritecios y basidiocarpos, así como también inhiben la esporulación en algunos hongos imperfectos (Vakalounakis y Christias, 1981; Nagy y Fischl, 2002).

En hongos filamentosos que fueron expuestos a niveles conocidos de radiación UV se observaron alteraciones en la pigmentación, la tasa de crecimiento, el grado de ramificación de las hifas, la extensión del crecimiento aéreo, el curvado en el extremo de las hifas y la septación en *Thanatephorus cucumeris*, así como también diversos patrones de pigmentación tanto en *Penicillium purpurogenum* como en *Pyrenochaeta terrestres* (Volz y Dublin, 1973). Todos estos antecedentes previos, nos aproxima a los diferentes cambios morfo-anatómicos que pueden presentar los hongos. De esta forma se ha producido un aumento sustancial en la comprensión de los mecanismos que intervienen en las respuestas de los organismos a la radiación UV-B basados en cambios morfológicos y/o de ultraestructura.

El objetivo del presente estudio fue determinar los cambios morfo-anatómicos generados durante el crecimiento en diferentes especies fúngicas que son expuestas a incrementadas dosis de radiación UV-B bajo condiciones *in vitro*.

2. Metodología

Cultivos *in vitro*

El tejido fúngico y/o esporada de las especies recolectadas, fueron depositados sobre placas con agar dextrosa y papa (4g/L extrato de papa, dextrosa 20g/L y agar 15g/L) (Moturi & Singara, 2010). La pureza de estos cultivos en medio sólido fue verificado mediante observaciones microscópicas. A partir de estos cultivos se detectaron los cambios morfo-anatómicos a nivel de hifas mediante observaciones macroscópicas y por microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

Condiciones de radiación UV-B

Para determinar los efectos de la radiación sobre la morfología funcional de las especies expuestas a la radiación UV-B se utilizó un gradiente de luz UV-B sobre placas petri abiertas con medio sólido. La intensidad de UV aplicado al micelio fue medido en mW/cm^2 y se utilizó una lámpara fluorescente que emite radiación UV-B. El gradiente de radiación UVB fue de 0,03 - 0,06 - 0,09 y 0,12 mW/cm^2 por 3 horas durante 25 días (Becerra et al., 2014). Cultivos miceliales sin radiación UV-B fueron considerados como controles.

Preparación muestras para observaciones macroscópicas

Se determinó el número y longitud promedio de rizomorfos y macroconidióforos de *Armillaria sparrei* y *Cordyceps cuncunae*, respectivamente. Para determinar la longitud se utilizó un pie de metro. Las dosis utilizadas para observar los cambios morfológicos durante el crecimiento de los hongos, fueron aquellas capaces de inhibir el crecimiento en un 50 % correspondientes a 0,12 y 0,09 mW/cm^2 . La información obtenida fue comparada al control, correspondiente a los cultivos sin irradiar.

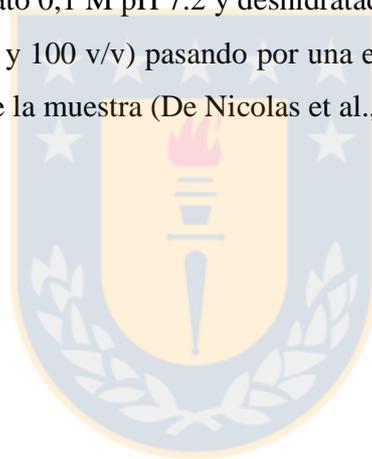
Microscopía electrónica de transmisión

Para la detección de cambios morfo-anatómicos por análisis de ultraestructura, se obtuvieron muestras de rizomorfos, macroconidióforos y micelio de cultivos *in vitro* una vez finalizado el periodo de incubación bajo los diferentes tratamientos. Las muestras fueron fijadas por 4 horas a temperatura de ambiente en 2% (v/v) de paraformaldehído que contiene 2.5 % de glutaraldehído en 0.1 M de buffer fosfato (pH 7.2).

Posterior a la etapa de fijación, la muestra pasó por etapas de deshidratación, inclusión en resina, secado y montaje de la muestra (Zacchi et al., 2000). Se emplearon secciones transversales cortadas a partir de material obtenido de los 3 tratamientos diferentes. Las visualizaciones se realizaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JSM 1200EX-II, 1994.

Microscopía electrónica de barrido

La morfología funcional de las especies fueron caracterizadas en un microscopio electrónico de barrido (JEOL, modelo JSM-638 OLV, 2005) y las muestras pasaron por una etapa de fijación (glutaraldehído al 4%), una de lavado con un buffer hasta la completa eliminación del glutaraldehído. Previo al montaje de las muestras, estas fueron depositadas en tetraóxido de osmio al 1% en un buffer fosfato 0,1 M pH 7.2 y deshidratadas a diferentes concentraciones de acetona (30, 40, 50, 70,80, 90 y 100 v/v) pasando por una etapa de secado punto crítico como paso previo al montaje final de la muestra (De Nicolas et al., 2006).



3. Resultados

Efectos de la radiación UV-B sobre la morfología en cultivos

Se evaluó el efecto de la radiación UV-B ($0,09$ y $0,12$ mW/cm^2) en la formación de rizomorfos durante el crecimiento de *Armillaria sparrei*. A incrementadas dosis de radiación UV-B se aprecia un considerable aumento en el número y longitud de los rizomorfos formados. Distinto fue a lo observado en cultivos sin irradiar (Control) donde la formación de rizomorfos fue menor (Figura 1).

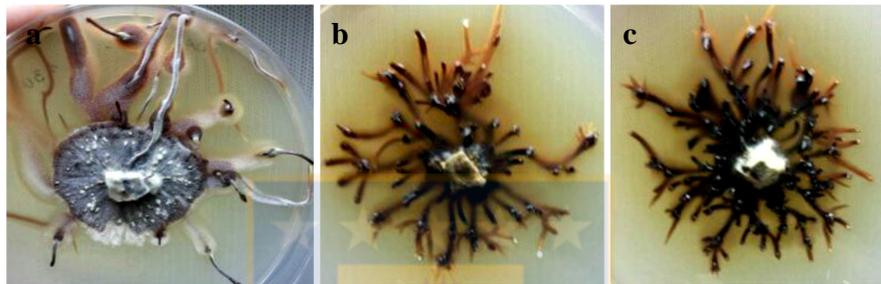


Figura 1: Cambios morfológicos en el número y longitud de rizomorfos en cultivos miceliales de *Armillaria sparrei* a los 30 días de incubación de a) Cultivo sin irradiar, b) Cultivo irradiado a una dosis de $0,09$ mW/cm^2 y c) Cultivo irradiado a una dosis de $0,12$ mW/cm^2 . Los principales cambios detectados durante el crecimiento tienen relación al número y longitud de los rizomorfos. Fuente: Elaboración propia.

Relacionado al número promedio de rizomorfos formados en cultivos *in vitro*, a incrementadas dosis de radiación UV-B el número de rizomorfos, para cultivos expuestos a dosis $0,12$ y $0,09$ mW/cm^2 , incrementó al doble (Figura 2).

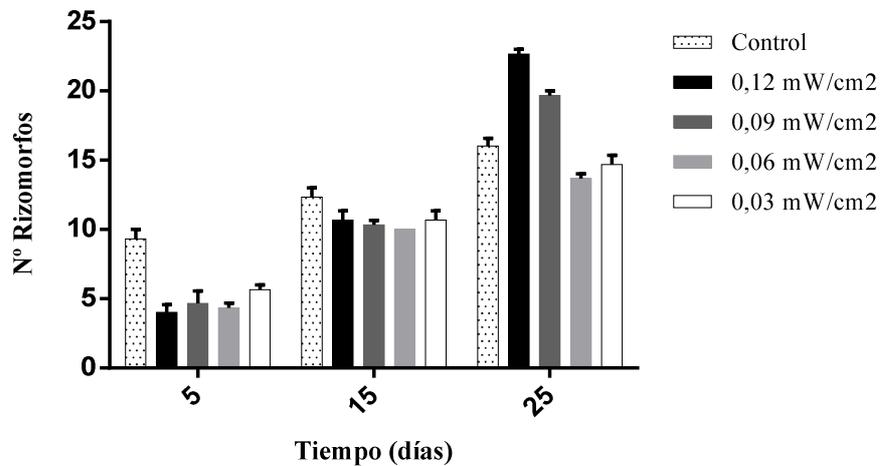


Figura 2: Número promedio de rizomorfos observados bajo diferentes dosis de radiación UV-B. Los cultivos *in vitro* sin irradiar son considerados como control. Los datos representan la media \pm S.D de tres réplicas por tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

De los valores de longitud de los rizomorfos, indican que a incrementadas dosis de radiación UV-B, la longitud de los rizomorfos, disminuye. A los 25 días de exposición de los cultivos *in vitro*, valores de 18 y 16 mm fueron obtenidos a 0,12 y 0,09 mW/cm², respectivamente. El control, presentó rizomorfos con una longitud promedio de 43 mm (figura 3).

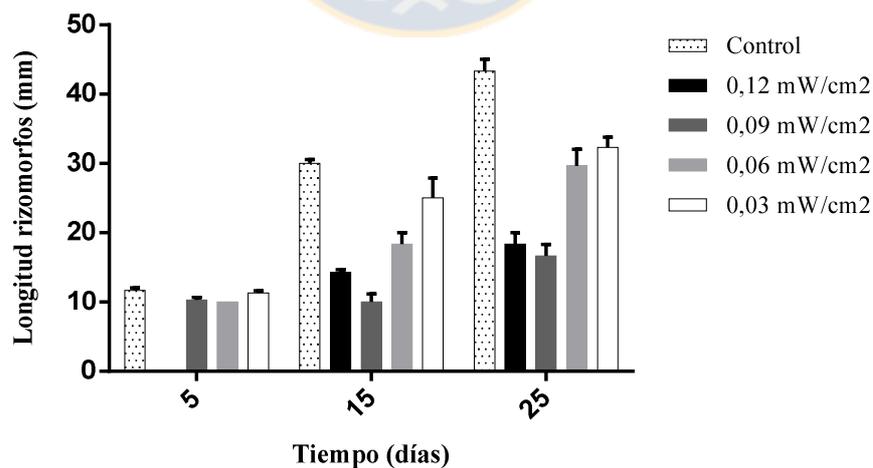


Figura 3: Longitud promedio de rizomorfos observados bajo diferentes dosis de radiación UV-B. Los cultivos *in vitro* sin irradiar son considerados como control. Los datos representan la media \pm S.D de tres réplicas por tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

Para *Cordyceps cuncunae*, el efecto de la radiación UV-B (0,09 y 0,12 mW/cm²) en la formación de macroconidióforos durante el crecimiento fue determinado. A incrementadas dosis de radiación UV-B se aprecia un considerable aumento en el número de los macroconidióforos formados, pero con una disminución en su longitud. Distinto fue a lo observado en cultivos sin irradiar (Control) donde la formación de macroconidióforos fue disminuida (Figura 4).

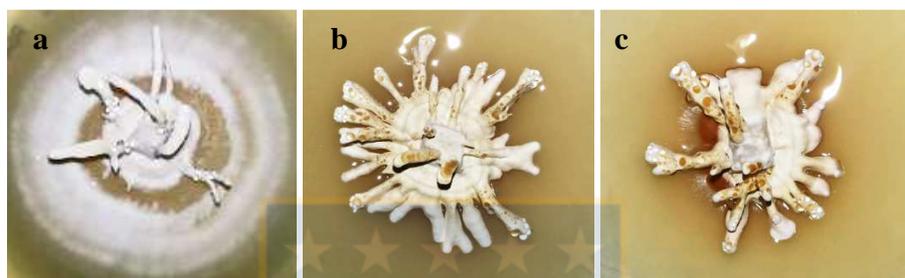


Figura 4: Cambios morfológicos en cultivos miceliales de *Cordyceps cuncunae* a los 30 días de incubación de a) Cultivo sin irradiar, b) Cultivo irradiado a una dosis de 0,09 mW/cm² y c) Cultivo irradiado a una dosis de 0,12 mW/cm². Los principales cambios detectados durante el crecimiento tienen relación al número y longitud de los coremios. Fuente: Elaboración propia.

El número de macroconidióforos observado, fue mayor a incrementadas dosis de radiación UV-B. A dosis de 0,12 mW/cm² y 0,09 mW/cm², 13 y 19 macroconidióforos fueron formados, respectivamente. A dosis más bajas, 0,06 y 0,03 mW/cm² el número promedio de macroconidióforos fue de 16. En el control, 8 macroconidióforos fueron formados (Figura 5).

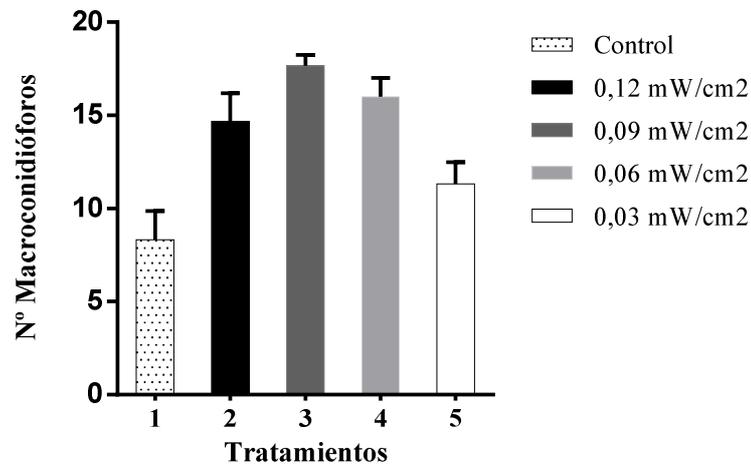


Figura 5: Número de macroconidióforos formados en cultivos miceliales de *Cordyceps cuncunae* a los 25 días de exposición a los diferentes tratamientos. Los datos representan la media \pm S.D de tres réplicas por tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

A la dosis 0,12 mW/cm², los valores de longitud de los macroconidióforos, disminuye a un 60 % a los 25 días de exposición de los cultivos *in vitro* comparado al control. Para las tres dosis restantes, el porcentaje promedio de la longitud disminuye a un 26% con respecto a la longitud de los macroconidióforos formados en el control (Figura 6).

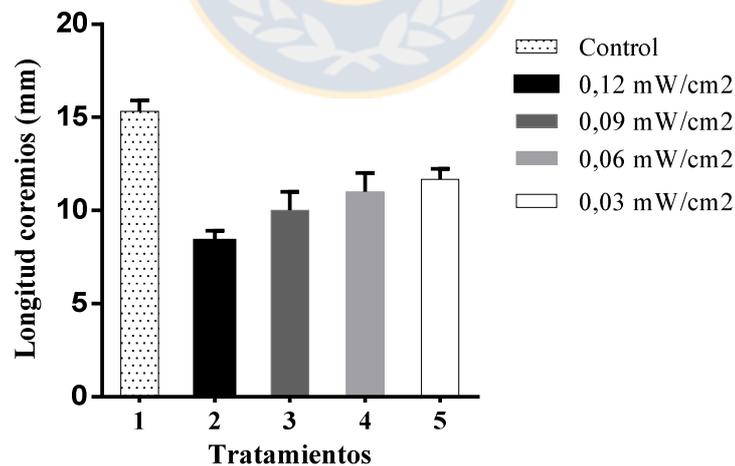


Figura 6: Longitud de macroconidióforos formados en cultivos miceliales de *Cordyceps cuncunae* a los 25 días de exposición a los diferentes tratamientos. Los datos representan la media \pm S.D de tres réplicas por tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

En *Serpula himantoides*, se detectaron diferencias entre los diferentes tratamientos relacionados con la pigmentación desarrollada en los cultivos *in vitro*. Macroscópicamente, a dosis 0,12 y 0,09 mW/cm², se observó mayor pigmentación.

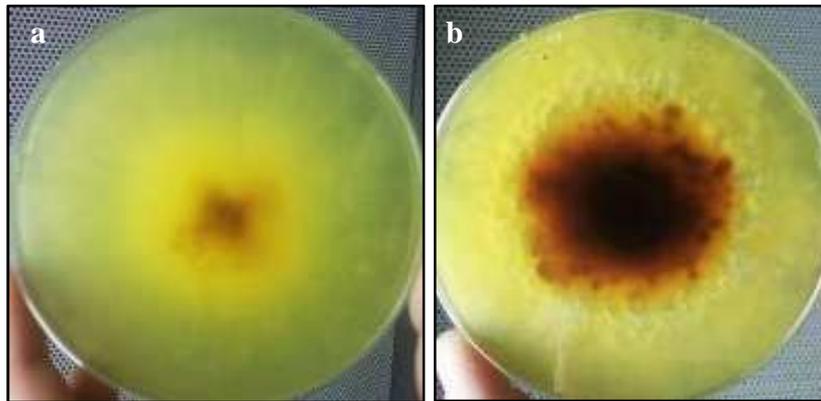
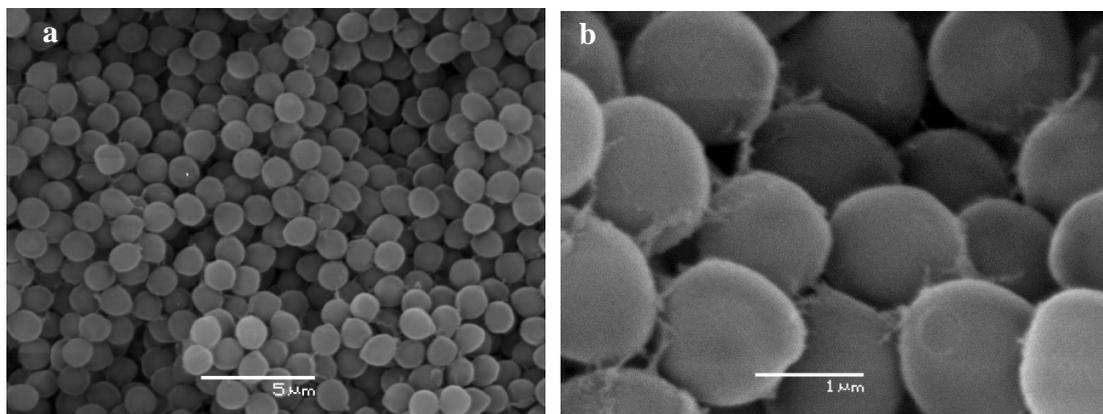


Figura 7: Cambios en la pigmentación desarrollada en cultivos *in vitro* de *Serpula himantoides*. a) Cultivo sin irradiar, b) Cultivo irradiado a una dosis de 0,12 mW/cm². Los principales cambios detectados durante el crecimiento tienen relación a la abundancia del pigmento sintetizado bajo los diferentes tratamientos. Fuente: Elaboración propia.

Cambios morfológicos detectados por microscopía electrónica de barrido (SEM)

El efecto de la radiación UV-B fue evaluada sobre los conidios producidos en cultivos *in vitro* de *Cordyceps cuncunae*. Conidios a una dosis de 0,12 mW/cm², presentaron cambios en su superficie. En cultivos irradiados, la superficie de los conidios mostró ornamentaciones, a diferencia de los conidios obtenidos de cultivos sin irradiar, que mostraron una superficie lisa (Figura 8).



