



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

**Producción de metabolitos secundarios de *Polyporus gayanus* Lév. 1846 bajo condiciones de baja temperatura**



SEBASTIÁN IGNACIO ZAMBRANO ROJAS

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción para optar al título profesional de Biólogo

Profesor Guía: Dr. José Becerra Allende

Mayo de 2020

Concepción, Chile

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, especialmente a mi madre por su eterna voluntad de proporcionar, sin condición alguna, todos los medios necesarios para mi formación profesional y personal, por apoyarme frente a cada contratiempo que se presentaba en el camino y por siempre creer sin ninguna duda en mi interés y pasión por la ciencia y la biología.

Doy las gracias a mi profesor guía el Dr. José Becerra, por su constante apoyo, sabios consejos y aportes que hicieron de este trabajo lo que es, y por supuesto por tener siempre la mejor disposición para enseñarme y ayudarme en lo que fuera necesario a lo largo de todo el proceso. Al Dr. Miguel Martínez por su apoyo en la parte experimental de esta investigación, facilitando los equipos y espacios necesarios para llevar a cabo los tratamientos de manera correcta. A la Dra. Claudia Pérez y el Dr. Víctor Hernández, por aceptar formar parte de la comisión evaluadora, por su trato accesible y alentador cada vez que recurrí a ellos.

Agradezco a don Eduardo Muñoz, por estar presente desde el inicio hasta el final de la jornada de trabajo, siempre dispuesto a ayudarme cada vez que se lo pedía, con un trato cariñoso y una sonrisa en el rostro. A Cristian Riquelme, Solange Torres, Fabián Soto, Gastón Bravo, Verónica Albornoz y a todo el personal del Laboratorio de química de productos naturales por enseñarme a trabajar eficiente y correctamente en el laboratorio, por aconsejarme y proporcionar espacios de discusión en los que transmitían de la forma más clara posible su vasto conocimiento en química y biología.

Finalmente, a todos mis amigos y cercanos, cuyos consejos y apoyo incondicional a través de toda esta etapa me ayudaron a nunca dejar de esforzarme y perseverar para lograr mis objetivos.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	5
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	6
<b>RESUMEN</b>	7
<b>ABSTRACT</b>	8
<b>INTRODUCCIÓN</b>	9
EL REINO FUNGI	9
HONGOS Y METABOLISMO SECUNDARIO	10
INFLUENCIA DE CONDICIONES AMBIENTALES EXTREMAS EN LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS	12
BIOTA FÚNGICA DE CHILE Y SU IMPORTANCIA COMO FUENTE DE NUEVOS COMPUESTOS	16
ORDEN POLYPORALES Y POLYPORUS GAYANUS COMO ORGANISMO DE ESTUDIO	19
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	23
OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS DE POLYPORUS GAYANUS	23
ÁREA DE MUESTREO	23
COLECTA DEL MATERIAL	23
AISLAMIENTO DE LA CEPA E IDENTIFICACIÓN	24
CULTIVOS LÍQUIDOS Y APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS DE TEMPERATURA	24
EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS	24
OBTENCIÓN DE EXTRACTOS TOTALES	25
IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS	25
<b>RESULTADOS</b>	27
ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR POLYPORUS GAYANUS BAJO CADA TRATAMIENTO DE TEMPERATURA	27



IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS MÁS ABUNDANTES PRESENTES EN LOS EXTRACTOS	30
<b>DISCUSIÓN</b>	34
<b>CONCLUSIONES</b>	40
<b>REFERENCIAS</b>	41



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Listado de los principales compuestos de interés del 31  
reporte GC-MS del cultivo a 4 °C

TABLA 2: Listado de los principales compuestos de interés del 32  
reporte GC-MS del cultivo a 10 °C

TABLA 3: Listado de los principales compuestos de interés del 33  
reporte GC-MS del cultivo a 25 °C



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Cromatograma del extracto total de acetato de etilo del 28 medio de cultivo de *Polyporus gyanus* 1724 cultivado a 4°C.

FIGURA 2: Cromatograma del extracto total de acetato de etilo del 29 medio de cultivo de *Polyporus gyanus* 1724 cultivado a 10°C.

FIGURA 3: Cromatograma del extracto total de acetato de etilo del 30 medio de cultivo de *Polyporus gyanus* 1724 cultivado a 25°C.



## RESUMEN

Los hongos destacan por su capacidad de producir una enorme variedad de metabolitos secundarios, muchas veces mostrando una o más actividades biológicas. Los organismos que habitan en ambientes extremos, y en especial los hongos, suelen variar su composición química y muchas veces producen metabolitos secundarios que les confieren una mejor capacidad adaptativa ante un ambiente desfavorable. *Polyporus gayanus* Lév. 1846 es un basidiomicete degradador de madera, nativo de los bosques de la Patagonia de Chile y Argentina. Crece sobre ramas vivas de *Nothofagus pumilio* y su cuerpo fructífero es capaz de soportar la temporada de invierno. Los cultivos de micelio de este hongo fueron sometidos a tratamientos de tres temperaturas diferentes. Los extractos totales del medio de cultivo líquido fueron analizados mediante CG-MS para determinar la variación en la producción de metabolitos secundarios dependiente de la temperatura. Se observa una tendencia de aumento de los ácidos grasos insaturados en respuesta a la baja temperatura. También se discute la presencia de compuestos denominados dicetopiperazinas.



## ABSTRACT

Fungi stand out for their ability to produce a huge variety of secondary metabolites, often showing one or more biological activities. Organisms inhabiting extreme environments, and especially fungi, tend to vary their chemical composition and often produce secondary metabolites that give them a better adaptive capacity in an unfavorable environment. *Polyporus gayanus* Lév. 1846 is a wood-degrading basidiomycete, native to the Patagonian forests of Chile and Argentina. It grows on live branches of *Nothofagus pumilio* and its fruiting body is able to withstand the winter season. The mycelium cultures of this fungus were subjected to treatments under three different temperatures. The raw extracts of the liquid culture medium were analyzed by CG-MS to determine the variation in the production of secondary metabolites dependent on temperature. A trend of increase in unsaturated fatty acids is observed in response to low temperatures. The presence of compounds called dicetopiperazines is also discussed.