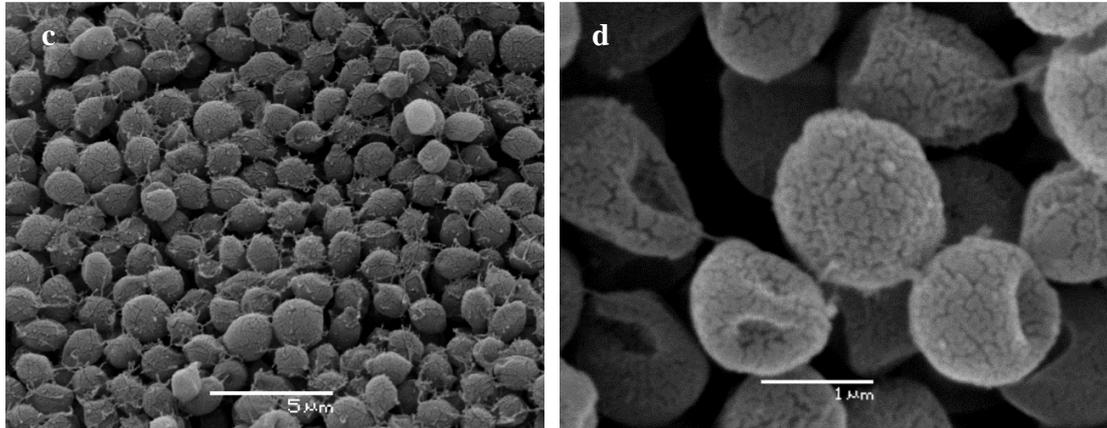
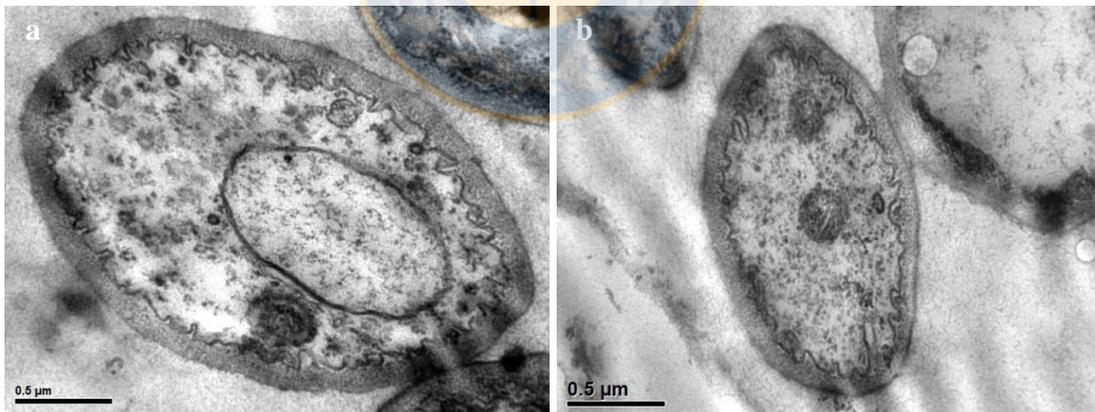


Figura 8: Microscopía electrónica de barrido de conidios obtenidos de *Cordyceps cuncunae*. a) y b) Conidios sin irradiar (Control), c) y d) Conidios bajo condiciones de radiación UV-B ($0,12 \text{ mW/cm}^2$). Fuente: Elaboración propia.

Cambios a nivel de ultraestructura de los diferentes cultivos fúngicos

De los cortes transversales obtenidos de los macroconidióforos obtenidos de los cultivos sin irradiar y bajo la influencia de la radiación UV-B en *Cordyceps cuncunae*, se observaron invaginaciones de membrana que fueron más notorias en el tratamiento control. A una dosis alta de radiación UV-B se aprecia una disminución de estas invaginaciones (Figura 9).



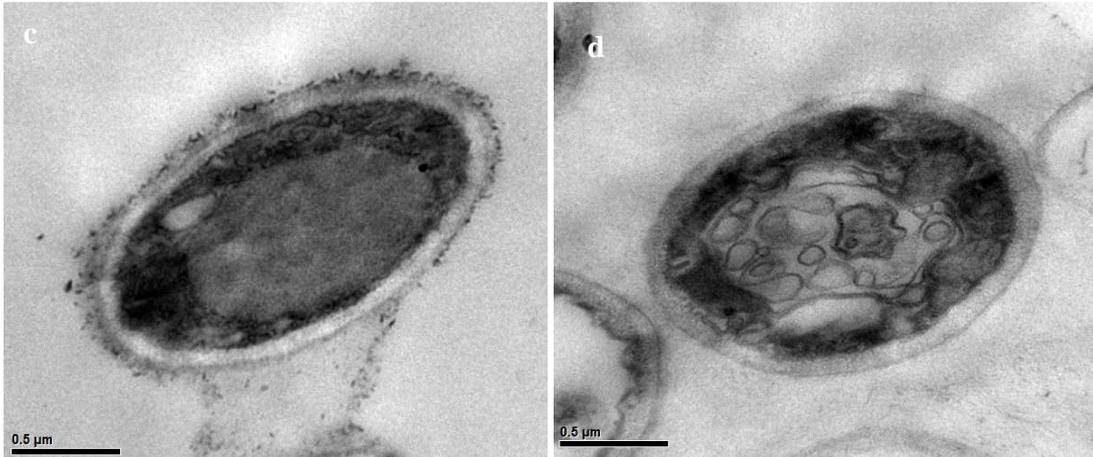


Figura 9: Cortes transversales de coremios obtenidos de cultivos *in vitro* de *Cordyceps cuncunae* a) y b) Control (sin irradiar), c) y d) Radiación UV-B ($0,12 \text{ mW/cm}^2$). Fuente: Elaboración propia.

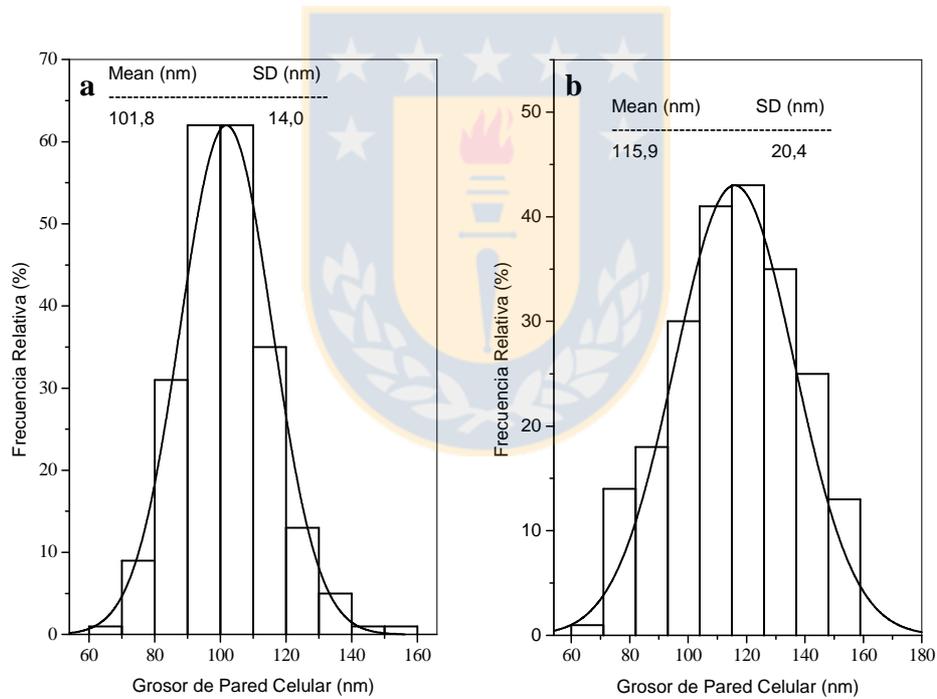


Figura 10: Histogramas obtenidos de cortes transversales de macroconidióforos de cultivos *in vitro* de *Cordyceps cuncunae* a) sin irradiar y b) irradiados a una dosis de $0,12 \text{ mW/cm}^2$. Fuente: Elaboración propia.

De las observaciones anatómicas de cortes transversales de cultivos miceliales de *Serpula himantioides*, se observó una distribución del pigmento al interior de la célula en cultivos sin irradiar; Sin embargo, a dosis crecientes de radiación UV-B, la distribución del pigmento se observa asociada a la pared celular, otorgando un mayor contraste (Figura 11).

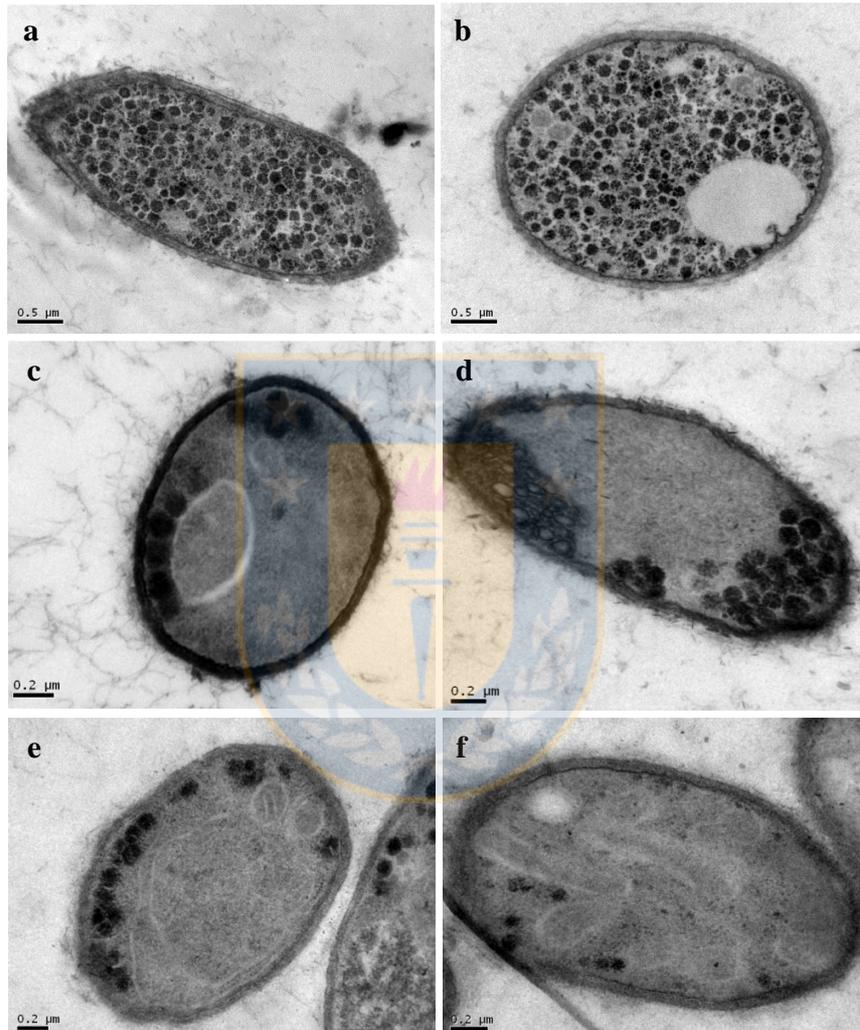


Figura 11: Cortes transversales de hifas obtenidas de cultivos *in vitro* de *Serpula himantioides* bajo diferentes tratamientos de radiación UV-B a) y b) Control (sin irradiar), c) Radiación UV-B ($0,12 \text{ mW/cm}^2$), d) Radiación UV-B ($0,09 \text{ mW/cm}^2$), e) Radiación UV-B ($0,06 \text{ mW/cm}^2$) y f) Radiación UV-B ($0,03 \text{ mW/cm}^2$). Diferentes patrones de distribución del pigmento se observan a incrementadas dosis de radiación UV-B. Fuente: Elaboración propia.

El efecto de la radiación UV-B se determinó sobre el grosor de la pared celular. En *Serpula himantioides*, no se detectaron cambios anatómicos relacionados al grosor de la pared celular, Valores promedios del grosor de la pared celular, fueron similares tanto para el control como para la muestra obtenida de cultivos irradiados (Figura 12).

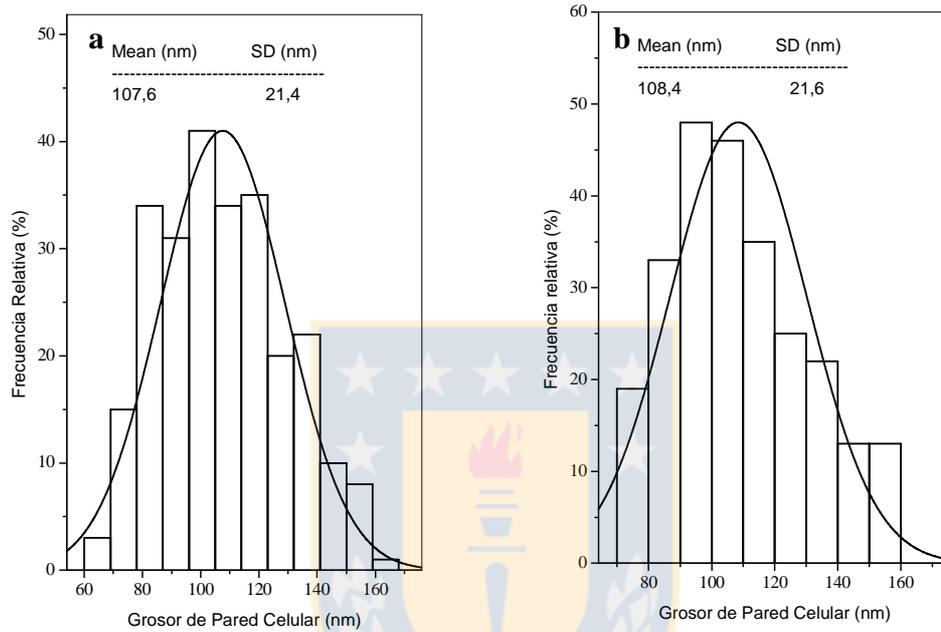


Figura 12: Histogramas obtenidos de cortes transversales del micelio de cultivos *in vitro* de *Serpula himantioides* a) sin irradiar y b) irradiados a una dosis de 0,12 mW/cm². Fuente: Elaboración propia.

4. Discusión

En todos los organismos, la presión selectiva de la radiación solar ha dado lugar a la adquisición de una serie de mecanismos para la protección contra la radiación lográndose un avance importante en la comprensión de los mecanismos y procesos involucrados en la adaptación y tolerancia del estrés abiótico determinados tanto por mecanismos protectores que previenen o reducen la ocurrencia de daños a componentes intracelulares, como por varios sistemas que reparan los daños causados por la radiación (Pérez et al., 2012). El efecto neto refleja un equilibrio entre los costos de daños, reparación y protección, con consecuencias para la supervivencia, el crecimiento y el éxito reproductivo de las especies bajo estrés UV (Montecino et al., 2001).

Los cambios morfo-anatómicos que son inducidos por la radiación UV-B toman un rol fundamental en las respuestas de las distintas especies fúngicas sometidas a un aumento de este tipo de radiación.

Reducciones en el crecimiento así como cambios morfológicos han sido reportadas como respuestas a incrementadas dosis de radiación UV-B bajo condiciones *in vitro*. Ya es conocido que uno de los principales efectos de la radiación UVB es sobre el crecimiento de muchos organismos, en donde muchos de estas especies ven inhibido su crecimiento a altas dosis de radiación UV-B. De esto surge el interés, en estudiar que rasgos morfo-anatómicos se ven comprometidos frente a la exposición de la radiación UVB.

De las observación macroscópicas de los cultivos celulares, se evidenciaron cambios morfológicos que van directamente relacionados con un incremento de las dosis de radiación UV-B. Los principales cambios morfológicos detectados, fueron asociados a la especies *Armillaria sparrei* y *Cordyceps cuncunae*. Durante el crecimiento, *Armillaria sparrei* presentó un porcentaje de inhibición cercano al 50% lo que permitiría una protección del tipo morfológica para poder generar una tolerancia al estrés a cambio de un reducido metabolismo celular.

Si bien *Cordyceps cuncunae* no se vio fuertemente inhibida durante el crecimiento, a altas dosis desarrolló mayor número de macroconidióforos y de menor longitud promedio comparado al control, lo que le permitió que su crecimiento no se vea inhibido. El incremento de rizomorfos y de macroconidióforos permite que el cultivo incremente la densidad al evitar

que la radiación penetre al interior de la célula y altere sus componentes celulares más internos.

Los resultados reportados en este estudio, son análogos a lo obtenido en plantas que están aclimatadas a alta radiación en alta montaña, presentan tallos y ramas cortas, resultando plantas de morfología compacta y de pequeño tamaño (Carrasco 2009). Del mismo modo, Fourtouni et al. 1998, observaron un incremento de la densidad hifal a incrementadas dosis de radiación UV-B ($83.6 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$) a los 7 días de crecimiento micelial en *Alternaria solani*.

Serpula himantioides no presentó cambios morfológicos durante el crecimiento micelial, pero si hubo una protección más química que morfológica.

De los resultados previos se observó una correlación positiva entre el incremento de la radiación UV-B y el número de rizomorfos y/o macroconidióforos desarrollados en *A. sparrei* y *Cordyceps cuncunae*, respectivamente. Estos resultados son consistentes a lo reportado por Allam y Abd El-Zaher (2012), quienes señalan que el tamaño de la colonia disminuye significativamente, mientras que la producción de biomasa se ve incrementada a altas dosis de radiación UV-A.

Por microscopía electrónica de barrido, los principales cambios detectados estuvieron relacionados a la estructura superficial de los conidios. Se detectaron cambios en los conidios expuestos a dosis altas de radiación UV-B. La superficie de los conidios se observó con ornamentaciones, a diferencia de los conidios sin irradiar, cuya superficie se observó lisa. Estos cambios en la superficie de los conidios, permitirían evitar que la radiación llegue a afectar los conidios. Braga et al. (2015), señalaron que la variación en la susceptibilidad a UV durante las diversas fases de germinación en conidias del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* se debe probablemente a los cambios morfofisiológicos de los conidios durante la germinación.

Por microscopía electrónica de transmisión, se detectaron cambios anatómicos, relacionados a cambios estructurales en el grosor de la pared celular. En *Armillaria sparrei* no se detectaron cambios en el grosor de la pared celular de las hifas que constituyen los cordones miceliares o rizomorfos. En *C. cuncunae* hubo cambios anatómicos a nivel de pared, al presentar invaginaciones en macroconidióforos sin irradiar y que desaparecen o son menos evidentes en cortes transversales obtenidos de macroconidióforos irradiados a la dosis más alta. Grandes cambios no fueron detectados a dosis más bajas. Junto con la desaparición de estas

invaginaciones, se observó, a partir de las microfotografías obtenidas de diferentes cortes transversales de los macroconidióforos expuestos a una dosis de radiación UV-B (0,12 mW/cm²), un aumento en el promedio del grosor de la pared celular correspondiente a un 13%. En plantas, el aumento del grosor de la pared celular ha sido observado como consecuencia de la inducción de síntesis de lignina y de otros polifenoles (Carrasco 2009). Algunos estudios de exposición a UV han revelado la inhibición de la división celular (Dickson y Caldwell 1978; Wargent et al., 2009), mientras que otros informan de la inhibición de la expansión celular (Hectors et al., 2010; Tenhaken 2015).

Los análisis de ultraestructura para la especie *Serpula himantioides* determinó la presencia del pigmento asociado a la pared celular. Esto permite un aumento del contraste de la pared por un aumento de la cantidad de pigmento en la pared hifal. No hubo cambios en el grosor de la pared celular y esto es concordante, ya que *S. himantioides* presentó un mecanismo de protección más químico que morfológico, al incrementar la síntesis y acumulación de un pigmento, otorgando al cultivo una mayor protección superficial de las hifas expuestas a la radiación UV-B, a diferencia de lo observado en *A. sparrei* y *C. cuncunae* que no presentaron una pigmentación característica frente a la radiación UV-B y por ende deben presentar una respuesta del tipo morfológica, para así evitar la penetración de los rayos UV-B a capas más internas de la célula. En hongos se ha reportado la acumulación de pigmentos carotenoides como componentes de la pared hifal, en la pared esporal, dentro del citoplasma o contenido dentro de gotas de aceite (Isaac 1994) y asociadas a las membranas (Arcangeli et al., 2000).

Las diferentes respuestas reportadas en el presente estudio, son el resultado de diferentes cambios morfo-anatómicos en la formación de estructuras miceliales que desarrollan las diferentes especies en cultivos *in vitro* y cuyas respuestas son útiles como indicadores predictivos de los diferentes mecanismos de adaptación que presentan los organismos en condiciones *in situ*.

5. Bibliografía

Allam N, Abd El-Zaher (2012) Protective role of *Aspergillus fumigatus* melanin against ultraviolet (UV) irradiation and *Bjerkandera adusta* melanin as a candidate vaccine against systemic candidiasis. African Journal of Biotechnology 11: 6566-6577.

Arcangelli C, Yu W, Cannistraro S, Gratton E (2000) Two-Photon Autofluorescence Microscopy and Spectroscopy of Antarctic Fungus: New Approach for Studying Effects of UV-B Irradiation. Biopolymers 57: 218-225.

Becerra J, Silva M, Becerra J (2014) Efecto de la Radiación UVB en el Crecimiento y Actividad Biológica de Hongos Saprófitos Subantárticos de Chile. Revista Latinoamericana de Química 42: 77-81.

Braga G, Rangel D, Fernandes E, Flint E, Roberts D (2015) Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. Current Genetics 61: 405-425.

Caldwell M, Bornman J, Ballaré C, Flint S, Kulandaivelu G (2007) Terrestrial Ecosystem, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with both climate change factors. Photochemical Photobiological Sciences 6: 252-266.

Carrasco L (2009) Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas. Idesia (Chile) 27: 59-76.

De-Nicolas S, Regalado C, Garcia B, Fernandez F, Tellez A, Huerta S (2006) Physiological, morphological, and mannanase production studies on *Aspergillus niger* uam-gs1 mutants. Electronic Journal of Biotechnology 9: 50-60.

Dickson J, Caldwell M (1978) Leaf development of *Rumex patientia* L. (polygonaceae) exposed to UV irradiation (280-320 nm). American Journal of Botany 65: 857-863.

Franklin L, Forster R (1997) The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *European Journal of Phycology* 32: 207-237.

Hectors K, Jacques E, Prinsen E, Guisez Y, Verbelen, Jansen M, Vissenberg K (2010) UV radiation reduces epidermal cell expansion in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 61, 4339-4349.

Heijde M, Ulm R (2012) UV-B photoreceptor mediated signalling in plants. *Trends in Plant Science* 17: 230-237.

Hosseini S, Carapetian J, Khara J (2011) The effects of UV radiation on some structural and ultrastructural parameters in pepper (*Capsicum longum* A.DC.). *Turkish Journal of Biology* 35: 69-77.

Isaac S (1994) Many Fungi are Brightly Coloured; Does Pigmentation Provide Any Advantage to Those Species? *Mycologist* 8: 178-179.

Montecino V, Molina X, Martínez G, Olmedo M, Retamal L, Hannach G, Orellana M (2001) Ecophysiological strategies in response to UV-B radiation stress in cultures of temperate microalgae isolated from the Pacific coast of South America. *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 293-311.

Moturi B, Singara M (2010) Influence of physical and chemical mutagens on dye decolourising *Mucor mucedo*. *African Journal of Microbiology Research* 4: 1808-1813.

Nagy P, Fischl G (2002) Effect of UV and Visible Light Irradiation on Mycelial Growth and Sclerotium Formation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 37: 83-89.

Perez R, Vives V, Zandalinas S, López M, Muñoz V, Gómez A (2013) Biotechnological Approaches to Study Plant Responses to Stress. *BioMed Research International* 2013: 1-10

Poppe F, Hanelt D, Wiencke C (2002) Changes in Ultrastructure, Photosynthetic Activity and Pigments in the Antarctic Red Alga *Palmaria decipiens* during Acclimation to UV Radiation. *Botánica Marina* 45: 253-261.

Rozema J, Bjorn L, Bornman J, Gaberscik A, Hader D, Trost T, Germ M, Klish M, Groniger A, Sinha R, Lebert M, He Y, Buffoni-Hall R, de Baker N, van de Staaij J, Meijkamp B (2002) The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 66: 2- 12.

Schmidt E, Scariot A, Rover T, Bouzon Z (2009) Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron* 40: 860-869.

Schmidt E, Kreuch M, Felix M, Pereira D, Costa G, Simioni C, Ouriques L, Farias F, Steiner S, Chow F, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon Z (2015) Effects of Ultraviolet Radiation (UVA+UVB) and Copper on the Morphology, Ultrastructural Organization and Physiological Responses of the Red Alga *Pterocladia capillacea*. *Photochemistry and Photobiology* 91: 359-370.

Tenhaken R (2015) Cell Wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science* 5: 1-10.

Vakalounakis D, Christias C (1980) Sporulation in *Alternaria cichorii* is controlled by a blue and near ultraviolet reversible photoreaction. *Canadian Journal of Botany* 59: 626-628.

Volz P, Dublin M (1973) Filamentous Fungi Exposed to Spaceflight Stresses Including Known Levels of Ultraviolet Irradiations. *Space Life Sciences* 4: 402-414.

Wargent J, Moore J, Ennos R. (2009) Ultraviolet radiation as a limiting factor in leaf expansion and development. *Photochemistry and Photobiology* 85, 279-286.

Zacchi L, Morris I, Harvey P (2000) Disordered ultrastructure in lignin-peroxidase secreting hyphae of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiology* 146: 759-765.



Capítulo III. Evaluación de los cambios en el perfil de metabolitos con actividad antioxidante en hongos expuestos a la radiación UV-B.

1. Introducción

Tanto los ecosistemas acuáticos como terrestres se ven afectados por el aumento de la radiación UV-B, con consecuencias que van desde un cambio en la composición y diversidad de especies, una disminución de la producción de biomasa, daños genéticos y cambios metabólicos. Se ha informado que una amplia gama de respuestas del tipo morfológicas, de crecimiento, bioquímicas y fisiológicas de las plantas se ven influenciadas por la radiación UV-B (Ravindran et al., 2010).

Como respuesta de defensa bioquímica, están los cambios metabólicos que pueden estar asociados a incrementos de compuestos que permitan un mecanismo de protección y reparación frente a la radiación UV-B contra el daño fotoquímico, la fotorreactivación de ADN, la reparación de la escisión, la acumulación de antioxidantes lipo e hidrosolubles y la actividad de enzimas antioxidantes. Un mecanismo protector más común contra la irradiación potencialmente perjudicial es la biosíntesis de compuestos UV absorbentes (Hahlbrock y Scheel 1989) que incluyen la acumulación de compuestos, principalmente pigmentos que pueden actuar como un filtro solar (Korbee et al., 2006; Libkind et al., 2009). Una inducción de compuestos UV absorbentes en diferentes organismos, su caracterización y localización química, así como una evaluación comparativa del funcionamiento fisiológico de estos compuestos ha sido reportado en plantas (Reboredo y Lidon 2012). Las plantas han desarrollado un complejo sistema de defensa bioquímica que incluye carotenoides y flavonoides. Estos metabolitos secundarios, principalmente compuestos fenólicos, flavonoides e hidroxicinamato se acumulan en las vacuolas de las células epidérmicas en respuesta a la irradiación UV-B y atenúan la penetración de la gama UV-B del espectro solar en capas celulares más profundas (Fronh Meyer y Staiger 2003). La radiación ultravioleta-B potencialmente dañina es filtrada por flavonoides y fenoles en la epidermis de las hojas antes de que pueda penetrar las células fotosintéticas internas (Tegelberg et al., 2002). Estos metabolitos absorben la radiación en las porciones UV del espectro solar y liberan energía a través de una excitación térmica sin daños, evitando que los fotones dañinos alcancen potenciales blancos celulares (Gao y García 2011). Así como las plantas presentan los mecanismos de defensa química mencionadas previamente, en otros organismos se han

estudiado este tipo de respuestas que son análogas a lo que ocurre con las especies vegetales. Un ejemplo lo constituyen los hongos y líquenes. Estos últimos, producen filtros UV que son únicos y/o eficientes tales como depsidas (ácido lobárico, pannarin, etc.), depsidas (atranorina, ácido girofórico, etc.), éteres difenólicos (ácidos epifórelicos), bisxantonas (ácidos secalónicos, etc.), micosporinas y pigmentos como la melanina y carotenoides bajo radiación UV-B (Nguyen et al., 2013).

En hongos unicelulares, como levaduras, es conocida la acumulación de pigmentos carotenoides como metabolitos secundarios fotoprotectores. En estos microorganismos, la síntesis de carotenoides está asociada durante su crecimiento y una acumulación máxima de carotenoides se observa en fase estacionaria probablemente como un mecanismo general de defensa contra el estrés oxidativo provocado por la radiación UV (Moliné et al., 2009). Las cepas *Sporobolomyces salmonicolor* AL1 y *Cryptococcus laurentii* AS58 aisladas de muestras antárticas (suelo, líquenes, musgo) acumulan sustancias fotoprotectoras como barrera contra la radiación ultravioleta (Dimitrova et al., 2013).

Todos los hábitats conocidos para estas especies de levaduras se localizan principalmente en regiones montañosas y frecuentemente representan hábitats estresantes debido a la alta exposición UV y por consiguiente, la presencia de altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (Libkind et al., 2011).

Otro mecanismo de fotoprotección generado para aminorar los efectos nocivos de la radiación, corresponde a la activación de sistemas antioxidantes (Korbee et al., 2006). En hongos, los compuestos fotoprotectores presentan un papel fundamental es proporcionar protección contra las especies reactivas de oxígeno (ROS), proporcionando además una protección indirecta contra otras longitudes de onda mediante la extinción de ROS (Moliné et al., 2009).

Es de interés estudiar cada una de las respuestas que se generarían en hongos bajo condiciones de radiación UV, tanto para predecir y conocer las implicancias ecológicas que presentarían en su ambiente natural, así como conocer que compuestos son inducidos bajo estas condiciones para mejorar la eficiencia biotecnológica de estos organismos y sus aplicaciones en la industria farmacéutica.

2. Metodología

Cultivos miceliales líquidos

Bajo condiciones estériles, trozos de micelio de aproximadamente 5 mm de diámetro, obtenidos de cultivos sólidos puros, fueron traspasados a matraces con 3L de medio de cultivo caldo dextrosa y papa (PDB). Los cultivos tanto de *Armillaria sparrei* como de *Cordyceps cuncunae*, fueron incubados a temperatura de ambiente con agitación constante de 120 rpm. Cultivos de *Serpula himantioides* fueron incubados a temperatura de ambiente sin agitar. Todos los cultivos fueron incubados con un pH inicial de 5.5 e incubados durante 21 días. A partir del micelio y del medio se obtuvieron los extractos que permitieron evaluar la síntesis de compuestos UV-B protectores con actividad antioxidante.

Condiciones de radiación UV-B

Para determinar los efectos de la radiación sobre el perfil químico de los metabolitos se utilizó la dosis más alta de radiación UV-B (0,12 mW/cm²) que fue capaz de inhibir el 50% del crecimiento en medio de cultivo sólido. A partir de matraces incubados a temperatura de ambiente, todo el medio de cultivo fue transferido a recipientes rectangulares de vidrio de 5,3 L para irradiar los cultivos líquidos. Los cultivos líquidos fueron protegidos de la contaminación externa mediante el uso de plastialusa de 30 cm de ancho. Se utilizó una lámpara fluorescente que emite radiación UV-B ubicada a 35 cm del cultivo. Los cultivos fueron expuestos por 3 h diarias durante 15 días (Becerra et al., 2014). Cultivos miceliales líquidos sin irradiar fueron considerados como controles.

Obtención de extractos totales

Una vez transcurrido el periodo de incubación, se obtuvieron los extractos totales a partir de los matraces sin irradiar y de recipientes con cultivo líquido irradiados. Todos los cultivos para los diferentes tratamientos fueron filtrados para separar el micelio del medio de cultivo. A partir de micelios liofilizados se obtuvieron los rendimientos (mg/L).

El micelio liofilizado fue extraído con metanol (3 x 200 mL) y el caldo de cultivo fue extraído con acetato de etilo (3 x 250 mL). Ambos extractos totales fueron concentrados a sequedad en un rotavapor (Heildolph Unimaz 2010).

El extracto crudo de *Serpula himantoides* conteniendo los pigmentos (296 mg), fue fraccionado en SEPHADEX LH-20 usando como fase móvil Metanol 100%. Posteriormente, una segunda columna fue realizada usando como fase móvil Acetona: Metanol= 4:1. Las fracciones conteniendo los pigmentos, fueron mezcladas y evaporadas en un rotavapor.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).

Los extractos totales obtenidos tanto del micelio como del medio de cultivo fueron analizados por Cromatografía de Gas-Espectrometría de Masas (GC-MS) (Agilent 7890, California, EE.UU.) equipado con un detector de masa Agilent 5975, utilizando una columna capilar de sílice HP5-MS de 30 m x 0,25 mm de diámetro interno y una película de 0,25 µm de espesor, bajo las siguientes condiciones: temperatura: 250°C; Detector (masa): 280°C; Horno: inicial de 100 ° C durante 5 min, aumentando en 8° C/min hasta 250° C y se mantiene durante 15 min. El detector establecido en el modo de exploración varió de 50 a 500 amu. El flujo de gas portador (grado electrónico de helio) fue de 1 mL/min. La caracterización del compuesto se realizó mediante la comparación con la base de datos NIST[®]. La estructura de los compuestos fue diseñada con el programa ChemDraw Pro.

Cromatografía capa fina (TLC)

TLC analítica se llevó a cabo en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (Merck, Silica gel 60 F₂₅₄, Germany). Como fase móvil se utilizó una mezcla de Formiato de etilo: Tolueno: Ácido fórmico (7:4:1). El R_f de los compuestos puros fue determinado mediante: **R_f**= distancia recorrida por el compuesto (X)/distancia recorrida por el eluyente (Y).

Cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC)

HPLC-DAD

El análisis se realizó en un modelo YL 9115 Binary Pump equipado con un detector PDA YL9160. Se utilizó una columna Kromasil 5µm 100 R C18 de 250 x 4.60 mm 5 micron. La fase eluyente fue agua: acetonitrilo (70:30) con un flujo de 0.8 mL/min.

HPLC-MS

2 μL del extracto total obtenido de cultivos *in vitro* de *Serpula himantioides*, fue cargado a una columna Hypersil GOLD (C18, ID 2,1 mm, longitud 50 mm, tamaño de partícula 1,9 μm , Thermo Fisher Scientific) usando un UHPLC Dionex 3000, equipado con un muestreador automático WPS-3000 TRS, GLP -3400RS, horno de columna TCC-3000RS y detector de matriz de fotodiodos (PDA) DAD-3000 (Thermo-Fisher Scientific, Bremen, Alemania). Los eluyentes A y B fueron agua y acetonitrilo, respectivamente, ambos conteniendo ácido fórmico al 0,1% (v / v). Después de un paso isocrático de 4 minutos (eluyente B al 5%), los analitos se eluyeron a un flujo de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 30 $^{\circ}\text{C}$ en un gradiente lineal hasta el eluyente B al 100% en 15 min. Los efluentes de la columna se introdujeron en línea en un espectrómetro de masas Orbitrap Elite a través de una fuente HESI (Thermo-Fisher Scientific, Bremen, Alemania). El instrumento fue operado en el modo de iones negativos y controlado por el software Xcalibur (Thermo-Fisher Scientific, Bremen, Alemania).

Evaluación de actividad antioxidante

Con el fin de investigar las propiedades antioxidantes tanto de los extractos fúngicos obtenidos de cultivos irradiados y sin irradiar como de los pigmentos puros obtenidos, los ensayos DPPH y ABTS fueron realizados.

Ensayo DPPH

De los extractos totales y pigmentos puros obtenidos se evaluó el método DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl). Diferentes concentraciones de extractos en metanol (0,25-0,500-1-2-4 y 8 mg/mL) fueron utilizadas. Se depositaron 20 μL de cada concentración de las muestras con 80 μL de DPPH en cada pocillo de la microplaca. La mezcla de reacción fue homogeneizada y dejada por 30 min en la oscuridad. La actividad antioxidante de cada extracto se determinó basándose en el porcentaje de inhibición del radical DPPH mediante la siguiente fórmula: $[(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) \div A_{\text{control}}] \times 100$. El valor EC_{50} (mg/mL) fue determinado que corresponde a la concentración efectiva a la que los radicales DPPH fueron eliminados en un 50%. Trolox fue utilizado como estándar (Umashankar et al., 2014). Posteriormente, las absorbancias fueron medidas en un lector de microplaca ELX800 (Bio-Tek instrument, Inc; Winooski, United State) a 515 nm.

Ensayo ABTS

Dos soluciones stock que incluyeron 3,75 mM de 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) y 1,225 mM de Persulfato de potasio (K2S2O8, Merck KKaA, Darmstadt, Germany) fueron mezcladas y dejadas en oscuridad toda la noche a 30° C. Posteriormente, la solución stock fue diluida con metanol a una absorbancia de ca. 0.6 ± 0.05 a 750 nm. 20 μ L de las diferentes concentraciones (100, 200, 400, 600, 800 y 1000 μ g/mL) de extractos totales y (10, 20, 40, 60, 800 y 100 μ g/mL) de pigmento puro fueron utilizadas y mezcladas con 180 μ L de la solución de ABTS. La actividad antioxidante de cada extracto se determinó basándose en el porcentaje de inhibición del radical ABTS mediante la siguiente formula: $[(A_{control} - A_{muestra}) \div A_{control}] \times 100$. El valor EC_{50} (mg/mL) fue determinado que corresponde a la concentración efectiva a la que los radicales ABTS fueron eliminados en un 50%. Trolox fue utilizado como estándar (Sugiharto et al., 2016). Las absorbancias fueron medidas en un lector de microplaca ELX800 (Bio-Tek instrument, Inc; Winooski, United State) a 734 nm.

Determinación del contenido de fenoles totales

El método Folin-Ciocalteu fue realizado para determinar el contenido de fenoles totales en los diferentes extractos fúngicos. 100 μ g/mL de cada extracto se mezcló con reactivo de Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio (75 g/L, 400 μ L). Los tubos se mezclaron en vortex durante 15 segundos y se dejaron reposar durante 30 min a 40° C para el desarrollo del color. La absorbancia fue determinada a 750 nm en un lector de microplacas ELX800 (Bio-Tek instrument, Inc; Winooski, United State). Se utilizó ácido gálico para la curva estándar (0-100 μ g/mL) y la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu para las muestras se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de extracto (Reis et al., 2012).

3. Resultados

Análisis CG-MS de principales compuestos pirrólicos

Por CG-MS se constató de la presencia de tres compuestos pirrólicos que variaron en relación a su abundancia para cada extracto fúngico, obtenido tanto del micelio como del medio de cultivo, bajo diferentes tratamientos.

De los extractos obtenidos del medio de cultivo, para *Cordyceps cuncunae*, se detectó la presencia de los 3 compuestos detallados en la tabla 1 bajo radiación y sin irradiar (control). El porcentaje de abundancia para el compuesto 1, 2 y 3 fue de un 25.9%, 66.8% y 7.2%, respectivamente en el control y de 23.2%, 75.1% y 1.6% bajo radiación UV-B. En *Armillaria sparraei*, se observaron dos compuestos pirrólicos, correspondientes al compuesto número 1 con abundancia de un 40% y compuesto número 2 con abundancia de un 59.9% en el control. No se detectaron diferencias significativas en los porcentajes de abundancia obtenidos bajo radiación UV-B ya que fueron similares a lo obtenido en el control.

En *Serpula himantioides*, solo fue detectado un compuesto pirrólico, correspondiente al compuesto N° 1 tanto en condiciones irradiadas como en el control (Tabla 1).

De los extractos obtenidos del micelio de *Cordyceps cuncunae*, se detectó la presencia de los 3 compuestos que se detallan en la tabla 1 bajo radiación y sin irradiar (control). El porcentaje de abundancia presentó diferencias en cada tratamiento. En el control, las abundancias para los compuestos 1, 2 y 3 fueron de un 23.5 %, 31.3 % y un 45.1 %, respectivamente y de un 40.2%, 13.9% y 45.8% bajo radiación UV-B. En *Armillaria sparraei* se detectó un compuesto pirrólico, bajo radiación y sin irradiar (control), correspondiente al compuesto N° 3 (Tabla 1).

En *Serpula himantioides*, se detectó el compuesto N° 1 en cultivos irradiados, a diferencia de, lo obtenido en cultivos sin irradiar (control), se detectó el compuesto N° 3 (Tabla 1).

Tabla 1: Principales compuestos pirrólicos detectados en cultivo y micelio bajo los diferentes tratamientos. Fuente: Elaboración propia.

Nº	Compuestos	Fórmula molecular	m/z (u.m.a)	RT (min)
1	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	154.166	14.314
2	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,1-dione-3-Methylhexahydro	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂	168.193	14.489
3	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	210.272	15.915

Las estructuras de los compuestos pirrólicos cuya presencia fue constatada por CG-MS se detallan en la figura 1. Su estructura es constituida por un anillo aromático de 5 miembros, con un heteroátomo que corresponde al nitrógeno.