# INTRODUCCIÓN

## EL REINO FUNGI

El reino Fungi es un grupo taxonómicamente polifilético y extremadamente diverso. Actualmente, hay aproximadamente 70.000 especies de hongos descritas a nivel mundial, sin embargo, se estima que la diversidad total de este grupo podría llegar a ser desde 1.5 millones (Hawksworth 2001) a 5.1 millones de especies en todo el planeta (Blackwell 2011).

Los hongos, están presentes en casi todos los tipos de ambiente alrededor del planeta y muchas veces se encuentran asociados a otros organismos, ya sea de manera positiva, así como negativa. Pueden desarrollarse en una gran variedad de hábitos ecológicos como por ejemplo saprobiontes, simbioses micorrízicas, simbioses formadores de líquenes y parásitos de plantas, animales e inclusive otros hongos (Alexopoulos 1996).

Los hongos han sido encontrados en prácticamente todos los lugares del planeta. Por esto se les considera una parte vital de todos los ecosistemas, ocupando una enorme diversidad de nichos y ofreciendo importantes servicios ecosistémicos (Dighton 2016).

Históricamente los hongos han sido parte fundamental de la cultura humana, siendo usados como alimento, tónicos, medicina, cosméticos y agentes naturales de biocontrol en la protección de plantas gracias a su actividad insecticida, fungicida,

bactericida, herbicida, nematocida y antifitoviral (Gargano, *et al.* 2017).

## HONGOS Y METABOLISMO SECUNDARIO

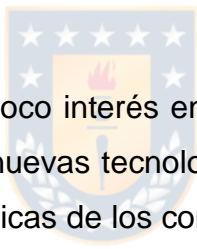
Una de las características importantes y que resalta en este grupo de organismos es su impresionante capacidad de sintetizar metabolitos secundarios, los cuales muchas veces poseen algún tipo de actividad biológica (Namikoshi 2006). Dentro de esta línea cabe destacar el uso medicinal y terapéutico de varias especies, sobre todo en el continente asiático desde hace miles de años.

A esto se suma que en las últimas décadas esta línea de investigación ha tomado bastante relevancia. Esto ha incentivado el estudio de nuevas especies de organismos potencialmente productoras, como lo son los hongos, en busca de nuevos compuestos bioactivos, obteniéndose muy buenos resultados hasta el momento. Si bien el potencial de este tipo de investigación está aún en desarrollo, ya se han encontrado una gran variedad de especies de hongos productores de compuestos antibióticos, antifúngicos, citotóxicos, repelentes y con propiedades medicinales varias (De Silva, *et al.* 2013).

Los Basidiomicetes, también llamados hongos superiores, ofrecen un prometedor campo para la obtención de nuevas estructuras químicas con un alto potencial para aplicaciones médicas y agrícolas. Los hongos superiores poseen una ventaja como organismos productores al liberar los metabolitos secundarios a un medio de cultivo líquido (Lorenzen & Anke 1998). Esto ha permitido el desarrollo de una línea de investigación y producción con cultivos de micelio que alcanzan un volumen industrial, pudiendo aislar valiosos compuestos bioactivos con actividad antibacteriana, antifúngica, nematocida, fitotóxica, antiviral, insecticida, citotóxica,

anticancerígena y otras (Liermann, *et al.* 2012).

Existe bastante evidencia sobre el rol ecológico y en el fitness de los metabolitos secundarios fúngicos, desde estudios sobre la interacción de los hongos con otros organismos, hasta estudios que muestran la influencia de fenómenos genéticos en la producción de compuestos por parte de estos organismos (Keller 2015; Lim & Keller 2014). Estos estudios, muestran que muchos de los genes que codifican para metabolitos secundarios son regulados de manera congruente con el desarrollo fúngico o en respuesta a algún estrés, el cual puede ser tanto biótico como abiótico. Más aún, se ha observado que la pérdida o sobreproducción de metabolitos secundarios pueden alterar el desarrollo fúngico, la sobrevivencia o las relaciones inter e intrarespecíficas (Keller 2019).



Después de un largo tiempo de poco interés en esta línea de investigación, esta resurgió gracias al desarrollo de nuevas tecnologías en la década de los 80 para dilucidar la estructura y características de los compuestos que se desean analizar, ofreciendo una nueva visión sobre el metabolismo secundario de los hongos y el potencial que este ofrece como una fuente potencial de nuevos compuestos bioactivos. En este sentido, los cultivos líquidos fúngicos poseen una importante ventaja en la producción de este tipo de compuestos, siendo también capaces de liberarlos a su respectivo medio de cultivo (Aqueveque, *et al.* 2010).

Las metodologías clásicas para el descubrimiento de productos naturales en microorganismos, se basan principalmente en el cultivo en laboratorio seguido de un fraccionamiento guiado por ensayos de bioactividad. La llegada de la era genómica significó un cambio radical en la aproximación hacia descubrimiento de nuevos productos naturales. El análisis de genomas microbiales dejó en evidencia la presencia de numerosos genes que probablemente participan en la biosíntesis

de compuestos estructuralmente complejos, pero que no están asociados a la producción de metabolitos conocidos (Chávez, *et al.* 2015). Este fenómeno fue reconocido por primera vez en una cepa de *Streptomyces* (Omura, *et al.* 2001; Bentley, *et al.* 2002) y fue replicado en hongos filamentosos (Keller, *et al.* 2005). Hoy en día, se reconoce que los hongos tienen un potencial de producción de metabolitos secundarios mucho mayor al número de compuestos actualmente conocidos. Lo anterior sugiere que un resurgimiento del descubrimiento de metabolitos secundarios se aproxima, y en este aspecto los hongos provenientes de ambientes extremos contribuyen significativamente en este aspecto (Keller 2005).