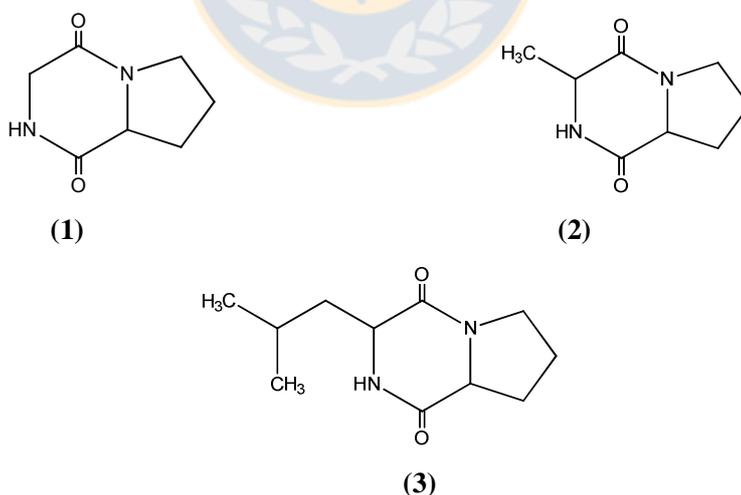


Figura 1: Estructura de los principales compuestos pirrólicos detectados bajo cultivos *in vitro*. Fuente: Elaboración propia.

Caracterización química de pigmentos fenólicos de *Serpula himantioides*

En el cromatograma LC-MS del extracto total obtenido del medio de cultivo, se detectaron dos pigmentos fenólicos con diferencias en su abundancia relativa. Un compuesto de mayor abundancia con tiempo de retención 14,34 minutos que correspondió al pigmento fenólico Ácido xerocómico (Figura 2). Un segundo pigmento de baja abundancia fue detectado bajo condiciones de radiación UV-B a un tiempo de retención 13,73 minutos. Dicho compuesto correspondió a un pigmento fenólico Ácido variegático; Sin embargo la abundancia de dicho compuesto varió en el extracto total obtenido del micelio con un porcentaje cercano al 25% bajo condiciones UV-B (datos no mostrados).

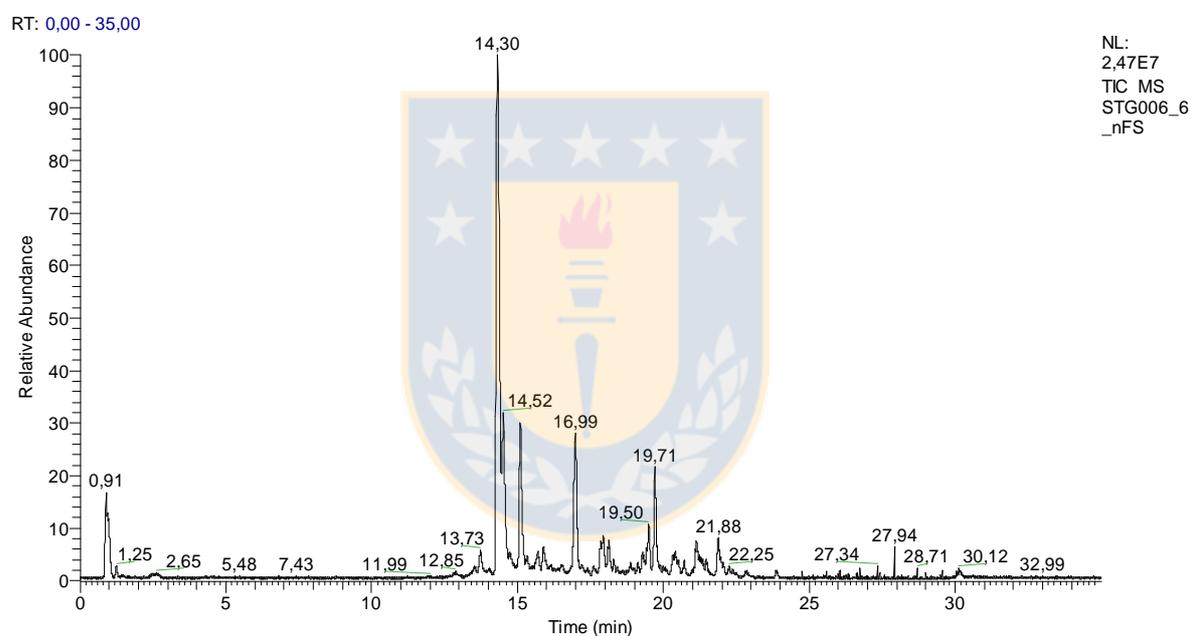
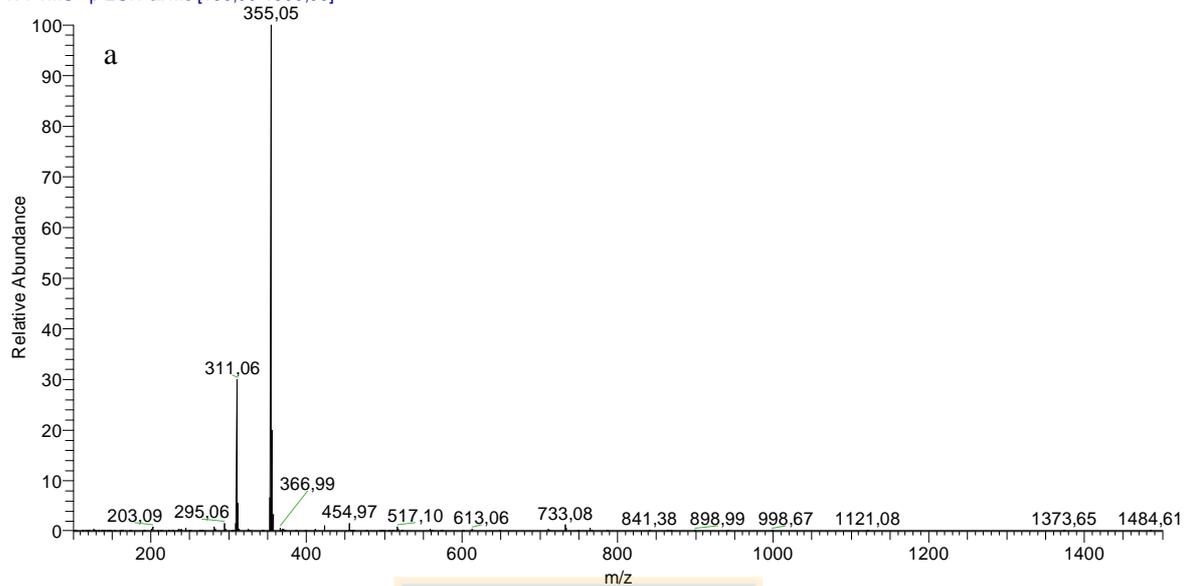


Figura 2: Cromatograma LC-MS de extracto total obtenido en medio de cultivo de *Serpula himantioides* bajo radiación UV-B. Fuente: Elaboración propia.

El compuesto fenólico de mayor abundancia relativa presentó un m/z de 355.05 (Figura 3a) y el de menor abundancia presentó un m/z de 371.04 (Figura 3b).

STG006_6_nFS #5845 RT: 14,55 AV: 1 NL: 2,67E6
T: FTMS - p ESI Full ms [100,00-1500,00]



STG006_6_nFS #5501 RT: 13,69 AV: 1 NL: 4,25E5
T: FTMS - p ESI Full ms [100,00-1500,00]

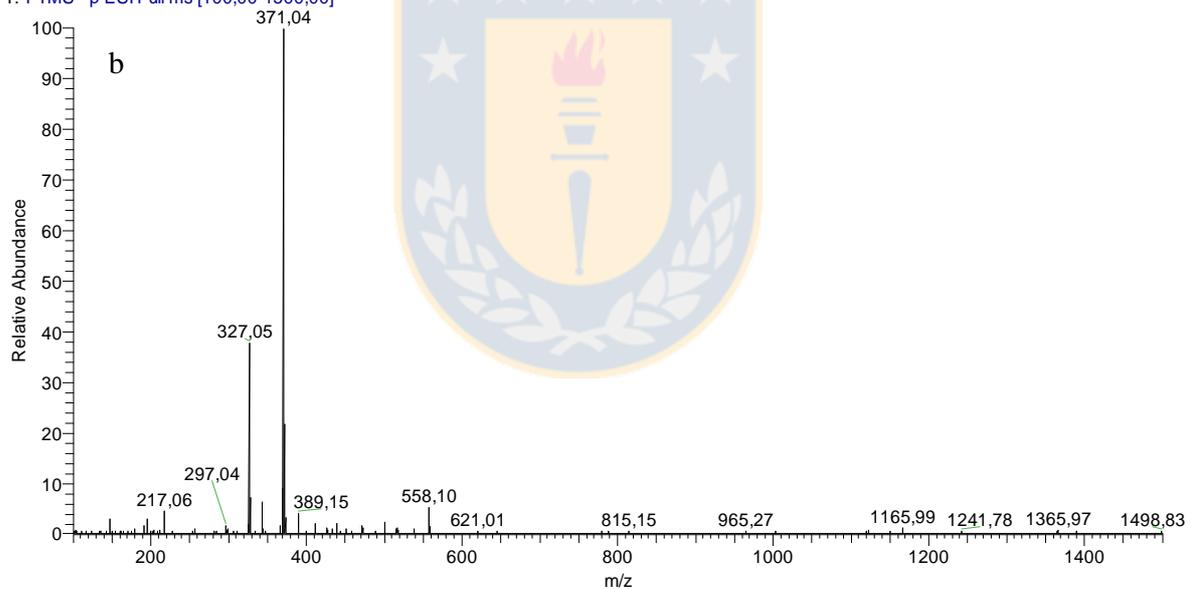


Figura 3: Espectro de masas (modo de iones negativo) de los pigmentos detectados en cultivos de *Serpula himantoides*. a) m/z del Ácido xerocómico y b) m/z del Ácido variegático. Fuente: Elaboración propia.

Por cromatografía capa fina, se analizó la fracción conteniendo ambos pigmentos que fueron los compuestos fenólicos detectados en cultivos de *Serpula himantioides*. Un pigmento de mayor abundancia fue ácido xerocómico y de menor abundancia es el ácido variegático. Ambos pigmentos presentaron diferentes Rf (Tabla 2).

Tabla 2: Propiedades de derivados del ácido pulvínico en Boletales. Fuente: Elaboración propia.

Pigmento	Color en TLC	Rf ^a TLC	Color en TLC K ₃ FeCN ₆ :NaHCO ₃
Acido xerocómico	Amarillo	0.51	Azul
Ácido variegático	Amarillo	0.33	Azul

^aSilica gel Merck Kieselgel F254 (Formiato etilo: Tolueno: Ácido fórmico=7:4:1)

El rendimiento total de los pigmentos puros fue de 7 mg para el pigmento puro obtenido de cultivos sin irradiar (Figura 4b) y de 13 mg para el pigmento puro obtenido de cultivos irradiados (Figura 4c).

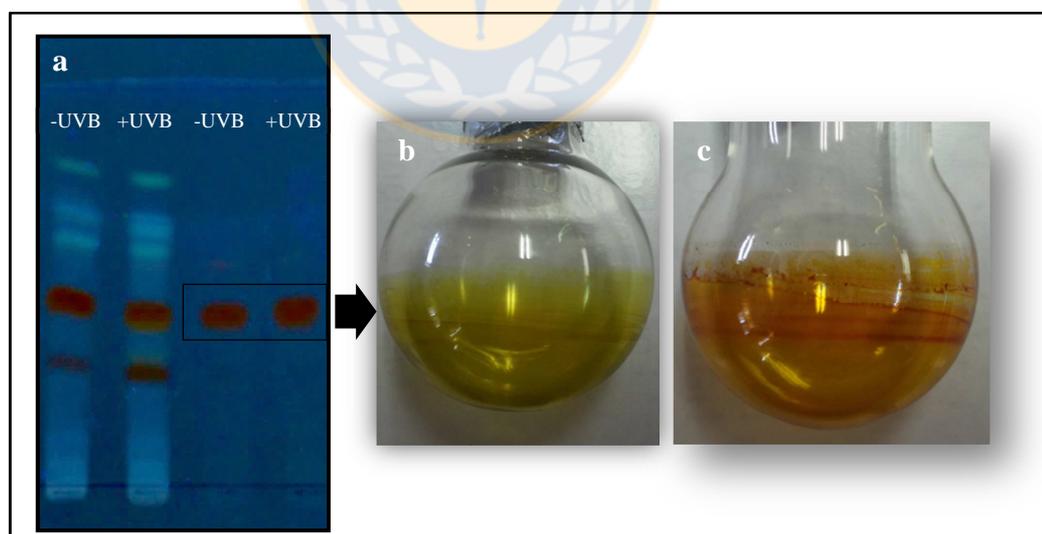


Figura 4: Caracterización de pigmentos por cromatografía capa fina. a) TLC de extractos totales obtenidos de *Serpula himantioides* bajo cultivos *in vitro* irradiados (+UVB) y sin irradiar (-UVB), b) Ácido xerocómico obtenido de cultivo sin irradiar y c) Ácido xerocómico obtenido de cultivos irradiados. Fuente: Elaboración propia.

Por HPLC se analizó la fracción conteniendo dos pigmentos sintetizados en cultivos de *Serpula himantioides*. El primer peak corresponde a un tiempo de retención de 7,86 minutos y corresponde al ácido variegático. El segundo peak más abundante a un tiempo de retención de 10,48 minutos correspondió al ácido xerocómico (Figura 5).

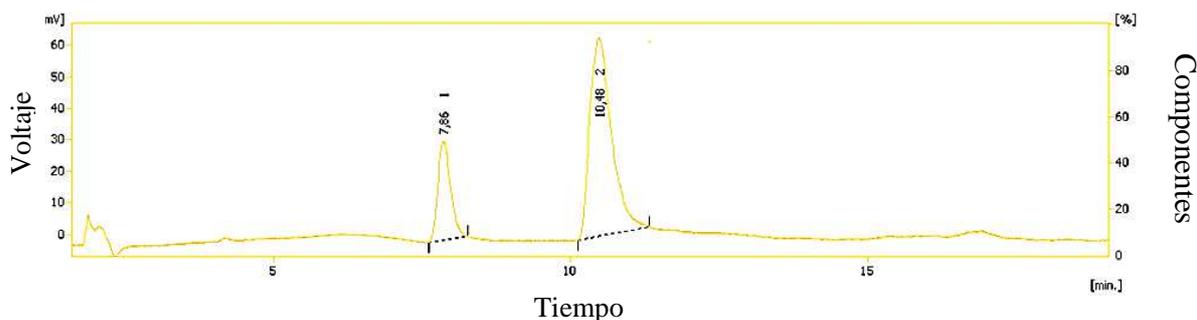
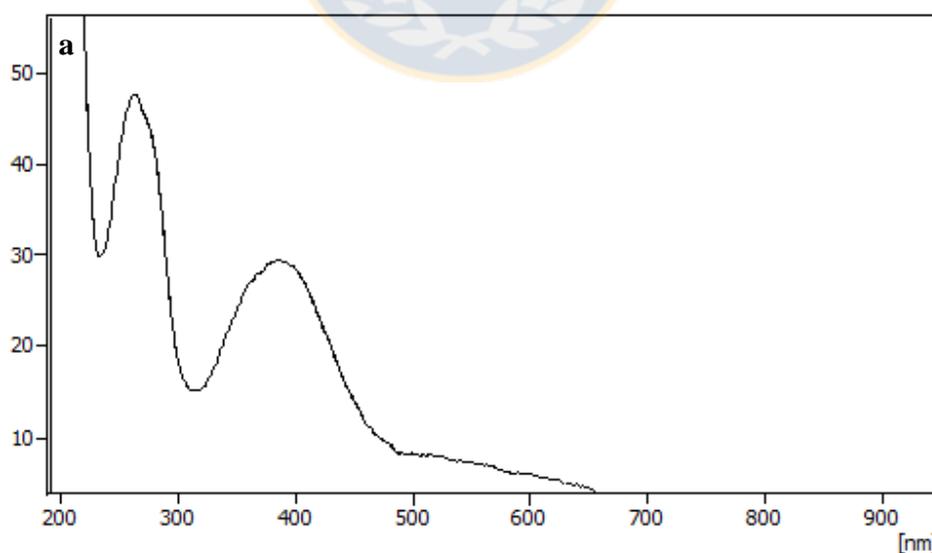


Figura 5: Cromatograma HPLC-DAD de fracción conteniendo pigmentos: Ácido variegático (tR: 7,86 min) y Ácido xerocómico (tR: 10,48 min). Fuente: Elaboración propia.

Similares espectros de absorción fueron detectados en ambos pigmentos aislados. El ácido variegático presentó un peak de absorción máxima a los 262 y 385 nm (Figura 6a). El ácido xerocómico presentó un peak de absorción máxima de 258 y 390 nm (Figura 6b).



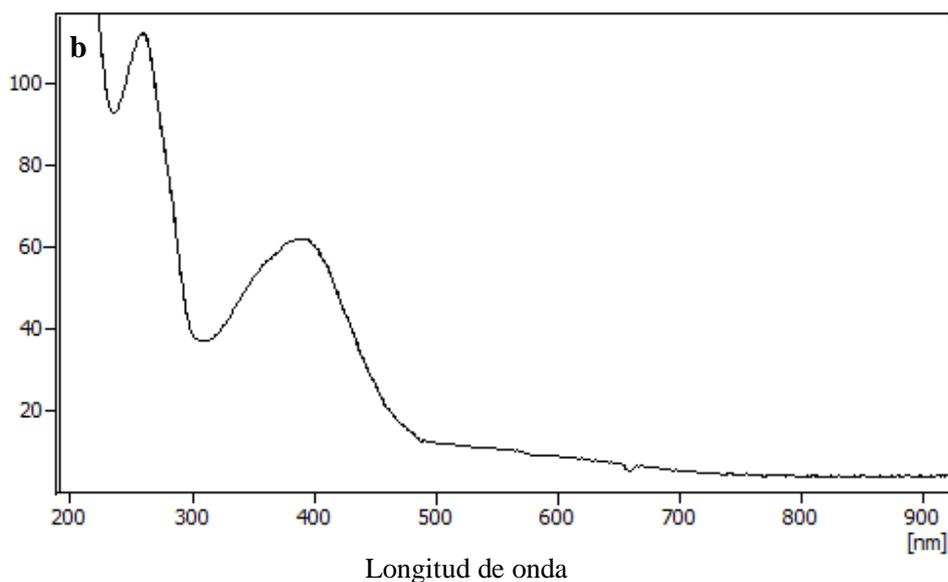
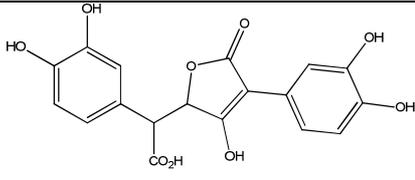
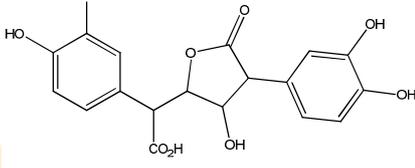


Figura 6: Espectro de absorción de las fracciones obtenidas de cutivos irradiados. A) Ácido variegático (7.874 min) y b) Ácido xerocómico (10,491 min). Fuente: Elaboración propia.

Los principales metabolitos secundarios detectados en *Serpula himantioides*, correspondieron a pigmentos derivados del ácido pulvínico, característicos del orden Boletales. El pigmento de mayor abundancia fue purificado para la evaluación de actividad antioxidante.

Bajo condiciones de radiación UV-B se observó un incremento en la síntesis de ambos pigmentos, siendo el ácido xerocómico el pigmento de mayor abundancia como se observó previamente. La caracterización química así como su estructura son detalladas en la tabla 3.

Tabla 3: Pigmentos detectados en cultivos *in vitro* de *Serpula himantioides*. Fuente: Elaboración propia.

Pigmentos	Tiempo retención (min)	Masa molecular	Formula molecular	Estructura
Ácido variegático	13,73	372.29	C ₁₈ H ₁₂ O ₉	
Ácido xerocómico	14,34	356.05	C ₁₈ H ₁₂ O ₈	

Evaluación de la actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante para los diferentes extractos totales obtenidos tanto del medio de cultivo como del micelio bajo condiciones de radiación UV-B y sin irradiar (control). El EC₅₀ que corresponde a la concentración capaz de inhibir el 50% del radical fue determinado.

En el DPPH, los valores más bajos de EC₅₀ fueron para *Serpula himantioides*, por lo que se deduce que presentó mayor capacidad antioxidante. Bajo condiciones de radiación el EC₅₀ fue de un 0,88 mg/mL y para el control fue de un 0,77mg/mL. *Cordyceps cuncunae* presentó un EC₅₀ de 4,79 mg/mL en UV y de 8,44 mg/mL en el control.

En ABTS, valores de EC₅₀ más bajos fueron para *Serpula himantioides* y *Armillaria sparrei*, sin detectarse mayores diferencias significativas entre los tratamientos.

De cada extracto se determinó el contenido de fenoles medidos en mg GAE/g de extracto. Los valores de concentración mas alta correspondio a *Serpula himantioides* con 472,41 mg GAE/g extracto en condiciones control y 457,59 mg GAE/g extracto en condiciones de radiación UV (Tabla 4).

Tabla 4: Actividad antioxidante y determinación de fenoles en extractos obtenidos del medio de cultivo. Fuente: Elaboración propia.

Especies	Tratamiento	Actividad antioxidante		Poder reductor
		DPPH EC ₅₀ (mg/mL)	ABTS EC ₅₀ (mg/mL)	Folin (mg GAE/g extracto)
<i>Armillaria sparrei</i>	Control	28,47 ± 0,003	0,3 ± 0,01	397, 61 ± 0,02
<i>Armillaria sparrei</i>	UV	31,99 ± 0,01	0,25 ± 0,01	479,09 ± 0,02
<i>Cordyceps cuncunae</i>	Control	8,44 ± 0,01	0,44 ± 0,01	212,22 ± 0,003
<i>Cordyceps cuncunae</i>	UV	4,79 ± 0,01	0,34 ± 0,003	221,48 ± 0,004
<i>Serpula himantioides</i>	Control	0,77 ± 0,01	0,25 ± 0,01	472,41 ± 0,01
<i>Serpula himantioides</i>	UV	0,88 ± 0,003	0,24 ± 0,1	457,59 ± 0,01
<i>Trolox</i>	-	-	0,028 ± 0,04	-

EC₅₀: Concentración necesaria de los extractos para inhibir el 50% del radical empleado. Valores son el promedio de tres réplicas ±SD.

En el micelio, los valores más bajos de EC₅₀ en el DPPH fueron para *Serpula himantioides*, por lo que se deduce que presentó mayor capacidad antioxidante. Bajo condiciones de radiación, el EC₅₀ fue de un 3,15 mg/mL y para el control fue de un 8,87 mg/mL. *Cordyceps cuncunae* presento un EC₅₀ de 5,63 mg/mL en UV y de 22,46 mg/mL en el control.

En ABTS, valores de EC₅₀ más bajos fueron para *Cordyceps cuncunae* y *Armillaria sparrei*, con valores de 0,6 mg/mL bajo condiciones de radiación UV.

De cada extracto se determinó el contenido de fenoles medidos en mg GAE/g de extracto. Los valores de concentración más alta correspondieron a *Serpula himantioides* con 216, 85 GAE/g extracto en condiciones control y 290, 92 mg GAE/g extracto en condiciones de radiación UV (Tabla 5).

Tabla 5: Actividad antioxidante y determinación de fenoles en extractos obtenidos del micelio. Fuente: Elaboración propia.

Especies	Tratamiento	Actividad antioxidante		Poder reductor
		DPPH EC ₅₀ (mg/mL)	ABTS EC ₅₀ (mg/mL)	Folin (mg GAE/g extracto)
<i>Armillaria sparrei</i>	Control	59,63 ± 0,003	0,71 ± 0,01	28,72 ± 0,01
<i>Armillaria sparrei</i>	UV	58,38 ± 0,003	0,67 ± 0,01	212,43 ± 0,001
<i>Cordyceps cuncunae</i>	Control	22,46 ± 0,01	0,47 ± 0,03	169,63 ± 0,1
<i>Cordyceps cuncunae</i>	UV	5,63 ± 0,003	0,61 ± 0,004	126,11 ± 0,1
<i>Serpula himantioides</i>	Control	8,87 ± 0,005	2,80 ± 0,004	216,85 ± 0,01
<i>Serpula himantioides</i>	UV	3,15 ± 0,003	0,63 ± 0,04	290,92 ± 0,003
<i>Trolox</i>	-	-	0,028 ± 0,04	-

EC₅₀: Concentración necesaria de los extractos para inhibir el 50% del radical empleado. Valores son el promedio de tres réplicas ±SD.

El pigmento puro aislado de cultivos *in vitro* de *Serpula himantioides*, presentó mayor actividad antioxidante el pigmento obtenido de cultivos *in vitro* irradiados. En DPPH, valores de EC₅₀ fueron más bajas en el UV (0,34 mg/mL) a diferencia de lo obtenido en el control (0,85 mg/mL).

En ABTS, se observó la misma tendencia. El EC₅₀ del pigmento obtenido bajo condiciones UV fue inferior (0,036 mg/mL) a lo obtenido en condiciones control (0,044 mg/mL) (Tabla 6).

Tabla 6: Actividad antioxidante del pigmento Ácido xerocómico. Fuente: Elaboración propia.

Pigmento	Tratamiento	Actividad antioxidante	
		DPPH EC ₅₀ (mg/mL)	ABTS EC ₅₀ (mg/mL)
Ácido xerocómico	Control	0,85 ± 0,01	0,044 ± 0,01
Ácido xerocómico	UV	0,34 ± 0,01	0,036 ± 0,01
Trolox	-	-	0,028 ± 0,04

EC₅₀: Concentración necesaria del pigmento para inhibir el 50% del radical empleado. Valores son el promedio de tres réplicas ±SD.

4. Discusión

Una temática de interés es lo relacionado a la disminución del ozono estratosférico que trae consigo que elevadas dosis de radiación UVB afecten a diversos ecosistemas. En estos ecosistemas, muchos organismos deben enfrentar el estrés que se genera al estar expuesto a la radiación ultravioleta, teniendo que adaptarse tanto morfológica como fisiológicamente. Sin embargo, no solo este tipo de cambios generan los organismos. También existe una respuesta que involucra parámetros bioquímicos relacionados a la producción de metabolitos primarios y secundarios. De este último tema, existen diferentes estudios que se han dedicado a investigar las respuestas del tipo químicas que generan los organismos como respuestas defensivas.

En este capítulo, lo primero en determinar fue la variación de los compuestos pirrólicos en los extractos totales de los hongos cultivados en condiciones *in vitro* y estas variaciones en la abundancia de dichos compuestos pueden ser el reflejo de los efectos de la radiación UV-B. Está reportado que la luz puede inducir o activar un cierto tipo de vías metabólicas para producir un determinado compuesto (Tisch y Schmoll 2010). De acuerdo a esto, se puede inferir que los compuestos pirrólicos detectados en cultivos de *Cordyceps cuncunae* fueron sintetizados en mayor abundancia por la influencia de la radiación UV-B en comparación a los extractos obtenidos del control. Estos resultados son comparables a lo que ocurre en plantas expuestas a la radiación UV-B donde la síntesis de flavonoides es iniciada por un incremento de diferentes enzimas que forman parte de la vía biosintética de estos compuestos (Taupp et al., 2008).

Por otro lado, hay otro grupo de compuestos de interés que se han estudiado y que hacen mención a la acumulación de compuestos fotoprotectores a nivel celular. Se ha observado que pigmentos del tipo carotenoides están distribuidos a nivel de la pared celular de las especies fúngicas, otorgando una mayor protección frente a la incidencia directa de la radiación UV. En este capítulo, se pudo corroborar que la síntesis de un pigmento derivado del ácido púlvínico obtenido de *Serpula himantioides* bajo radiación UV, se vio incrementada y está correlacionada con altas dosis de radiación UV. De acuerdo a la literatura, el pigmento fue identificado como Ácido xerocómico (Gill y Steglich, 1987).

Un segundo pigmento de menor abundancia fue detectado en cultivos *in vitro* de *Serpula himantioides*. Dicho pigmento también se incrementa bajo radiación UV-B, pero con una abundancia cercana al 20% en comparación al ácido xerocómico de abundancia cercana al 80%. Este pigmento fue identificado como Ácido variegático. Ambos pigmentos son derivados del Ácido pulvínico y están presentes en hongos del orden Boletales (Huang et al., 2009).

De acuerdo a las respuestas químicas generadas por los hongos, se deduce que la síntesis de pigmentos bajo irradianza tiene mayor significancia al inferir que pueden actuar como un fotoprotector celular cuando el hongo se expone a la radiación UV.

Otros organismos también estudiados y que crecen en ambientes de estrés ambiental, son los líquenes. En estos organismos se ha reportado respuestas análogas a lo que ocurre en hongos y que van relacionadas a la acumulación de metabolitos UV-protectores. Un mecanismo protector importante es la producción de metabolitos tales como compuestos fenólicos (depsidonas, depsidas, difenil éter), antraquinonas, xantonas o derivados de shikimato. Estos metabolitos están presentes en la superficie de las hifas, con una mayor acumulación en las partes del tallo superior (Nguyen et al., 2013).

En forma concomitante con la síntesis de compuestos bajo radiación UV-B, se observó mayor capacidad antioxidante frente a condiciones de radiación UV. *Serpula himantioides* presentó mayor actividad detectada en los ensayos DPPH y ABTS estando dicha actividad estrechamente relacionada con el incremento de los pigmentos detectados bajo condiciones UV.

Basado en lo anteriormente expuesto y a lo observado en los extractos crudos de las especies analizadas, la presencia de compuestos pirrólicos y la naturaleza estructural de estos compuestos, también presentan una estrecha la relación entre esta clase de compuestos y la actividad antioxidante (MacLean et al., 2008). Una explicación a esto, va relacionada con el efecto indirecto que la radiación UV-B produce, ya que genera estrés oxidativo a nivel celular, por lo que no solo se activan enzimas que participan en las rutas biosintéticas de metabolitos fotoprotectores, sino que además enzimas tales como la superóxido dismutasa y catalasa son activadas para contrarrestar la presencia de radicales libres generados por la radiación UV (Gessler et al., 2002).

Finalmente, las variaciones en la producción de estos protectores UV naturales dependen de las condiciones ambientales bajo las cuales crecen los hongos en donde su éxito evolutivo no es sólo debido al metabolismo versátil que presentan sino además a la capacidad de adaptarse a las diversas condiciones ambientales.



5. Bibliografía

Becerra J, Silva M, Becerra J (2014) Efecto de la Radiación UVB en el Crecimiento y Actividad Biológica de Hongos Saprófitos Subantárticos de Chile. *Revista Latinoamericana de Química* 42: 77-81.

Dimitrova S, Pavlova K, Lukanov L, Korotkova E, Petrova E, Zagorchev P, Kuncheva M (2013) Production of Metabolites with Antioxidant and Emulsifying Properties by Antarctic Strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL₁. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169: 301-311.

Frohnmeier H, Staiger D (2003) Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants. Balancing Damage and Protection. *Plant Physiology* 133: 1420-1428.

Gao Q, Garcia F (2011) Microbial ultraviolet sunscreens. *Nature Reviews Microbiology* 9: 791-802.

Gessler N, Sokolov A, Bykhovsky V, Belozerskaya T (2002) Superoxide Dismutase and Catalase Activities in Carotenoid Synthesizing Fungi *Blakeslea trispora* and *Neurospora crassa* Fungi in Oxidative Stress. *Applied Biochemistry and Microbiology* 38: 205-209.

Gill M, Steglich W (1987) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer-Verlag Berlin, Germany. 322 pp.

Hahlbrock K, Scheel D (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Biology* 40: 347-369.

Huang Y, Onose J, Abe N, Yoshikawa K (2009) In Vitro Inhibitory Effects of Pulvinic Acid Derivates Isolated from Chinese Edible Mushrooms, *Boletus calopus* and *Suillus bovinus*, on Cytochrome P450 Activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73: 855-860.

Korbee N, Figueroa F, Aguilera J (2006) Acumulación de aminoácidos tipo micospolina (MAAs): biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. *Revista Chilena de Historia Natural* 79: 119-132.

Libkind D, Moliné M, Sampaio J, Van Broock M (2009) Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation. *FEMS Microbiology Ecology* 69: 353-362.

Libkind D, Moline M, van Broock M (2011) Production of the UVB-absorbing compound mycosporine-glutaminol-glucoside by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *FEMS Yeast Research* 11: 52-59.

MacLean P, Chapman E, Dobrowolski S, Thompson A, Barclay L (2008) Pyrroles As Antioxidants: Solvent Effects and the Nature of the Attacking Radical on Antioxidant Activities and Mechanisms of Pyrroles, Dipyrinones, and Bile Pigments. *The Journal of Organic Chemistry* 73: 6623-6635.

Moliné M, Libkind D, Diéguez M, van Broock M (2009) Photoprotective role of carotenoids in yeasts: Response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 95: 156-161.

Nguyen K, Chollet M, Gouault N, Tomasi S (2013) UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Natural Product Reports* 30: 1490- 1508.

Ravindran K, Indrajith A, Pratheesh P, Sanjiviraja K, Balakrishnan V (2010) Effect of ultraviolet-B radiation on biochemical and antioxidant defence system in *Indigofera tinctoria* L. seedlings. *International Journal of Engineering, Science and Technology* 2: 226-232.

Reboredo F, Lidon F (2012) UV-B radiation effects on terrestrial plants – A perspective. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 24: 502-509.

Reis F, Martins A, Barros L, Ferreira I (2012) Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples. *Food and Chemical Toxicology* 50: 1201-1207.

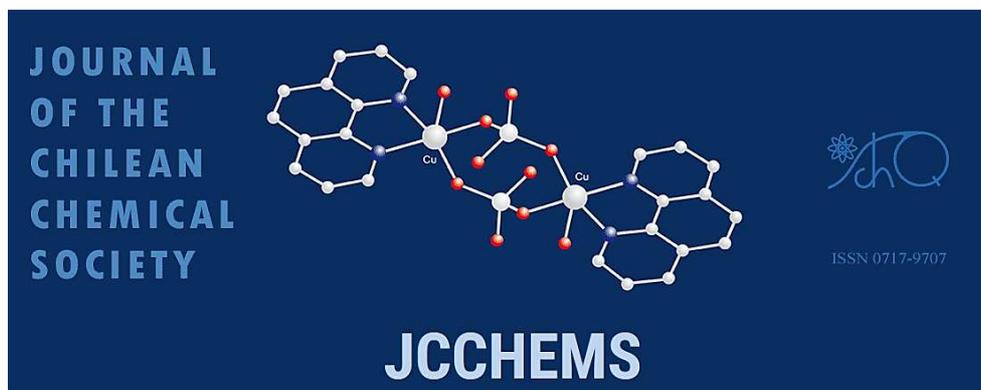
Sugiharto S, Yudiarti T, Isroli I (2016) Assay of Antioxidant Potential of Two Filamentous Fungi Isolated from the Indonesian Fermented Dried Cassava. *Antioxidants* 5: 1-6.

Taupp D, Nimtz M, Berger R, Zorn H (2008) Stress response of *Nidula niveo-tomentosa* to UV-A light. *Mycologia* 100: 529-538.

Tegelberg R, Aphalo P, Julkunen-Tiitto R (2002) The Effect of long-Term, elevated ultraviolet-B radiation on phytochemicals in the bark of silver birch (*Betula pendula*). *Tree Physiology* 22: 1257-1263.

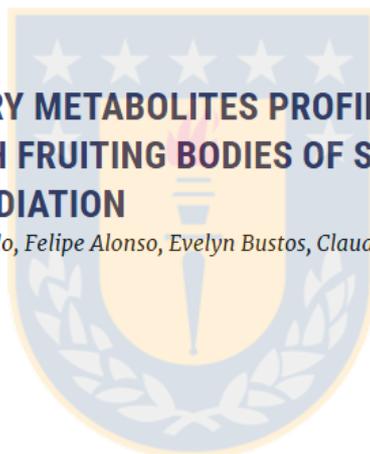
Tisch D, Schmoll M (2010) Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1259-1277.

Umashankar T, Govindappa M, Ramachandra Y (2014) *In vitro* antioxidant and antimicrobial activity of partially purified coumarins from fungal endophytes of *Crotalaria pallida*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3: 58-72.



CHANGES IN SECONDARY METABOLITES PROFILES AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE FRESH FRUITING BODIES OF *Stereum hirsutum* EXPOSED TO HIGH-DOSE UV-B RADIATION

Solange Torres, Jaime R. Cabrera Pardo, Felipe Alonso, Evelyn Bustos, Claudia Pérez, Goetz Palfner, Víctor Hernández, Eugenio Uriarte, José Becerra



Capítulo IV

Changes in secondary metabolites profiles and biological activity of the fresh fruiting bodies of *Stereum hirsutum* exposed to high-dose UV-B radiation

SOLANGE TORRES^a- JAIME R. CABRERA-PARDO^a- FELIPE ALONSO^a - EVELYN BUSTOS^a - CLAUDIA PÉREZ^a, GOETZ PALFNER^b - VÍCTOR HERNÁNDEZ^a - EUGENIO URIARTE^c - JOSÉ BECERRA^{a*}

a Laboratory of Chemistry of Natural Products, Department of Botany, University of Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

b Laboratory of Micology and Mycorrhizae, Department of Botany, University of Concepción, Concepción, Chile.

c Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela. 15782, Santiago de Compostela, Spain.

ABSTRACT

The present study aims to investigate the effects of ultraviolet radiation (type B) on the steroid and fatty acids content, phenolic compounds and biological activities of *Stereum hirsutum* wild fruiting bodies, which has been used by both Chinese and Korean folk medicine to treat cancer and recently as functional food. From another perspective, the distribution of steroid derivatives as well as fatty acids underwent significant changes after UV exposure over time. In our model of study UV-B radiation induced a decrease in the relative abundance of ergosterol derivatives while squalene increased. We also detected that UVB radiation (1.2 W m²) enhanced the antioxidant activity of *Stereum hirsutum*, with the acetonic extract after 48 hours of radiation the most efficient with a half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 339.9 µg/mL. Gas-mass chromatography (GC-MS) analysis at this 48 hours stage revealed a high content of phenolic compounds (70%). We observed a decrease in the antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* compared to their respective controls. The study concludes that UV-B influences the pathway of secondary metabolites to induce changes metabolic in the composition of sterols and fatty acids and increasing the abundance of antioxidant compounds in *S. hirsutum*.

Keywords: saprophytic fungi; UV-B radiation; secondary metabolites; antibacterial properties; antioxidant activity.

1. Introduction

The current climate change is a global phenomenon characterized by a variety of factors including alteration in temperatures, carbon dioxide concentrations and increased surface ultraviolet-B (UV-B 290-320nm) radiation. ¹ High exposure to UV-B rays produces negative effects in microorganisms by damaging DNA and biological membranes, altering metabolite production and causing morphogenetic modifications. ² In spite of this, the metabolic plasticity of microorganisms, especially fungi, enhances their ability to survive under the oxidant environment produced by UV-B radiation. To better understand this plasticity, efforts have been made to investigate the metabolic responses in fungi upon UV energy exposure. These endeavours have shown that UV radiation promotes the conversion of ergosterol to vitamin D₂. ³ Due to its beneficial implications, this process has been investigated aiming to maximize the amount of vitamin D₂ in edible mushrooms. ^{4,5}

The south Chilean environment presents special climate conditions that house a unique microorganism community. ⁶ Currently, around 3,000 fungi species have been identified in southern Chile and the actual number of fungi species inhabiting this territory could easily reach 30,000. Macrofungi such as Ascomycota and Basidiomycota can be found across the country, ⁷ providing an extensive biological source to investigate the effect of environmental stressors (e.g. UV-B radiation) on fungal metabolic profiles.

Stereum hirsutum is a basidiomycete directly involved in Esca, a destructive disease in grapevine. This ubiquitous microorganism lives on deadwood, hardwood or dead leaves, ⁸ playing an important role in the wood degradation process. *S. hirsutum* successfully lives throughout Chile and has shown both relevant biological activity and nutraceutical properties. Due to this, recently been reported that *S. hirsutum* could be used as functional food. ⁹ In the course of our research program investigating fungi metabolites from Chilean environments we became interested in exploring the effect of UV-B exposure on both the metabolites profile and antioxidant and antibacterial activities of *S. hirsutum* wild fruiting bodies.