Un gran número de hongos con este potencial productivo son los de pudrición blanca, un significativo grupo de organismos degradadores de madera, los cuales poseen un potente arsenal enzimático, el cual está siendo extensivamente explotado para la bioconversión de masa lignocelulósica en varios productos con valor agregado (Gargano, *et al.* 2017).

#### INFLUENCIA DE CONDICIONES AMBIENTALES EXTREMAS EN LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Las probabilidades de aislar nuevas especies fúngicas son mayores si la muestra viene de un ambiente no mesofílico, como aquellos caracterizados por una alta salinidad, alta radiación, limitación de nutrientes, temperaturas y presiones extremas y acidez variable. Los organismos de estos hábitats extremos han desarrollado estrategias de supervivencia para el crecimiento y reproducción en estas condiciones tan desfavorables. Entre ellos está la producción de moléculas orgánicas pequeñas con una actividad biológica específica, por ejemplo, moléculas crioprotectoras como azúcares y polioles para estabilizar las membranas y

mantener la presión de turgencia (Timling & Taylor 2012), compuestos osmóticamente activos como polioles en hongos xerotolerantes (Gunde-Cimerman & Zalar 2014), y melaninas fúngicas para la protección ante el congelamiento y la radiación UV (Nosanchuk & Casadevall 2003).

Un estudio realizado en la zona de altas elevaciones en las montañas del Himalaya reveló una predominancia de hongos ascomicetes adaptados al frío en este tipo de suelo. Se reconoce a este grupo de hongos por su potencial para producir un gran número de nuevos y diversos metabolitos secundarios. Los análisis morfológicos y moleculares ubicaron al máximo número de especies en el género *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Cladosporium* y *Phialophora*. Una de las características más notable del grupo estudiado fue la poliextremofilia, es decir, tolerancia a un amplio rango de temperatura, acidez y salinidad del suelo. Este atributo se vio expresado incluso en condiciones normales de pH y salinidad del suelo. Esta poliextremofilia demostrada por las cepas aisladas podría deberse a varias mutaciones independientes, responsables de distintos caracteres extremófilos. También se observó una elevada esporulación, sobreproducción de enzimas y metabolitos bioactivos (en particular pigmentos), como características de estos hongos asociadas al estrés de temperatura. Los casos de estudio muestran la importancia de “condiciones subóptimas de crecimiento” en la sobreproducción de metabolitos que median procesos ecológicos como la degradación de lignina, solubilización del fosfato y biocontrol (Pandey, *et al.* 2018).

En este sentido, cabe destacar la importancia de la biota presente en el continente antártico. Las condiciones extremas prevalentes en este ambiente son las bajas temperaturas, muy poca disponibilidad de agua y precipitaciones, numerosos ciclos de congelamiento-descongelamiento, fuertes vientos y alta sublimación, evaporación y radiación ultravioleta (Selbmann *et al.*, 2007).

Aquí la microbiota está mayormente representada por los taxa Archaea, Bacteria y Fungi. Sin embargo, Fungi es el grupo más diverso en los diferentes ecosistemas antárticos, incluyendo el suelo. La supervivencia de los hongos en ambientes extremos es una consecuencia tanto de la selección ecológica, así como de adaptaciones evolutivas expresadas a un nivel fisiológico, metabólico, estructural y genético (Durán, *et al.* 2019).

Ruisi, *et al* (2007) postularon que los hongos antárticos podrían ser cosmopolitas, y que algunos propágulos podrían ser transportados externamente pero no serían capaces de crecer en las condiciones de la Antártica, mientras que otros hongos de la zona bien adaptados, mayormente psicotolerantes, son capaces de crecer y reproducirse incluso a los 0° C. Tanto los hongos psicrotróficos como los psicrófilos tienen la habilidad de crecer a 0° C. Los hongos psicrotróficos poseen una temperatura máxima de crecimiento sobre los 20° C, mientras que los psicrófilos tienen una temperatura óptima de crecimiento a 15° C o menos y una temperatura máxima de crecimiento a 20° C. Algunos estudios, han determinado que estos microorganismos especializados son capaces de tolerar un amplio rango de estrés, incluyendo desecación, hipersalinidad, radiación solar y bajas temperaturas, gracias al desarrollo de estrategias funcionales, como la producción de compuestos bioactivos, enzimas activas en frío, y proteínas anticongelantes (Durán, *et al.* 2019).

La composición estructural de las membranas celulares probablemente afecta a la temperatura a la cual sus propiedades cambian desde una fase inactiva a una activa. En levaduras psicrófilas, como por ejemplo especies de *Candida*, *Leucosporidium* y *Torulopsis*, los ácidos grasos constituyentes son más insaturados que aquellos de especies mesófilas y temperaturas de incubación bajas aumentan el grado de insaturación (Robinson 2001).

Weinstein, *et al* (2000) evaluaron la influencia del estrés producido por bajas temperaturas en el contenido lipídico y de carbohidratos en tres especies de hongos encontrados en la antártica: *Humicola marvinii*, *Geomyces pannorum* y *Mortierella elongata*. Al ser cultivados en temperaturas subóptimas de crecimiento, los tres presentaron un aumento en el grado de insaturación de ácidos grasos, siendo mayor en *G. pannorum* y *M. elongata*. También se observó el aumento de producción de carbohidratos crioprotectores por parte de *H. marvinii* y *M. elongata*, así como también la ausencia de ergosterol detectable en este último.

El ecosistema antártico, representa un hábitat muy interesante para el aislamiento y caracterización de comunidades fúngicas viviendo en condiciones extremas. Algunos de estos hongos, muestran actividad biológica interesante y podrían tener un sistema metabólico diferente o incluso único capaz de producir compuestos bioactivos. En el 2014 se describió la actividad antibacteriana, antifúngica y tripanocida de *Purpureocillium lilacinum*, además de la presencia de compuestos aromáticos con posible bioactividad (Gonçalves, *et al.* 2014).

En otra levadura presente en la antártica, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, se observó que las cepas de este ambiente presentan una mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados, siendo fenotípicamente distintas a otras cepas silvestres. Se presume que estas diferencias le confieren características que podrían hacerlas más resistentes y mejor adaptadas a las condiciones hostiles de este hábitat, lo cual también tiene un potencial aprovechamiento en el ámbito biotecnológico (Contreras, *et al.* 2015).