2. Materials and Methods

Sampling

Fresh fruiting bodies of *Stereum hirsutum* were collected from the dead wood in a native forest of *Nothofagus* species located in the Bío Bío province in the South-Central Chile (latitude, 36°50'15.7" S and longitude, 73°01'30.8" WO). A sample of *S. hirsutum* was identified according to the wood substrate in which the organism was found and the macroscopic characteristics of its fruiting bodies. These included orange color, upper surface covered with villi and the lower, bright orange coloured surface.

Exposure to UV-B

Fruiting bodies of *S. hirsutum* growing on wood of *Nothofagus* were irradiated with a UV-B lamp (Broadband TL20W/12 RS SLV, Philips), at 1.2 W m⁻² during 48 h. Samples (1.5 g of carpophore) were subjected to radiation at different times (0, 6, 24 and 48 h), affording the total extracts. The radiation source was positioned at 40 cm from the samples in study. The control experiment (time 0) corresponds to the sample that was not exposed to radiation.¹⁰

Obtention extracts from *S. hirsutum* fruiting bodies

The samples previously obtained were extracted with 10 mL of acetone. The extraction process required 5 min of sonication followed by filtration. The organic solvent was then evaporated under vacuum using a rotary evaporator (Heidolph), obtaining the following crude yields for each sample: 0 h (5 mg), 6 h (3.6 mg), 24 h (3.8 mg) y 48 h (3.5 mg). These extracts were dissolved in ethyl acetate (1 mL) and injected to a GC-MS for analysis.

Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis

The irradiated and non-irradiated acetonic extracts were analysed with a gas chromatograph (Agilent 7890) mass spectrometer detector (Agilent 5975) equipped with an automatic Agilent injector and a capillary column HP5-MS (J&W Scientific capillary column 30 m x 0.25 mm id and a melted silica film with thickness of 0.25 mm). Helium was used as carrier gas, using a 1.5 mL/min flow. The initial temperature was 60 °C during 5 minutes. The temperature increased in an 8 °C/min pace until 250 °C, steadied for 15 min. The temperature of the injector and detector, in scan mode, was set at 250 °C and 300 °C, respectively. The mass range scanned covered from 50 to 500 amu. The electron impact ionization mode was set at

70 eV. The structure of the reported compounds was assessed by comparing the obtained fragmentation patterns with the NIST.05 Chemstation database. The chromatograms were analysed and abundance relative percentages of the compounds were calculated. The structures of the compounds were designed using the program ACD/ChemSketch.

Antibacterial activity

The agar diffusion test was employed to assess the biological activity of the acetonc extracts against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium*. These microorganisms were grown in trypticase soy broth during 24 h at 37 °C. Petri dishes containing trypticase agar were inoculated using a bacterial suspension of 10⁸ UFC/mL. Paper discs containing 60 µg of acetonc extract were deposited onto the previously prepared dishes.¹¹ Methanol + Tween 1% and imipenem (10 µg/mL) were used as negative and positive control, respectively.

DPPH scavenging activity assay

The antioxidant activity of the extracts was measured on the basis of the scavenging activity of the stable 1, 1- diphenyl 2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical according to the method described in the literature with slight modifications.¹² 1 mL of 100 µM DPPH solution in methanol was mixed with 50 µL of acetonc extracts of varying concentrations (100, 300, 600 y 900 µg/ mL). TROLOX solution were added to 1 mL of DPPH (100 µM) and was used as reference standard. Methanol served as blank sample and mixture of 1 mL solvent and 1 mL DPPH solution was used as control. The reaction was carried out in triplicate and the decrease in absorbance was measured at 517 nm after 30 minutes in dark using UV-Vis spectrophotometer. The inhibition % was calculated using the following formula:

$$\text{DPPH Scavenging effect (\%)} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

A_{Control}: is the absorbance of the control

A_{Sample}: is the absorbance of the simple

3. Results and Discussion

Wild fruiting bodies of *S. hirsutum* were obtained near the University of Concepcion, Concepcion Chile. The acetonic extract of the fruiting bodies was used for GC-MS analysis of metabolites. Figure 1 shows the relative abundance of ergosterol derivatives and squalene at 0, 6 and 24 h of UV-B radiation time. Before UV-B radiation, the steroids profile is the following: squalene (6.5%), dehydroergosterol acetate (4.5%), dehydroergosterol (4.8%), ergosterol (39%), dyhydroergosterol (2.2 %) and ergostenol (3.4%) (Figure 2). The steroid distribution suffers changes upon UV-B radiation exposure. The relative abundance of ergosterol and its derivatives decreases over time, illustrated by the following data after 24 h of UV-B radiation: dehydroergosterol acetate (2.7%), dehydroergosterol (2.1%), ergosterol, dyhydroergosterol and ergostenol are almost undetectable. On the contrary, GC-MS analysis of *S. hirsutum* after 24 h of irradiation reveals an increase in squalene abundance (18.6%).

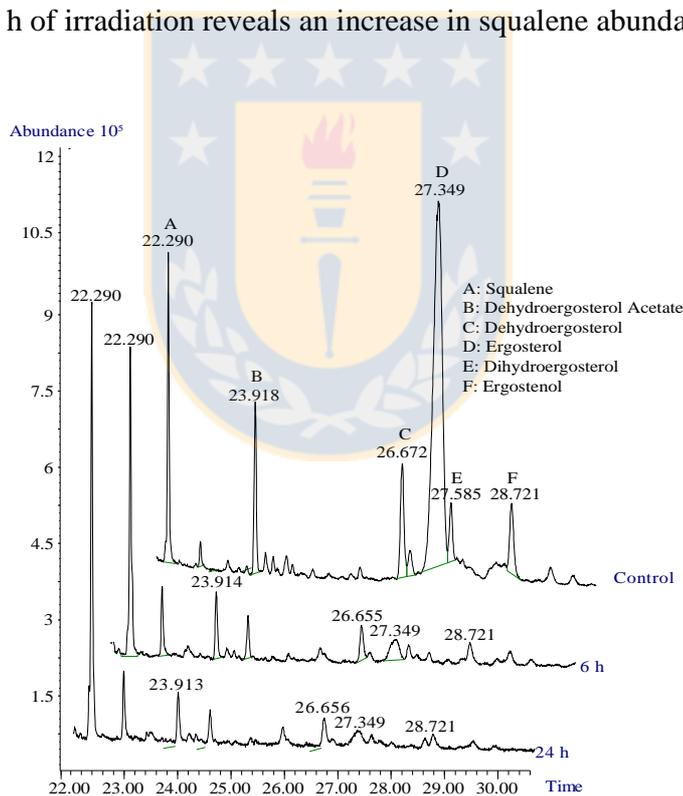


Figure 1: GC-MS steroid profile of *S. hirsutum* at different UV radiation times. Source: Self-elaboration.

It has been well documented that UV-B energy promotes the conversion of ergosterol to vitamin D₂ in fungi, which could lead to subsequent squalene depletion after UV-B exposure.

Our results nonetheless suggest that UV-B radiation might be affecting the ergosterol biosynthetic pathway, resulting in the accumulation of squalene, according to GC-MS data. Crucial experiments to definitively address this observation are currently in progress and will be reported at due course.

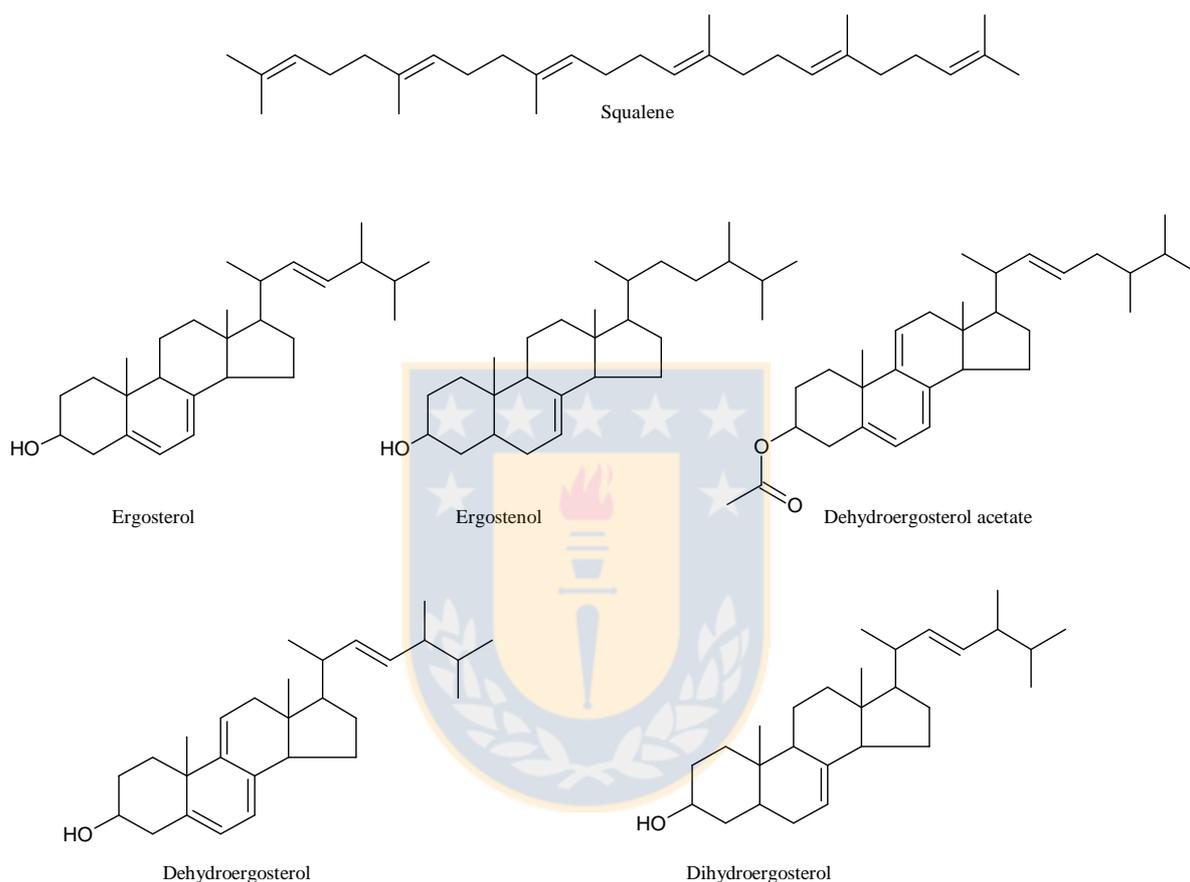


Figure 2: Sterol structures present in the acetonic extract before UV-B radiation. Source: Self-elaboration.

The UV-B radiation produces excess ROS resulting in oxidative stress.¹³ On this basis, it is important to determine the presence of antioxidant activity in irradiated fruiting bodies. DPPH radical scavenging activity is one of the most widely used methods for screening the antioxidant activity of plant and fungi extracts. We also investigated the ability of UV-B irradiated *S. hirsutum* fruiting bodies to neutralize radicals using the DPPH assay as depicted in Figure 3.

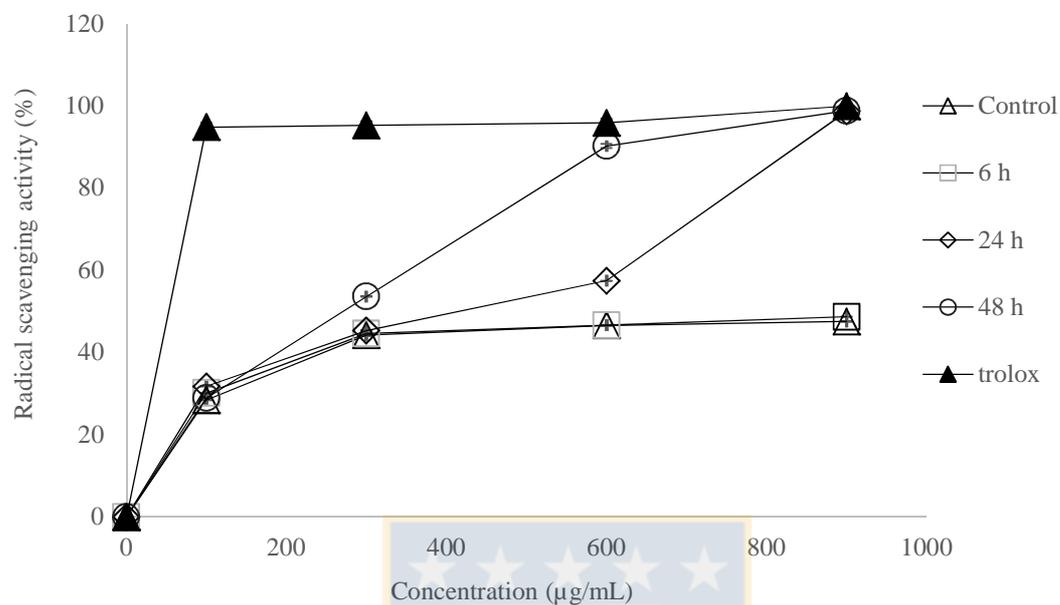


Figure 3: DPPH scavenging assay of aceto nic extract of *S. hirsutum* at different UV radiation times. Source: Self-elaboration.

Extract concentrations from 100 to 900 µg/mL were evaluated. The highest DPPH scavenging activity was observed in acetonic extract to 48 hours of exposition UV-B radiation time with a 90.2% at 600 µg/mL and 99.9% at 900 µg/mL compared to standard solution (TROLOX) (Figure 3). The IC₅₀ value of the *S. hirsutum* extract at 48 h UV-B exposure stage is 339.9 µg/mL, as depicted in Table 1. However, low DPPH scavenging activity was found in acetonic extract to 6 hours of exposition UV-B radiation time with a 48.7% at 900 µg/mL.

Table 1: IC₅₀ values of *S. hirsutum* extract at different UV-B radiation times to scavenge DPPH radical. Source: Self-elaboration.

Sample	IC 50 (µg/mL)	*SD
Trolox	7.03	± 0.21
Control	768.2	± 1.7
6 h	751.4	± 1.9
24 h	415.8	± 0.2
48 h	339.9	± 0.9

*Data are mean ± SD for three replications.

The fatty acid profile underwent changes upon UV-B irradiation. Figure 4(a) shows the relative abundance of fatty acid derivatives at 0, 6 and 24 h of UV-B radiation time. The fatty acid profile in the control sample was as follows: hexadecanoic acid (7.2%), octadecadienoic acid (4.7%), octadecenoic acid (1.0%) and octadecanoic acid (0.7%). UV-B exposure affected the distribution of fatty acids reducing the di-unsaturated fatty acid and concomitantly increasing the mono-unsaturated and saturated fatty acid abundances in *S. hirsutum* fruiting bodies. The GC-MS data at 24 h of radiation rendered the following profile: hexadecanoic acid (10.1%), octadecadienoic acid (2.8%), octadecenoic acid (2.1%) and octadecanoic acid (2.2%). The oxidant environment caused by UV-B radiation reacts with the electron rich octadecadienoic acid, reducing its abundance.

After 48 h of UV-B exposure, the antioxidant activity was remarkable at 600 and 900 µg/mL, achieving around 90% of efficiency (Figure 3). Metabolite analysis at 48 h revealed a high abundance of phenolic derivatives (70%) corresponding to the percentage of relative abundance. This explains the enhanced antioxidant activity at this radiation stage, as shown in Figure 4(b). These phenolic compounds were not detected prior to 48 h of UV-B radiation. Compounds involved in photoprotection are synthesized to counteract ROS as shown in the present study.

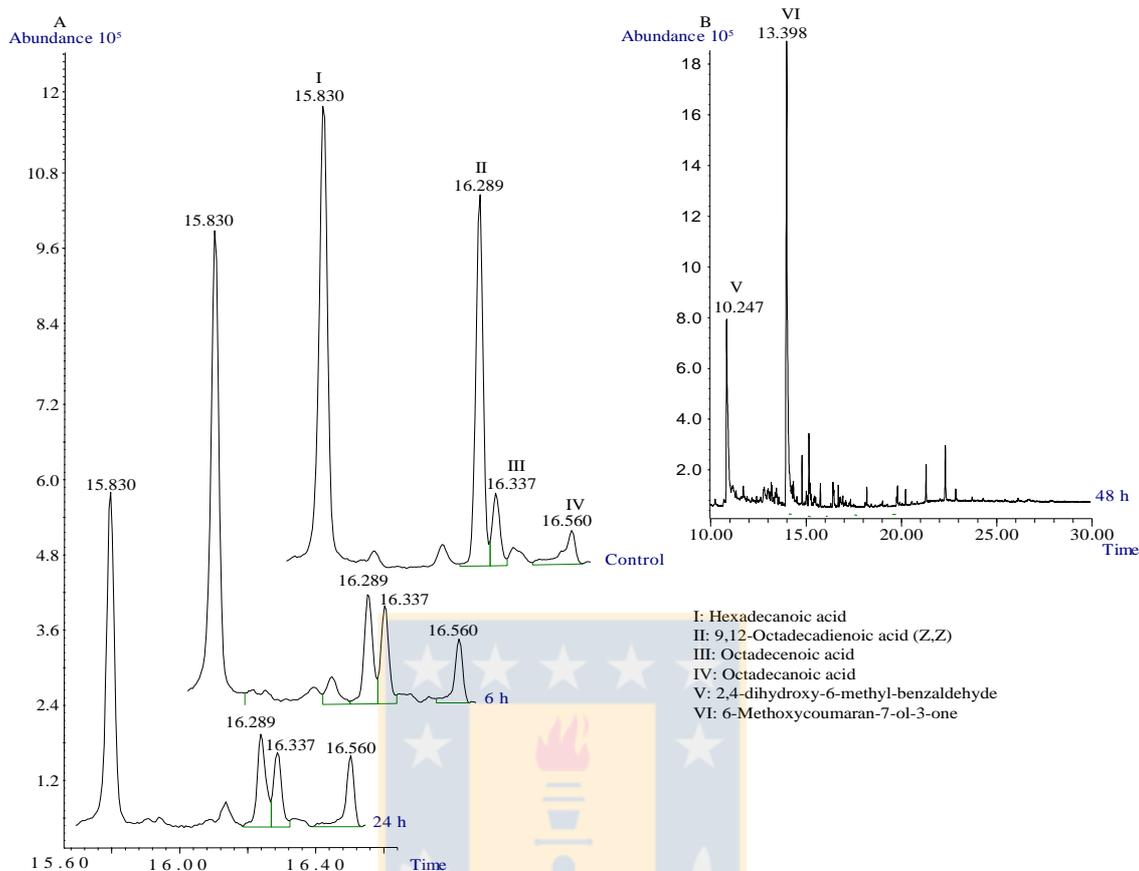


Figure 4: GC-MS profile of *S. hirsutum* at different UV radiation times. A. Fatty acids trace at 6 and 24 h of UV-B radiation. B. Phenolic compounds trace at 48 h of UV-B radiation. Source: Self-elaboration.

As observed above, UV-B radiation led to changes in the metabolite profile in *S. hirsutum* fruiting bodies. Thus, we wondered whether the antibacterial ability of this fungus against Gram positive and negative bacteria would also be affected. Table 2 shows the bioactivity of the acetonic extract against a variety of medicinally relevant strains including *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. typhimurium* and *S. aureus*. The UV-B radiation led to a decrease in the antibacterial activity against *E. coli*, *S. typhi* and *S. typhimurium*.

Table 2: Antibacterial activity of acetonic extracts of *S. hirsutum* at different UV-B radiation times. Source: Self-elaboration.

Extracts/Species	Diameter (mm)				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
-UVB	20.0±0.0	NA	20±0.58	15±0.0	NA
6 h	15.0±0.0	NA	15±0.0	10±1.15	NA
24 h	NA	NA	NA	NA	NA
48 h	NA	NA	NA	NA	NA
Control (+)	15.0±0.0	13±0.58	30±0.58	12±0.0	30±1.15
Control (-)	NA	NA	NA	NA	NA

NA: No Activity; Control positive (+): Imipenem 10 µg; Control negative (-): Methanol + Tween 1%. Data are mean ± SD for three replications.

These results agree with previous work in a decrease in the ability competitive of organism under UV-B radiation.¹⁴ On the other hand, UV-B radiation did not produce any changes in the antibacterial activity against *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Previous studies have indicated that fungi exhibit light-mediated activity biological against different microorganism and may lead to altered microbial community structure.¹⁵

4. Conclusion

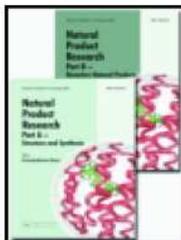
We have evaluated the effect of UV-B radiation on the metabolite profile, antioxidant activity and antibacterial activity of *S. hirsutum* fruiting bodies obtained from southern Chile. We observed substantial changes in steroid derivatives. Specifically, the relative abundance of ergosterol and its derivatives decreased upon UV-B radiation, while squalene increased. Antioxidant ability was also tested and we observed that 900 µg/mL of *S. hirsutum* acetonic extract at 48 h of UV-B radiation showed the highest ability to neutralize DPPH radicals ($IC_{50} = 339.9$ µg/mL). According to GC-MS analysis, the oxidant environment generated by UV-B radiation reduced the abundance of di-unsaturated fatty acids at 24 h of radiation exposure. After 48 h, a dramatic increase in the abundance of phenolic compounds was observed (70%), which is in accordance with the enhanced antioxidant activity at the corresponding irradiation time. Finally, UV-B radiation induced changes in the antibacterial activity of *S. hirsutum* with a decrease in the antibacterial activity against *E. coli*, *S. typhi* and *S. typhimurium*.

Acknowledgments

We thank CONICYT-Chile for supporting Solange Torres in her Ph.D. training. We would like to express our gratitude to the financial supported provided by project CONICYT-PAI N° 781412001, FONDECYT N° 1151028 and VRID University of Concepción.

5. References

1. D. Johnson, *Res. Microbiol.* 154, 315, (2003).
2. KJ. Duguay, JN. Klinoromos, *Appl Soil Eco.* 14, 157, (2000).
3. VJ. Jasinghe, CO. Perera, *Food Chem.* 95, 638, (2006).
4. A. Teichman, PC. Dutta, A. Staffas, M. Jagerstad, *LWT- Food Sci Technol.* 40, 815, (2007).
5. VJ. Jasinghe, CO. Perera, *Food Chem.* 92, 541, (2005).
6. C. Villagrán, C. Le-Quesne, JC. Aravena, H. Jiménez, F. Hinojosa, *Giess Geogr Schr.* 15, 227, (1998).
7. G. Palfner, *Aust Syst Bot.* 19, 431, (2006).
8. PM. Kirk, PF. Cannon, DW. Minter, JA. Stalpers *Dictionary of the Fungi*, CABI Europe – UK, 2008.
9. K. Ma, L. Bao, J. Han, T. Jin, X. Yang, F. Zhao, S. Li, F. Song, M. Liu, H. Liu, *Food Chem.* 143, 239, (2014).
10. U. Krings, R. Berger, *Food Chemistry* 149, 10, (2014).
11. BS. Yun, IK. Lee, Y. Cho, S. Cho, ID. Yoo. *J Nat Prod.* 65, 786, (2002).
12. G. Pawle, SK. Singh, *Curr Res Environ Appl Mycol.* 4, 1, (2014).
13. WY. Huang , YZ. Cai, J. Xing, H. Corke, M. Sun, *Econ Bot.* 61, 4, (2007).
14. J. Becerra, M. Silva, J.Becerra, *Rev Latinoamer Quím.* 42, 77, (2014).
15. D. Rule, N. Cheeptham, *Int J Speleol.* 42,147, (2013).



Natural Product Research
Formerly Natural Product Letters



ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

Steroidal composition and cytotoxic activity from fruiting body of *Cortinarius xiphidipus*

Solange Torres, Daniel Cajas, Goetz Palfner, Allisson Astuya, Ambbar Aballay, Claudia Pérez, Víctor Hernández & José Becerra

To cite this article: Solange Torres, Daniel Cajas, Goetz Palfner, Allisson Astuya, Ambbar Aballay, Claudia Pérez, Víctor Hernández & José Becerra (2016): Steroidal composition and cytotoxic activity from fruiting body of *Cortinarius xiphidipus*, *Natural Product Research*, DOI: [10.1080/14786419.2016.1185717](https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1185717)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1185717>



Capítulo V

Steroidal composition and cytotoxic activity from fruiting body of *Cortinarius xiphidipus*

Solange Torres^a, Daniel Cajas^a, Goetz Palfner^b, Allisson Astuya^c, Ambbar Aballay^c, Claudia Pérez^a, Víctor Hernández^a and José Becerra^a

^aLaboratory of Natural Products chemistry, department of Botany, university of concepción, concepción, chile; ^bLaboratory of Mycology and Mycorrhizal, department of Botany, university of concepción, concepción, Chile; ^cLaboratory of cellular culturing and Marine Genomics, Marine Biotechnology unit and copas sur-austral Program, university of concepción, concepción, Chile

ABSTRACT

From the fruiting body of ectomycorrhizal fungi *Cortinarius xiphidipus*, sterols were identified from the crude extract and the cytotoxic effect of ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one (ergone) was evaluated. Ten sterols including ergosta-3,5,7,9(11),22-pentaene, (22E)-ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3b-ol, (3 β ,22E)-ergosta-5,7,22-trien-3-ol, (22E)-ergosta-7,22-dien-3-ol, neoergosterol, (3 β)-ergosta-5,8-dien-3-ol, (3 β)-ergosta-7-en-3-ol, stigmasterol, stigmasterol 22,23-dihydro and (22E)-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one were identified from the crude extract. The cytotoxic activity of the sterol fraction containing ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one was assessed on four tumour cell lines (Neuro-2a, Saos-2, MCF7 and LNCaP-C42). The cytotoxic activity against the four tumour cell lines tested, being Neuro-2a and Saos-2 the most sensitive, with a half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 20.8 \pm 2.2 and 27.8 \pm 1.0 μ g/mL, respectively. This is the first report of this Antarctic fungi collected in the Magallanes and Chilean Antarctica Region. This work represents a potential source for the development of anticancer drugs.

1. Introduction

The fungi of class Basidiomycetes are considered the source of a wide range of biologically active products directly extracted from fruiting bodies (Brizuela et al., 1998; Liu et al., 2013; Liu 2014). The genus *Cortinarius* Fr. mostly contains the Agaricales ectomycorrhizal species from *Nothofagus* forests in South America (Gamundi y Horak 1993), being known to produce active natural products isolated from fruiting bodies with medicinal properties in the treatment of a variety of diseases, such as cancer (Popovic et al., 2013). In Patagonian ecosystems, fungi develop adaptive responses to extreme cold, surviving continuous environmental changes. As a result, fungi have developed metabolic changes that regulate their steroid metabolism in order to protect their membrane from these conditions (Dufourc 2008), finding a variety of ergosterols with potential pharmacological properties (antitumor and immunostimulating) (Zhao et al., 2009; Ferreira et al., 2010; Zhao et al., 2010; Fangkrathok et al., 2013; Dame et al., 2015). Related to pharmacological applications, studies indicate the presence of ergosterols derivatives, such as ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one (Lee et al., 2005; Quang y Bach 2008), that showed potent cytotoxic, diuretic and immunosuppressive activity (Liang et al., 2013). Related with the cytotoxicity, ergone induces apoptosis in colorectal carcinoma (HT29), hepatocellular carcinoma (Hep3B), hepatocellular liver carcinoma (HepG2), ovarian (SK-OV-3) cancer cells and reduces the growth of tumours induced in mice (Kwon et al., 2002; Zhao et al., 2010). We report production of sterols found in fruiting body from the fungus *Cortinarius xiphidipus* (CONC-F1610) for the protection of its cell membranes under the extreme conditions. These characteristics could present an interesting cytotoxic activity being this fungus a source of chemotherapeutic agents.

2. Materials and Methods

Collection of biological material

Fruiting bodies of *Cortinarius xiphidipus* M. M. Moser & E. Horak were collected in southern Chile in autumn season, specifically in the Magallanes National Reserve (53°06' S - 71°01' W), where the average annual temperature is close to 7 °C. Most of the study area is covered by forests of *Nothofagus*. *Cortinarius xiphidipus* grows as a mycorrhizal fungus associated to *Nothofagus pumilio* (Lenga). The collected and stored material was transferred to the Natural Products Chemistry Laboratory of the Department of Botany at the University of Concepción for further analyses.

Obtaining of total extract

Fruiting bodies of *C. xiphidipus* (2 Kg) were extracted in 1.5 L of methanol (MeOH). The extract was filtered in N°1 Whatman paper and the solvent was evaporated at reduced pressure in a rotary evaporator at 40 °C (Heildolph Unimax 2010). Dried extract was fractioned in an extract of hexane and ethyl acetate (EtOAc). Both extracts were concentrated until dryness and weighted in order to obtain total yield.

Extraction and isolation

The total extract (7.5 g) was fractioned by chromatography in silica gel column 60 F₂₅₄, Merck. Solvents of growing polarity (n-hexane-EtOAc y MeOH) were used as eluent phase. Fractions were collected (F₁-F₁₁), concentrated and subsequently were monitored by TLC, using aluminum chromatofolium covered by Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Germany). A mixture of 1:1 hexane- ethyl acetate was used as mobile phase. For the visualization of the compounds, a mixture of 1:1 anisaldehyde/sulfuric acid and heat to 105°C until visualization of spots was used. Fractions F₅-F₆ and F₇ containing the ergosta-4,6,8(14),22-tetraene-3-one was chromatographed in a 30x1.5 cm silica gel 60 column 0.063-0.200 mm-Merck, using the same mobile phase. For the purification of the compound, a Knauer preparative HPLC equipment with UV pump 1800 detector was used, as well as a 20x250 mm Kromasil column. The sample was filtered through an Acrodisc of 0.2 µm (Millipore, Bedford, MA) and a volume of 500 µL was injected. As solvent system, hexane- ethyl acetate was used (95:5). The flow rate was 10 mL/min. Detection of compounds was performed at room temperature.

Identification of steroidal components

Gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-MS)

The composition of the hexanic extract was determined in a gas chromatographer coupled to a mass spectrometer (Agilent 7890), equipped with an Agilent automatic injector and using a capillary column HP-5 (30 m x 0,25 mm ID), with a film of 0.25 mm thickness. For the splitless injection the injector temperature was 250 °C. The oven temperature was programmed from 100 °C (held for 5 min) to 285 °C with increment of 10 °C for min and the final temperature being held for 15 min. The temperature of detector was 300 °C. The identification of the compounds was performed by using NIST/EPA/NIH MASS 2005 Spectral Library (NIST 05, 2005) database. The structures of the compounds were designed with the ChemDraw[®] program.

Cytotoxicity assay in tumor cell lines

The cytotoxic activity of the extract was assessed on the cell lines of mouse neuroblastoma (Neuro-2a) (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD; CCL-131), human osteosarcoma (Saos-2) (ATCC: HTB-85), human breast cancer (MCF7) (ATCC: HTB-22) and human prostate cancer (LNCaP-C42). Cells Neuro-2a and LNCaP/C42 were maintained in medium RPMI 1640 (GIBCO) with 1 mM sodium piruvate (GIBCO); and cells Saos-2 and MCF7 were maintained in medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM (GIBCO). All culture media were supplemented with 100% of fetal bovine serum (FBS), (GIBCO), 2mM glutamine, 100 µg/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin y 2.5 µg/mL amphotericin B (GIBCO). Cultures were maintained in incubator at 37°C with injection of 5% CO₂. For the incubation of the cytotoxic activity, cells were seeded in plates of 96 wells, at a density of 190.000 cells/mL for neuro 21, 125.000 cells/mL for Saos 2; 150.000 cells/mL for MCF7; and 225.000 cells/mL for NCAPC42, in a volume of 200 µL. After 24 hours of incubation, cells were exposed to 30 µL of the extract during 24 hours. The extract containing the compound to be evaluated was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and they were serially diluted at a ratio of 1:2 in culture medium. The concentration of DMSO in the well did not exceed 0.5%. The concentration evaluated ranged from 0.6 µg/mL to 118 µg/mL. After the incubation period with the extract ended, this was eliminated and 60 µL of MTT were added (3-(4,5-

dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-difenil-tetrazolium bromide, Invitrogen at a concentration of 0.83 mg/mL to all cell lines, except MCF7, which was incubated with 1.7 mg/mL of MTT. After 20 minutes at 37°C was removed and the formazan salts were dissolved in 100 µL of DMSO. Optic density was measured in a microplate reader (Synergy H1, Biotek, Vermont, USA), at 570 nm. The obtained dose/response curves were analyzed by means of Prism 4 statistical software (GraphPad, San Diego, California, USA) and the estimated value of IC₅₀ was obtained at 24 hour of exposure, defined as the concentration that reduces viability in 50%.

Statistical analysis

Obtained results were analyzed with Statistica 10 software. Mann-Whitney was used as statistic test and significant differences of $p > 0.05$ were considered.

3. Results and Discussion

In the identification of steroidal components, the general GC-MS chromatogram of the hexane extract indicated the presence of various sterols at different retention times. The main sterols detected, along with retention time and relative percentage abundance are showed (Table 1). The compound ergosta-4, 6, 8, 22 tetraene-3-one was obtained from fraction 1 to 5 (3 mg) as slightly yellow crystal (115 °C), EIMS m/z (%) 392 (33) [M]⁺•, 268 (100), 253 (22), 214 (19). According to our spectroscopic data and literature, the structure of the compound was determined to be ergosta-4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-one (ergone), as previously reported (Kwon et al., 2002; Lee et al., 2005). Results of the cytotoxic activity evaluation of the ergone compound on four tumour cell lines showed a dose-depending cytotoxic effect in all cell lines studied (Figure 1).

Table 1: Main compounds identified by GC-MS at different retention times. Source: Self-elaboration.

Sterols	Name	M+	Retention time (min)	Area (%)
1	Ergosta-3,5,7,9(11), 22-pentaene	376	24.4	9.14
2	(22E)-ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3b-ol	394	27.3	3.99
3	(3 β ,22E)-ergosta-5,7,22-trien-3-ol	396	28.5	56.4
4	(22E)-ergosta-7,22-dien-3-ol	398	28.7	4.84
5	(3 β ,22E,24R)-24-methyl-19-norcholesta-5(10),6,8,22-tetraen-3-ol	380	28.8	1.95
6	(3 β)-ergosta-5,8-dien-3-ol	398	29.4	1.23
7	(3 β)-ergosta-7-en-3-ol	400	29.7	3.13
8	Stigmasterol	412	30.2	0.64
9	Stigmasterol 22,23-dihydro	414	30.5	0.88
10	(22E)-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one	392	32.2	4.89

Specifically, it was determined that the compound inhibits viability of the cell line, starting at the concentration of 1.8 $\mu\text{g/mL}$, with a 50% inhibiting concentration (IC_{50}) of 57.5 $\mu\text{g/mL}$ (Table 2). In both Saow-2 and Neuro-2A cells, an evident inhibition of cell viability is observed from 19.6, with an IC_{50} of 27.8 and 20.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively. For the cell line LNCaP/C42, the cytotoxic effect was observed from the concentration of 9.8 $\mu\text{g/mL}$, with an IC_{50} of 34.7 $\mu\text{g/mL}$.

Therefore, the selectivity of the compound tested in this study allows us to suggest that the studied compound's cytotoxicity order against different types of cancer lines presents a greater toxicity for Neuro-2 (20.8 ± 2.2) > Saos-2 (27.8 ± 1.0), followed by LNCaP/C42 (34.7 ± 1.2),

and MCF7 (57.5 ± 2.0) (Table 2). Tumour cell lines used in this study are more resistant to ergone when compared to hepatocellular carcinoma (Hep3B and HepG2), colorectal carcinoma (HT-29), lung adenocarcinoma of non-small cells (A549), ovary (SK-OV-3), skin carcinoma (SK MEL-2) and colon cancer (HCT15) (Kwon et al. 2002; Zhao et al. 2010). This work shows that the compound ergone was active against all cell lines evaluated, especially human osteosarcoma cells, presenting an IC₅₀ similar to that obtained for AGS cells (gastric carcinoma) and HeLa229 (cervix carcinoma); 22 ± 0.16 and 26.3 ± 0.93 , respectively (Lee et al. 2005). The compound ergone was cytotoxic to prostate cancer cells, and in a lesser extent, to breast cancer cells (Figure 1).

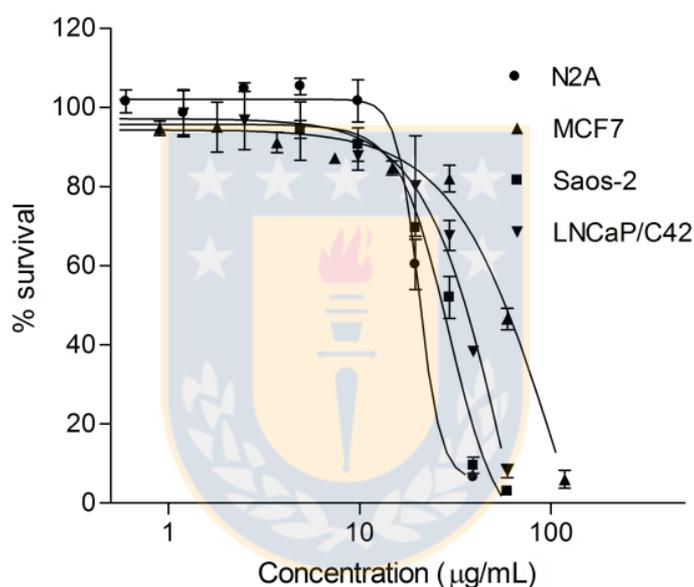


Figure 1: Cytotoxic effect of (22E)-ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one on tumor cell lines. Cells Neuro-2A, MCF7, Saos-2, and LNCap/C42 were cultured in plates of 96 wells and incubated for 24 hours with different concentrations of the compound (0.6 µg/mL to 118 µg/mL). Cell survival was measured with MTT. Results are presented as cell survival compared to the control group (non-treated cells). Source: Self-elaboration.

Table 2: Cytotoxic effect of ergostanone against four tumor cell lines. Source: Self-elaboration

Cell line	Tumor type	IC ₅₀ (µg/mL)*
MCF7	Human breast adenocarcinoma	57.5 ± 2.0
Saos-2	Human osteosarcoma	27.8 ± 1.0
LNCaP-C42	Human prostate carcinoma	34.7 ± 1.2
N2A	Mouse neuroblastoma	20.8 ± 2.2

*IC₅₀ value of ergostanone against tumour cell line corresponds to the concentration (µg/ml) needed to inhibit 50% of *in vitro* cell growth.

4. Conclusion

In the present work, different ergosterols presented in the fruiting body of *C. xiphidipus* have been determined. The compound ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (ergone) became an interesting metabolite due to its reported data, highlighting for its anticancer activity. Ergone was active against the four tumour cell lines assayed, whose cell models are of importance in studies for the treatment of high incidence cancer and mortality, reinforcing the anticancer potential of this compound.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the FONDECYT [grant number 1151028]; CONICYT-PAI [grant number 781412001]; MINCYT [grant number PCCI 130036].

5. References

Brizuela M, García L, Pérez L, Mansur M (1998) Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios [Basidiomycetes: a new source of secondary metabolites]. *Revista Iberoamericana de Micología* 15:69–74.

Dame Z, Silima B, Gryzenhout M, Van Ree T (2015) Bioactive compounds from the endophytic fungus *Fusarium proliferatum*. *Natural Product Research* 30: 1301-1304.

Dufourc E (2008) Sterols and membrane dynamics. *Journal of Chemical Biology* 1: 63–77.

Fangkrathok N, Sripanidkulchai B, Umehara K, Noguchi H (2013) Bioactive ergostanoids and a new polyhydroxyoctane from *Lentinus polychrous* mycelia and their inhibitory effects on E2-enhanced cell proliferation of T47D cells. *Natural Product Research* 27: 1611–1619.

Ferreira I, Vaz J, Vasconcelos M, Martins A (2010) Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* 10: 424–436.

Gamundi I, Horak E (1993) Hongos de bosques andino-patagónicos [Fungi of the Andean Patagonian Forests]. In: V Mazzini, editor. Buenos Aires, Argentina; p. 1–140.

Kwon H, Zee S, Cho S, Choi S, Lee K (2002) Cytotoxic ergosterols from *Paecilomyces* sp. J300. *Archives of Pharmacal Research* 25: 851–855.

Lee W, Park Y, Ahn J, Park S, Lee H (2005) Cytotoxic activity of ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one from the Sclerotia of *Polyporus umbellatus*. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 26: 1464–1466.