Se han caracterizado incluso los efectos de radiación provocada por la entrada a la

atmósfera terrestre luego de un viaje espacial en *Cryomyces antarcticus*, notando que el hongo mantenía una alta sobrevivencia y actividad metabólica con ningún daño detectable en el ADN ni daño ultraestructural, ni siquiera luego de recibir la dosis más alta de radiación (Pacelli, *et al.* 2017). Hasta la fecha, el género *Cryomyces* es considerado uno de los mejores modelos eucariontes para estudios astrobiológicos y ha sido usado como modelo para experimentos espaciales durante la última década. Ding *et al* (2016) estudiaron la diversidad y actividad biológica de 150 cepas cultivables de hongos, aislados de Bahía Fildes, en las islas King George de la Antártica. De las cepas aisladas, 18 produjeron compuestos biológicamente activos, demostrando así el enorme potencial que presentan este grupo de hongos extremófilos.

La importancia de la influencia de los factores ambientales en hongos alcanza incluso el ámbito comercial. Se ha observado, por ejemplo, la influencia de la radiación ultravioleta y el almacenamiento en frío en carpóforos de *Agaricus bisporus* luego de su cosecha, donde la aplicación de ambos tratamientos produjo el aumento del contenido total de vitamina D2 y ergosterol versus el control (Guan, *et al.* 2016).

#### BIOTA FÚNGICA DE CHILE Y SU IMPORTANCIA COMO FUENTE DE NUEVOS COMPUESTOS

Chile es abundante en especies de plantas asociadas a una amplia variedad de hongos simbióticos, saprofiticos y parásitos, de los cuales una parte importante permanece desconocida (Aqueveque, *et al* 2017). De acuerdo a Palfner (2001) existen aproximadamente 3000 especies de hongos reportadas para Chile, de las cuales cerca del 50% son hongos superiores.



En este aspecto es importante destacar a la región geográfica de los Andes Patagónicos, ya que este lugar alberga una amplia diversidad de hongos, muchos de ellos aún desconocidos, asociados a los bosques endémicos andinos de Chile y Argentina. Ha habido muy pocos estudios químicos de los hongos presentes en esta región. Sin embargo, esos pocos estudios han permitido el descubrimiento de nuevas moléculas. En un estudio realizado por Aqueveque, *et al.* (2017) se determinó que del total de especies analizadas cerca de un 60% produce extractos biológicamente activos contra uno o más microorganismos patógenos en diferentes intensidades. Esto demuestra el enorme potencial que poseen las especies presentes en esta región geográfica como fuente de sustancias bioactivas.

En un esfuerzo de investigación en busca de metabolitos fúngicos biológicamente activos, se descubrió un reservorio insospechado de nuevas moléculas potencialmente útiles producidas por Basidiomicetes chilenos (Aqueveque, *et al.* 2010). Un ejemplo de aquello es *Stereum rameale*, cuyos extractos presentan un potente efecto inhibidor ante bacterias patógenas, haciéndolos una buena alternativa como potenciales agentes antimicrobiales, pudiéndose usar por ejemplo para preservar alimentos crudos procesados (Aqueveque, *et al.* 2015).

En la especie *Serpula himantoides* se evaluó la bioactividad de los cultivos de micelio, encontrándose 4 nuevos compuestos, los cuales fueron llamados himanimidas, con actividad antibiótica contra varias especies de hongos y bacterias además de presentar actividad citotóxica (Aqueveque, *et al.* 2002).

Otro compuesto, un triterpenoide llamado flavolon B fue aislado de una especie de *Mycena* (cepa 96180) presente en el bosque nativo cercano a la localidad de Contulmo. Dicho compuesto mostró actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Mucor miehei*, *Paecilomyces variotii* y *Penicillium notatum* (Aqueveque, *et al.* 2004).

Los extractos de los cuerpos fructíferos de *Grifola gargal* también han demostrado poseer una importante actividad antioxidante, lo cual se atribuye a la presencia de una alta cantidad de flavonoides y polifenoles en los extractos (De Bruijn, *et al.* 2008).

Las principales ventajas del cultivo es la rápida producción tanto de biomasa micelial y metabolitos de alto valor agregado, en un periodo de tiempo corto y espacio reducido, además con una menor probabilidad de contaminación. La optimización de la composición del medio de cultivo y las condiciones fisiológicas de crecimiento proveen un alto rendimiento de biomasa y grandes cantidades de sustancias específicas de composición constante (De Silva, *et al.* 2013).

La evidencia propiciada por los estudios químicos de especies de hongos chilenos sugiere la necesidad de realizar más investigación extensiva en este aspecto, ya que se sabe que solo una pequeña fracción de la biodiversidad fúngica tanto a nivel local como mundial ha sido investigada en busca de compuestos bioactivos (De Silva, *et al.* 2013).

A esto se suma el hecho de que algunos de los hongos cosmopolitas que colonizan los bosques nativos de Chile están sujetos a nuevos factores ambientales, tales como la disponibilidad de nutrientes, estrés e interacciones con nuevos competidores. Estos factores podrían producir un cambio en las vías biosintéticas normales, lo cual puede desembocar en la síntesis de nuevos compuestos que proveen mejores maneras de adaptarse a estas nuevas condiciones de vida (Wildman 1995).

Esta variación en la producción de metabolitos, producto de factores ambientales, fue estudiada en parte por Aqueveque *et al.* (2016), donde a partir de un análisis de especies de Basidiomicetes reportaron, basados en las respuestas de los extractos de numerosas especies fúngicas, que algunas cepas no evidenciaban una variación considerable de su actividad biológica, independiente del sustrato o lugar de colecta de la cepa. Ejemplos de estas especies son *Anthracoephyllum berterii*, *Hypholoma frowardii*, *Ganoderma australe*, *Phellinus andinopatagonicus*, *Hypholoma fasciculare*, *Laccaria laccata*, *Paxillus involutus*, *Scleroderma citrinum* y *Thelephora terrestris*. Sin embargo, otras cepas mostraron marcadas diferencias en su actividad biológica. Los ejemplos más notables de esto último son *Chondrostereum purpureum*, *Daedalea quercina*, *Gymnopilus spectabilis*, *Marasmiellus alliodoratissimus*, *Marasmius alliodorus*, *Mycena chlorinella*, *Schizophyllum commune*, *Serpula himantioides*, *S. hirsutum*, *S. rameale* y *Trametes versicolor*.



#### ORDEN POLYPORALES Y *POLYPORUS* GAYANUS COMO ORGANISMO DE ESTUDIO

Los comúnmente denominados “políporos” se caracterizan por ser una gran fuente de compuestos farmacológicamente activos, a pesar de que solo un pequeño número de las especies más comunes se han evaluado para algún tipo de bioactividad. Alrededor de un 75% de las especies evaluadas presentan una fuerte actividad antimicrobial, pudiendo constituir una buena fuente de nuevos antibióticos. Numerosos compuestos de este grupo de hongos también presentan actividad antiviral, citotóxica y/o antineoplásica (Zjawiony 2004).

*Polyporus* es un género de hongos basidiomicetes descomponedores de madera, siendo el género tipo de familia Polyporaceae, que a su vez se anida en el orden Polyporales. Antiguamente este orden se clasificaba como Aphyllorphales, según

lo descrito por Micheli (1729) y Adanson (1763), sin embargo, este clado fue actualizado en base a las nuevas técnicas y herramientas moleculares para dilucidar la filogenia de un grupo tan complejo como lo son los hongos (Hibbett 2006; Binder, *et al* 2013). El ahora obsoleto grupo Aphylloporales contiene a los órdenes Auriculariales, Tulasnellales, Hymenochaetales, Polyporales y Thelephorales (Martínez & Valenzuela 2004).

Dentro del género tipo del orden Polyporales, se ubica *Polyporus gayanus*. Esta es una especie nativa de los bosques patagónicos de Chile y Argentina, la cual vive sobre las ramas vivas y/o muertas de especies de *Nothofagus*, específicamente sobre *Nothofagus pumilio* (lenga). Este hongo provoca una pudrición blanca en las ramas, actuando como un agente de desrame natural. El cultivo de micelio en placa Petri se compone de una colonia micelial homogéneamente afieltrado-algodonosa, areolada, o con puntos algodonosos dispersos en la caja, de crecimiento lento a muy lento, cubriendo la placa a la 5ª semana o aquella permaneciendo sin cubrir; reverso blanqueándose. Posee hifas generativas fibuladas, formadoras de hifas fibrosas ramificadas (Rajchenberg 1996).

Por otra parte, este género destaca por las especies que producen uno o más metabolitos secundarios con algún tipo de actividad biológica. Ejemplo de aquello es *Polyporus tuberaster*, una especie nativa del norte de Estados Unidos y Canadá, el cual era usado por los nativos de la zona como cataplasma o como tratamiento para el reumatismo. Al analizar su composición química mediante cromatografía descubrieron la presencia de peróxido de ergosterol, el cual es un compuesto con propiedades antifúngicas, además de otros derivados del ergosterol en el extracto con acetato de etilo. En el extracto con MeOH se encontró un disacárido no identificado, ergosterol y un nuevo compuesto que fue llamado Tuckolide (Ayer, *et al.* 1992).

## HIPÓTESIS

En base a la información existente sobre la producción de metabolitos secundarios, la mayoría de las veces con algún tipo de actividad biológica, por parte de hongos que habitan ambientes extremos y teniendo en cuenta además el evidente efecto que tienen la aplicación de tratamientos de alto estrés en la producción de estos compuestos, como lo son por ejemplo las bajas temperaturas (notando además que *Polyporus gyanus* habita en la zona austral de la Patagonia, donde está constantemente expuesto a bajas temperaturas y alta radiación UV), es que surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Se producirá una variación significativa en la producción de metabolitos secundarios por parte de *Polyporus gyanus* en respuesta a la exposición a bajas temperaturas?

Para intentar responder esta pregunta de investigación, es que se propone la siguiente hipótesis.

H: Se producirá una diferencia significativa en la producción de metabolitos secundarios de *Polyporus gyanus*, en respuesta al tratamiento con una condición extrema constante producido por la exposición a bajas temperaturas, la cual se expresará en una disminución de ácidos grasos insaturados, polisacáridos y esteroides a medida que aumente la temperatura.

## OBJETIVO GENERAL

OG: Determinar la variación en la producción de metabolitos secundarios en *Polyporus gyanus* producto de la exposición de los cultivos de micelio a tres temperaturas distintas, las cuales corresponden a 5° C, 15° C y 25° C.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OE1: Realizar los cultivos de micelio en medio líquido e incubarlos bajo tres temperaturas distintas.

OE2: Realizar extracciones totales del medio de cultivo líquido y analizar su composición química mediante cromatografía de gases (GC-MS)

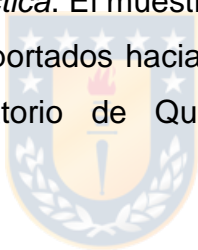
OE3: Determinar la variación de los metabolitos secundarios entre los extractos de los tres tratamientos de temperatura.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS DE *POLYPORUS GAYANUS*

#### ÁREA DE MUESTREO

El material fue recolectado en la Reserva Nacional Coyhaique, coordenadas 45°31'54.99" S, 72°00'45.92" W a una altura aproximada de 450 m.s.n.m. Dicha reserva se encuentra a 3 Km de la ciudad de Coyhaique, cubriendo una superficie total de 2150 hectáreas. Los cuerpos fructíferos del hongo se encontraban sobre ramas vivas de *Nothofagus antarctica*. El muestreo se realizó la última semana de septiembre, para luego ser transportados hacia Concepción y depositados en el fungario (CONC-F) del Laboratorio de Química de Productos Naturales, Universidad de Concepción.