Liang X, Sun Y, Liu L, Ma X, Hu X, Fan J, Zhao Y (2013) Folate-functionalized nanoparticles for controlled ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 441: 1–8.

Liu D (2014) A review of ergostane and cucurbitane triterpenoids of mushroom origin. *Natural Product Research* 28: 1099–1105.

Liu H, Hu L, Zhang A, Gao J (2013) Steroids and phenolic constituents from the fruiting bodies of the basidiomycete *Sarcodon joedes*. *Natural Product Research* 27: 80–84.

Popovic V, Zivkovic J, Davidovic S, Stevanovic M, Stojkovic D (2013) Mycotherapy of cancer: an update on cytotoxic and antitumor activities of mushrooms, bioactive principles and molecular mechanisms of their action. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 13: 2791-2806.

Quang D, Bach D (2008) Ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one from Vietnamese *Xylaria* sp. possessing inhibitory activity of nitric oxide production. *Natural Product Research* 22: 901–906.

Zhao Y, Xie R, Chao X, Zhang Y, Lin R, Sun W (2009) Bioactivity directed isolation, identification of diuretic compounds from *Polyporus umbellatus*. *Journal Ethnopharmacology* 126: 184–187.

Zhao Y, Chao X, Zhang Y, Lin R, Sun W (2010) Cytotoxic steroids from *Polyporus umbellatus*. *Planta Medica* 76: 1755–1758.

DISCUSIÓN GENERAL

Desde que se descubrió una disminución del ozono estratosférico es que los estudios se han centrado en evaluar las diferentes interacciones de los componentes abióticos con los diferentes organismos ya sea en ecosistemas terrestres y/o acuáticos. De los organismos, los más afectados son las plantas y los hongos, al no poder ocultarse de las intensidades de la radiación UV-B.

Diferentes tolerancias han sido reportadas al efecto deletéreo de la radiación UVB sobre los hongos. Debido a esto, los organismos han tenido que generar diferentes mecanismos de protección para adaptarse frente a los diferentes efectos que son inducidos por la radiación UV. En el estudio de los efectos directos, la viabilidad de las esporas de diferentes especies fúngicas así como la reducción de su crecimiento ha sido considerado. La luz UV es conocida por estar implicada en procesos fisiológicos de los organismos fúngicos siendo los más conocidos la esporulación, donde se ha estudiado bastante en relación a hongos entomopatógenos. También se ha reportado los efectos de la radiación UV-B sobre las interacciones entre plantas y otros organismos tales como hongos patógenos. Estos organismos han desarrollado respuestas morfológicas durante su crecimiento y han tenido que modificar estructuras para la sobrevivencia. Este es un ejemplo de lo observado en el fitopatógeno *Armillaria sparrei* y en el entomopatógeno *Cordyceps cuncunae*. En este estudio se detectaron principalmente cambios del tipo morfo-anatómicos. Ambas especies modificaron sus estructuras miceliales, tales como rizomorfos y macroconidióforos, junto con una disminución de su crecimiento siendo ésta respuesta una forma de aminorar el daño a la radiación UV en los cultivos *in vitro*.

De los efectos indirectos reportados en literatura hacen mención a los cambios en la composición química de metabolitos y esto transforma a una especie más resistente a los impactos de la radiación ultravioleta. Muchos hongos han sido capaces de disminuir los daños de la radiación UVB mediante la acumulación de pigmentos fotoprotectores.

Se han estudiado que conidios pigmentados son más resistentes a la radiación así como también se ha encontrado una correlación entre las áreas con mayor incidencia de la radiación UV-B y la presencia de especies conteniendo melanina en sus paredes celulares. En este estudio, *Serpula himantoides*, es una especie que sintetiza un pigmento fenólico en cultivos *in*

vitro; sin embargo, la especie al ser sometida a un gradiente de dosis UVB la síntesis de este pigmento se incrementa, tornando el medio de cultivo más oscuro por la presencia de este pigmento que es acumulado en la pared celular, de acuerdo a las observaciones realizadas por microscopía electrónica de transmisión. De esta manera, la respuesta defensiva va relacionada a evitar que las longitudes de onda penetren el interior de la célula. Similar fue a lo observado por Fourtouni et al. (1998), mencionando que la morfología del micelio cambió debido a la exposición a UV-B, ya que las colonias produjeron micelio compacto pigmentado en el centro de la colonia y micelio sumergido en la periferia. Los autores señalan que los hongos emplean principalmente una respuesta morfológica que se ve reflejado en un incremento de la densidad micelial en lugar de una respuesta del tipo química, es decir la síntesis de compuestos UV-absorbentes como estrategia de protección contra el daño de la radiación UV.

En este estudio, las tres especies fúngicas evaluadas bajo condiciones *in vitro* presentaron un crecimiento micelial sumergido en el agar, como una forma de proteger el micelio a la exposición UV-B, pero además y en el caso de *Serpula himantiodes*, sintetizó en mayor abundancia el pigmento para crear una protección superficial en el cultivo.

La síntesis de compuestos protectores, es concomitante con la actividad biológica que estos compuestos presentan. Hay una alta correlación entre la radiación UV-B y la actividad antioxidante que se genera por los rayos UV. Estos rayos UV generan un estrés oxidativo a nivel celular y por ende las especies deben activar el mecanismo enzimático para reducir los niveles de especies reactivas de oxígeno. En literatura se señala que el estrés oxidativo está asociado a un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno activándose las defensas antioxidantes que hay a nivel intracelular (Gessler et al., 2002).

Los resultados obtenidos en este estudio, fueron principalmente bajo condiciones controladas en condiciones *in vitro*; sin embargo, una parte de esta investigación fue directamente relacionada con la composición de metabolitos en sus basidiomas aislados de ambientes de estrés constante como estudio *in situ* y/o mediante la exposición directa de la radiación UV en condiciones *in vitro*.

Como antecedentes de exposición de basidiomas a la radiación UVB esta lo realizado por Huanq et al. (2015) donde señalan que después de 2 horas de radiación UV-B, el contenido de vitamina D₂ de cuerpos fructíferos de *Cordyceps militaris* aumentó y el contenido de ergosterol se redujo. A partir de esto surgió el interés, en estudiar los cambios o la

composición química de organismos expuestos a un constante factor de estrés ambiental. Relacionado a los cambios químicos en los organismos bajo la radiación UV-B también se evaluó los cambios en la composición de los ácidos grasos, esteroides y fenoles en *Stereum hirsutum*, donde se evaluó dicho efecto en basidiomas expuestos a una incrementada dosis de radiación UV-B. *Stereum hirsutum* modificó el contenido de ácidos grasos, disminuyendo la abundancia de derivados del ergosterol mientras que el escualeno se incrementó. Por otro lado se observó que la radiación incrementó la actividad antioxidante asociada a los extractos obtenidos a diferentes tiempos obteniendo un máximo de actividad a las 48 h que fue concomitante con un incremento de fenoles para ese mismo período de tiempo. De esto se desprende que a nivel celular, específicamente mediante las vías metabólicas existe una regulación en la síntesis de metabolitos secundarios, predominando a aquellos metabolitos que puedan proteger a la célula del estrés oxidativo (Tisch y Schmoll 2010).

Por otro lado, hay especies de hongos que no pueden ser estudiadas bajo condiciones *in vitro* y por consiguiente sus estudios deben ser realizados mediante los basidiomas expuestos a diferentes factores de estrés ambientales como es el caso de las especies ectomicorrícicas. Estas especies viven asociadas a las raíces de las especies vegetales y es importante conocer como afecta la radiación a los basidiomas ya que estos hongos intervienen en la nutrición mineral de la planta hospedera. En literatura se menciona de la importancia de microorganismos en la nutrición mineral como micorrizas ya que éstas disminuyen sustancialmente con el aumento de la radiación UV-B y esto es debido a que en plantas bajo radiación UVB se produce una disminución en la fotosíntesis y en la producción de biomasa, ya que se altera el metabolismo de la planta afectando las diferentes interacciones (van de Staaïj et al., 2001; Carrasco 2009). En este estudio se evaluó una especie ectomicorrícica *Cortinarius xiphidipus*, aislada de condiciones ambientales extremas. Esta especie está constantemente expuesta a factores ambientales extremos como bajas temperaturas y aumentada radiación UV-B como los hongos que crecen en el sur de Chile, y al conocer su composición esteroidea sería la base para conocer y o predecir los posibles cambios en la composición metabólica de esta especie junto con sugerir estudios posteriores bajo radiación UV-B.

Queda aún por conocer en profundidad las diferentes respuestas que puedan generar otras especies relacionadas a los géneros de hongos aquí estudiados, así como realizar estudios bajo condiciones *in situ* ya que la radiación UV-B es un factor de estrés que está constantemente afectando a las diferentes organismos y más aún resulta interesante el saber los mecanismos moleculares y/o enzimáticos involucrados en las diferentes respuestas de protección que generan estos organismos como los hongos al ser considerados como componentes importantes en diferentes ecosistemas.

CONCLUSIONES GENERALES

La radiación ultravioleta afecta de diferentes formas a los hongos que están constantemente expuestos a este factor de estrés generando estrategias de protección que varían de una especie a otra.

La radiación UV produce tanto efectos directos como indirectos. Los directos fueron relacionados a cambios morfológicos detectados en las especies en medio de cultivo y los indirectos van relacionados a incrementar compuestos fotoprotectores con actividad antioxidante.

Tanto *Armillaria sparrei* como *Cordyceps cuncunae*, generaron una forma de protección más morfológica que una respuesta química. Los hongos modificaron el número y longitud de rizomorfos y macroconidióforos para poder adaptarse a condiciones de estrés.

Serpula himantioides, generó una respuesta del tipo química, que se vio reflejada en la síntesis de pigmentos que se incrementó bajo condiciones de estrés.

De los resultados obtenidos de basidiomas que están expuestos a condiciones de estrés, se observaron cambios metabólicos relacionados con el perfil de los ácidos grasos y esteroides, lo que concomitantemente incrementó la actividad biológica determinada en este estudio.

Las hipótesis planteadas en este estudio fueron aceptadas al detectarse cambios morfológicos junto con una modificación del perfil de los metabolitos secundarios relacionados a la síntesis de compuestos con actividad antioxidante para las especies en estudio.

La radiación ultravioleta permite predecir los cambios que generaran las especies para sobrevivir a estas condiciones. Muchas especies presentan roles ecológicos diferentes y deben responder de diferentes maneras. En este estudio los hongos cultivados bajo condiciones *in vitro* presentan diferentes roles ecológicos tales como descomponedores de madera, entomopatógenos y fitopatógenos en donde la radiación ultravioleta influirá en el mecanismo de acción que estos hongos presentarán frente a su huésped.

La radiación ultravioleta influirá en las distintas habilidades competitivas que tienen los hongos, aun considerando que muchos de ellos viven asociados a microorganismos del suelo.

Se sugiere hacer estudios de campo para evaluar los cambios físico-químicos que presentarán los organismos en su ambiente natural donde existe una combinación de factores tanto abióticos como bióticos y poder relacionar estos estudios con lo obtenido bajo condiciones *in vitro*.

Este es el primer estudio en hongos superiores y bajo condiciones *in vitro* que abarcó tanto respuestas morfológicas y químicas frente a la radiación UV.

Se sugiere realizar un estudio de la respuesta generada por hongos ectomicorrícicos expuestos a la radiación UV-B. *Cortinarius xiphidipus* habita en zonas de alto estrés ambiental como bajas temperaturas, por lo que se sugiere comparar lo determinado en este estudio junto con conocer la respuesta bajo la influencia de la radiación UV-B.

Desde un punto de vista biotecnológico, la radiación UV permitiría generar diferentes compuestos con mayor rendimiento en aplicaciones para la industria de colorantes y/o cosmética, al poder generar mayor número de compuestos fotoprotectores.

REFERENCIAS

Braga G, Rangel D, Flint S, Miller C, Anderson A, Roberts D (2002) Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. *Mycologia* 94: 912-920.

Coley-Smith J, Cooke R (1971) Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual Review of Phytopathology* 9: 65-92.

Cuadra P, Herrera R, Fajardo V (2004) Effects of UV-B radiation on the Patagonian *Jaborosa magellanica* Brisben. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 76: 61-68.

Dadachova E, Bryan R, Huang X, Moadel T, Schweitzer A, Aisen P, Nosanchuk J, Casadevall A (2007) Ionizing Radiation Changes the Electronic Properties of Melanin and Enhances the Growth of Melanized. *PLoS ONE* 2: 1-13.

De-Nicolás S, Regalado C, García B, Fernández F, Téllez A, Huerta S (2006) Physiological, morphological, and mannanase production studies on *Aspergillus niger* uam-gs1 mutants. *Electronic Journal of Biotechnology* 9: 50-60.

Díaz S, Camilión C, Deferrari G, Fuenzalida H, Armstrong R, Booth C, Paladini A, Cabrera S, Casiccia C, Lovengreen C, Pedroni J, Rosales A, Zagarese H, Vernet M (2006) Ozone and UV Radiation over Southern South America: Climatology and Anomalies. *Photochemistry and Photobiology* 82: 834-843.

Dimitrova S, Pavlova K, Lukanov L, Korotkova E, Petrova E, Zagorchev P, Kuncheva M (2013) Production of metabolites with antioxidant and emulsifying properties by antarctic strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL₁. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169: 301-311.

Doyle J, Doyle J (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Fourtouni A, Mannetas Y, Christias C (1998) Effects of UV-B radiation on growth, pigmentation, and spore production in the phytopathogenic fungus *Alternaria solani*. Canadian Journal of Botany 76: 2093-2099.

Fuller K, Ringelberg C, Loros J, Dunlap J (2013) The Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus* Regulates Growth, Metabolism, and Stress Resistance in Response to Light. American Society for Microbiology Journals 4: 1-12.

Gao Q, García F (2011) Microbial ultraviolet sunscreens. Nature Reviews Microbiology 9: 791-80.

Gessler N, Sokolov A, Bykhovsky V, Belozerskaya T (2002) Superoxide Dismutase and Catalase Activities in Carotenoid Synthesizing Fungi *Blakeslea trispora* and *Neurospora crassa* Fungi in Oxidative Stress. Applied Biochemistry and Microbiology 38: 205-209.

Harnett D (1987) Introducción al análisis estadístico. Editorial Iberoamericana. Delaware. EE.UU. 712 pp.

Hessen D (2002) UV Radiation and Arctic Ecosystems. D.O Hessen (ed.) Ecological studies 153. Berlín, Germany 100 pp.

Horak E (1979) Flora criptogámica de Tierra del Fuego. Tomo XI-Fascículo 6. Bueno Aires, Argentina 524 pp.

Huang S, Lin C, Mau J, Li Y, Tsai S (2015) Effect of UV-B Irradiation on Physiologically Active Substance Content and Antioxidant Properties of the Medicinal Caterpillar Fungus *Cordyceps militaris* (Ascomycetes)

Hugues K, Lawley B, Newsham K (2003) Solar UV-B radiations inhibit the growth of antarctic terrestrial fungi. Applied and Environmental Microbiology 69: 1488-1491.

Libkind D, Moline M, van Broock M (2011) Production of the UVB-absorbing compound mycosporine-glutaminol-glucoside by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). FEMS yeast research 11: 52-59.

McKensie R, Aucamp P, Bais A, Bjorn L, Llyas M (2007) Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. Photochemical and Photobiological Sciences 6: 218-231.

Moliné M, Libkind D, Diéguez M, van Broock M (2009) Photoprotective role of carotenoids in yeasts: Response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 95: 156-161.

Molyneux P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology 26: 211-219.

Moody S, Newsham K, Ayres P, Paul N (1999) Variations in the response of litter and phylloplane fungi to UV-B radiation (290-315 nm). Mycological Research 103: 1469-1477.

Moturi B, Singara M (2010) Influence of physical and chemical mutagens on dye decolourising *Mucor mucedo*. African Journal of Microbiology Research 4: 1808-1813.

Nagy P, Fischl G (2002) Effect of UV and Visible Light Irradiation on Mycelial Growth and Sclerotium Formation of *Sclerotinia sclerotiorum*. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 37: 83-89.

Oren A, Gunde-Cimerman N (2007) Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites?. FEMS Microbiology Letter 269: 1-10.

Palfner G, Valenzuela V, Gallardo C, Parra L, Becerra J, Silva M (2012) *Cordyceps cuncunae* (Ascomycota, Hypocreales), a new pleoanamorphic species from temperate rainforest in southern Chile. *Mycological Progress* 11:733-739.

Paul N, Gwynn-Jones D (2003) Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. *TRENDS in Ecology and Evolution* 18: 48-55.

Purwidyantri A, Rahmandita A, Tsai S (2012) Optimization of Pulsed UV Light Irradiation for the Production of Vitamin D₂, Bioactive Metabolites and Antioxidant Activity of *Cordyceps militaris* Mycelia. *International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental Engineering* 39: 76-81.

Ravindran K, Indrajith A, Pratheesh P, Sanjiviraja K, Balakrishnan V (2010) Effect of ultraviolet-B radiation on biochemical and antioxidant defence system in *Indigofera tinctoria* L. seedlings. *International Journal of Engineering, Science and Technology* 2: 226-232.

Rybus M, Kubis J (2010) Effect of UV-B radiation on antioxidative enzyme activity in *Cucumber* cotyledons. *Acta Biológica Cracoviensia* 52: 97-102.

Schenke D, Botcher C, Scheel D (2011) Crosstalk between abiotic ultraviolet-B stress and biotic (flg22) stress signalling in *Arabidopsis* prevents flavonol accumulation in favor of pathogen defence compound production. *Plant, Cell & Environment* 34: 1849-1864.

Tapani M (1987) The effect of UV-A light on CAMP level in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Physiologia Plantarum* 69: 451-455.

Taupp D, Nimtz M, Berger R, Zorn H (2008) Stress response of *Nidula niveo-tomentosa* to UV-A light. *Mycologia* 100: 529-538.

Thetsrimuang C, Khammuang S, Sarnthima R (2011) Antioxidant Activity of Crude Polysaccharides from Edible Fresh and Dry Mushroom Fruiting Bodies of *Lentinus* sp. Strain RJ-2. *International Journal of Pharmacology* 7: 58-65.

Thisch D, Schmoll M (2010) Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1259-1277.

Tuhai T (2011) Influence of ionizing radiation on activity of enzymes of antioxidant defense of *Paecilomyces lilacivus* (Thom) Samson. *Mikrobiolohichni Zhurnal* 73(1): 29-35.

Tuhai T (2011) Activity of antioxidant system of *Aspergillus versicolor* with radioadaptive properties under conditions of exposure to radiation. *Mikrobiolohichni Zhurnal* 73(5): 28-35.

Ulevicius V, Peciulyte D, Lugauskas A, Andriejauskiene J (2004) Field Study on Changes in Viability of Airborne Fungal Propagules Exposed to UV Radiation. *Wiley Interscience Journals* 437-441.

Van de Staaij J, Rozema J, van Beem A, Aerts R (2001) Increased solar UV-B radiation may reduce infection by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in dune grassland plants: evidence from five years of field exposure. *Plant Ecology* 154: 171-177.

Vasco C, Ruales J, Kamal A (2008) Total phenol compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry* 111: 816-823.

Vásquez A, Santiago G, Estrada A (2002) Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *Anales del Instituto de Biología Serie Botánica* 73: 1-15.

Vakalounakis D, Christias C (1981) Sporulation in *Alternaria cichorii* is controlled by a blue and near ultraviolet reversible photoreaction. *Canadian Journal of Botany* 59: 626-628.

Velmurugan P, Kamala-Kannan S, Balachandar V, Lakshmanaperumalsamy P, Chae J, Oh B (2010) Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. *Carbohydrate Polymers* 79: 262-268.

Vollenweider P, Gunthardt-Goerg M (2005) Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. *Environmental Pollution* 137: 455-465.

Volz P, Morris D (1973) Filamentous fungi exposed to spaceflight stresses including known levels of ultraviolet irradiations. *Space Life Sciences* 4: 402-414.

Willoquet L, Colombet D, Rougier M, Fargues J, Clerjeau M (1996) Effects of radiation, especially ultraviolet B, on conidial germination and mycelial growth of grape powdery mildew. *European Journal of Plant Pathology* 102: 441-449.

Zacchi L, Morris I, Harvey P (2000) Disordered ultrastructure in lignin-peroxidase secreting hyphae of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiology* 146: 759-765.