#### COLECTA DEL MATERIAL

La obtención del material de estudio consideró la extracción cuidadosa y recolección de basidiomas con el objetivo de obtener extractos de los carpóforos y los cultivos en placa del micelio. La identificación de los basidiomas fue realizada por taxónomos del Departamento de Botánica de la Universidad de Concepción. El material colectado fue deshidratado y almacenado en el Herbario CONC del Departamento de Botánica de la Universidad de Concepción (Fungario CONC-F), con su respectiva etiqueta de datos y su código único 1724.

## AISLAMIENTO DE LA CEPA E IDENTIFICACIÓN

Los cultivos miceliales puros se obtuvieron desde los basidiomas, previamente aislados en placas Petri con medio de cultivo YMG, compuesto por 0,4% de extracto de levadura, 1% de extracto de malta, 0,4% de glucosa y 1,5% de agar a pH 5,5 (Aqueveque *et al.* 2006). Las placas fueron incubadas a 20 °C. Los cultivos de cepas puras fueron replicados y almacenados en el cepario del Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Universidad de Concepción, a una temperatura de 4 °C. La identificación del material colectado consistió en un examen morfológico macroscópico y microscópico de los basidiomas frescos.

## CULTIVOS LÍQUIDOS Y APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS DE TEMPERATURA



Se realizó el traspaso de los cultivos de micelio desde placa Petri a matraces de 500 mL de capacidad con 250 mL de medio de cultivo YMG líquido, obteniendo un total de 9 cultivos líquidos, los cuales se dejaron fermentar en agitación constante a 120 rpm a una temperatura media aproximada de 22 °C por un período de 30 días para asegurar el crecimiento del micelio. Luego de este período, los cultivos fueron transportados y almacenados en cámaras de incubación donde se les aplicó el tratamiento con tres temperaturas diferentes, las cuales fueron 4 °C, 10 °C y 25 °C. Se sometieron 3 cultivos a cada temperatura, con el fin de obtener un mínimo de réplicas, por un período de 14 días. Luego de los 14 días se procedió a retirar los cultivos de sus respectivos tratamientos para realizar la extracción desde el medio de cultivo.

## EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS



## OBTENCIÓN DE EXTRACTOS TOTALES

Los extractos desde el medio de cultivo fueron obtenidos por extracción líquido-líquido con acetato de etilo y posteriormente filtrados y concentrados en un evaporador al vacío. Los extractos colectados se resuspendieron en acetato de etilo y almacenados en viales (Thermo Scientific™, 9 mm, 2 mL) a 4 °C para su uso posterior.

## IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS

Los extractos fueron resuspendidos en 1 mL de acetato de etilo y luego filtrados (Green BioResearch LLC, filtro de jeringa de nylon, 0,22 µm, 25 mm) para ser inyectados en un cromatógrafo de gas con detector de masas (GC-MS), con una concentración final de 13 mg/mL. La determinación de los compuestos presentes en los extractos totales de *Polyporus gayanus* fue realizada en un cromatógrafo de gases con espectrómetro de masa (Agilent 7890) System VLMSD, equipado con un inyector automático Agilent y usando una columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 181 mm de diámetro interno, con una película de 0,25 µm de espesor) acoplado a un espectrómetro de masas con detector HP Modelo 5975. Como gas de arrastre se utilizó helio con un flujo de 1 mL/min. Las temperaturas del detector e inyector fueron 250 °C y 300 °C, respectivamente. El programa de temperatura fue de 100 °C 2 min, isotérmica de 100-280 °C, a 8 °C/min, 280 °C, con una duración de 40 min y un rango de barrido de masas 100- 500 AMU. Se inyectó 1 µL de la muestra disuelto en acetato de etilo. Los porcentajes relativos de los componentes del extracto fueron obtenidos desde el área bajo el peak. La identificación de los compuestos fue confirmada por comparación de los espectros de masa con aquellos compuestos desde la base de datos de NIST 95 (a Hewlett Packard

MassSpectral Library, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA).



## RESULTADOS

### ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR *POLYPORUS GAYANUS* BAJO CADA TRATAMIENTO DE TEMPERATURA

Para determinar la variación de los metabolitos secundarios producido por *Polyporus gyanus* dependiente de la temperatura de cultivo, se realizó un análisis cromatográfico de los extractos totales de acetato de etilo obtenidos desde el medio de cultivo para los distintos tratamientos realizados, los cuales corresponden a 4 °C (Figura 1), 10 °C (Figura 2) y 25 °C (Figura 3).



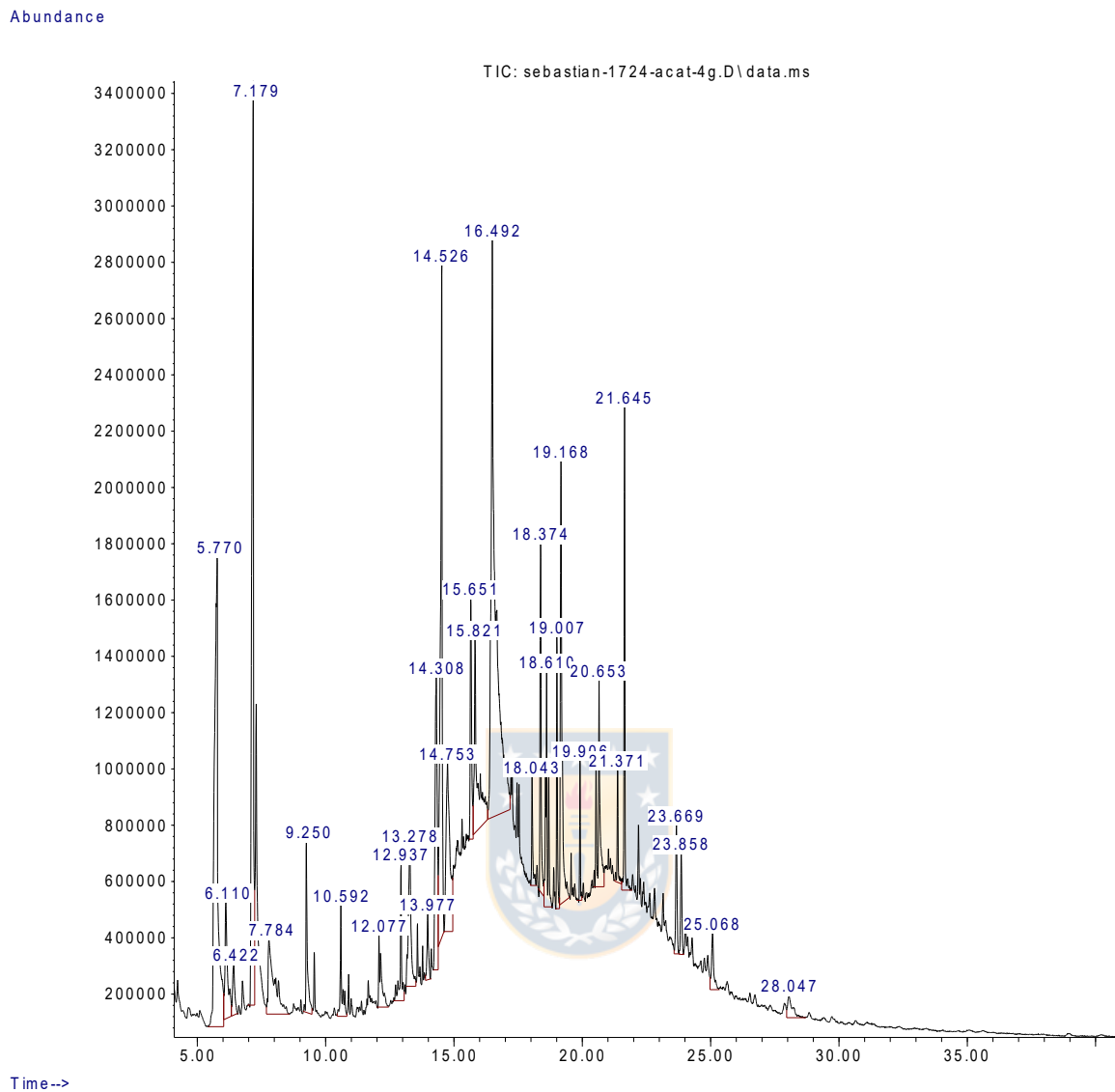


FIGURA 1: Cromatograma del extracto total de acetato de etilo del medio de cultivo de *Polyporus gayanus* 1724 cultivado a 4 °C.

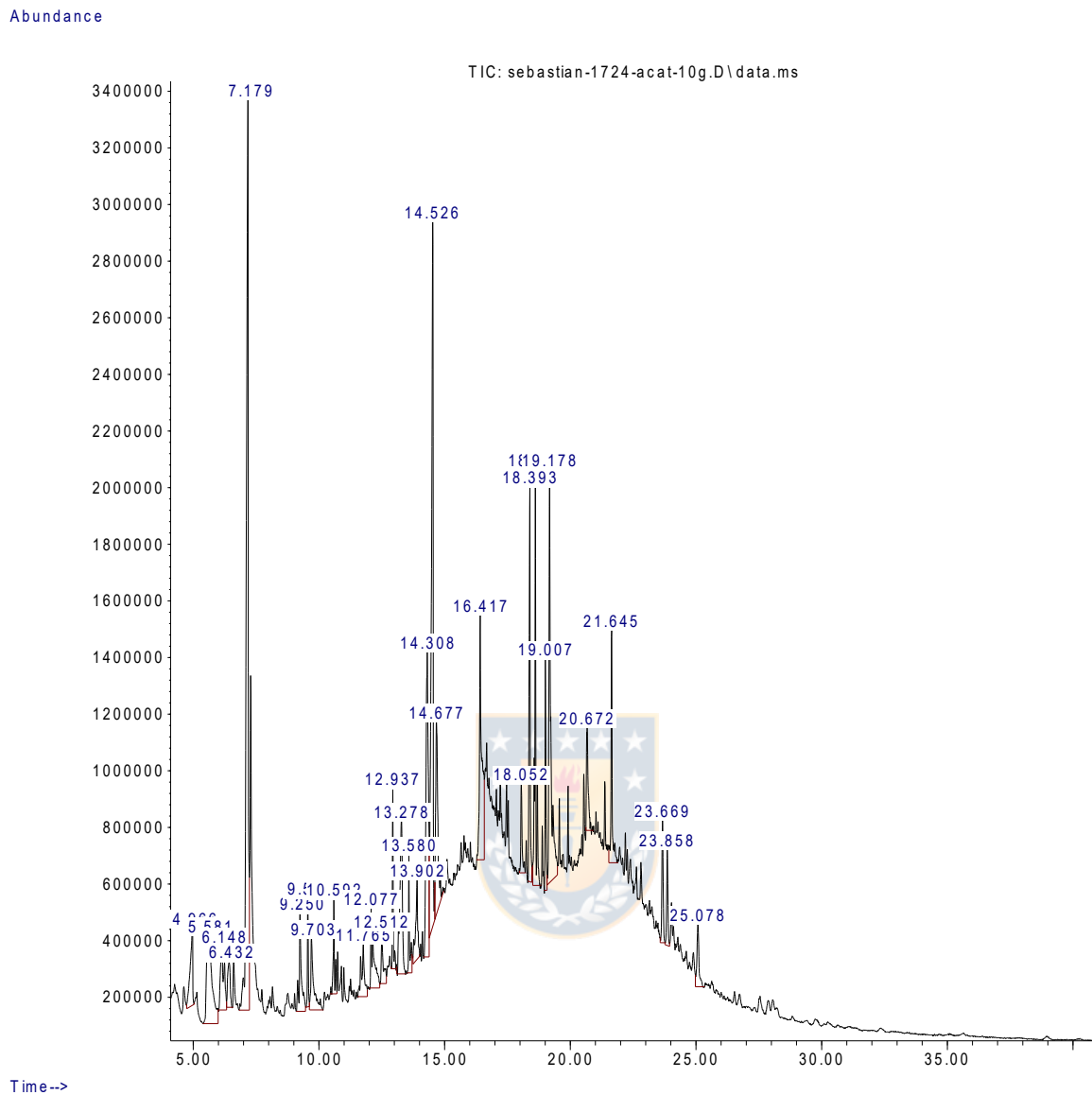


FIGURA 2: Cromatograma del extracto total de acetato de etilo del medio de cultivo de *Polyporus gayanus* 1724 cultivado a 10 °C.

Abundance

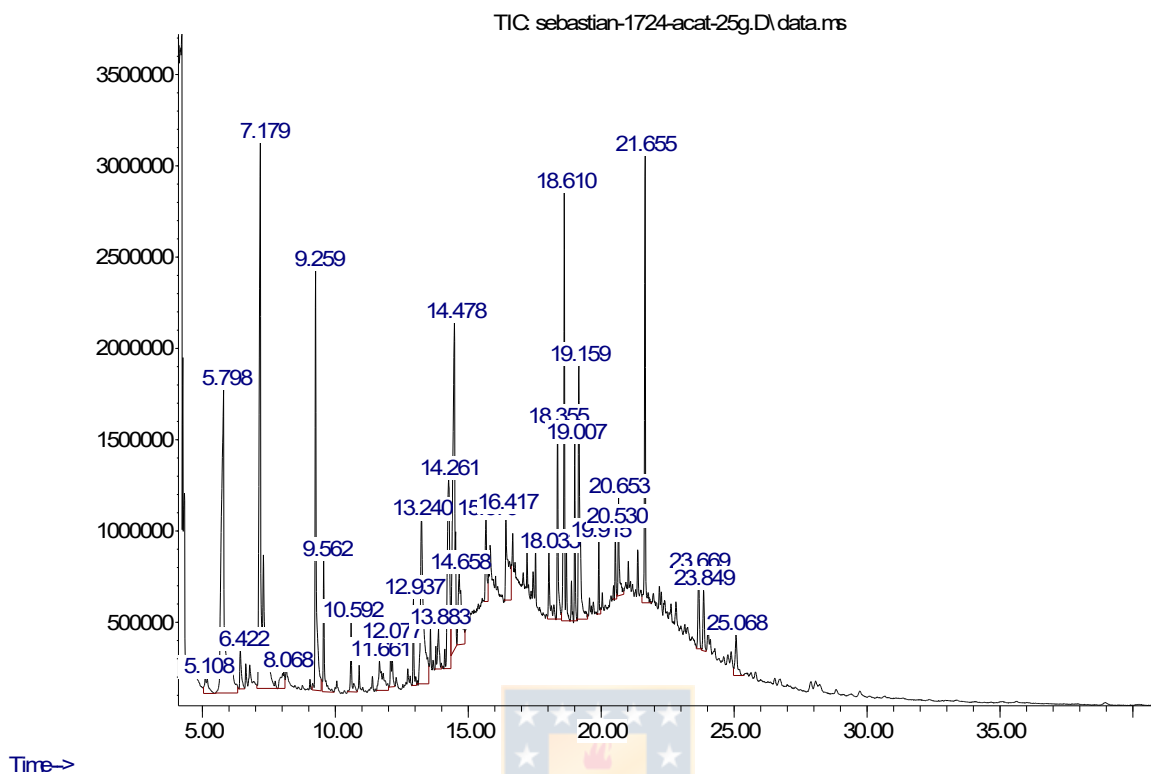


FIGURA 3: Cromatograma del extracto total de acetato de etilo del medio de cultivo de *Polyporus gayanus* 1724 cultivado a 25 °C.

#### IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS MÁS ABUNDANTES PRESENTES EN LOS EXTRACTOS

A continuación, se presenta en detalle el listado de los principales compuestos de interés más abundantes de los extractos totales con acetato de etilo, identificados en los análisis cromatográficos (GC-MS) para los tratamientos de 4 °C (Tabla 1), 10 °C (Tabla 2) y 25 °C (Tabla 3).

TABLA 1: Listado de los principales compuestos de interés del reporte GC-MS del cultivo a 4 °C. Se muestra el tiempo de retención en minutos, su abundancia relativa representada como el área bajo la curva y el nombre del compuesto.

Tiempo de retención (min)	Abundancia relativa (%)	Nombre del compuesto
5.770	11.205	5-Hidroximetilfurfural
7.179	10.613	Alcohol Bencílico
7.784	3.117	p-hidroxi-Benzaldehido
14.308	4.398	3-Isobutilhexahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona
14.526	7.931	3-Isobutilhexahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona
14.753	4.326	3-Isobutilhexahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona
15.651	2.283	Derivado de ácido hexadecanoico
15.821	13.786	Acido hexadecanoico
16.492	17.186	Acido Oleico
19.168	5.092	4-Hexil-1-(7-metoxicarbonilheptil)biciclo[4.4.0]deca-2,5,7-trieno
21.645	2.997	Escualeno



TABLA 2: Listado de los principales compuestos de interés del reporte GC-MS del cultivo a 10 °C. Se muestra el tiempo de retención en minutos, su abundancia relativa representada como el área bajo la curva y el nombre del compuesto.

Tiempo de retención (min)	Abundancia relativa (%)	Nombre del compuesto
5.581	4.466	5-Hidroximetilfurfural
7.179	16.811	Alcohol bencílico
13.278	3.767	1H-Indol-4-carboxaldehído
14.308	6.716	3-Isobutilhexahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona
14.526	11.955	3-Isobutilhexahidropirrol[1,2-a]pirazine-1,4-diona
14.677	4.068	3-Isobutilhexahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona
16.417	5.330	Acido oleico
18.393	4.111	Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil)-
18.610	4.638	Fenol, 2,2'-metilenobis[6-(1,1-dimetiletil)-4-metil-
19.178	7.439	4-Hexil-1-(7-metoxicarbonilheptil)biciclo[4.4.0]deca-2,5,7-trieno
21.645	2.616	Escualeno





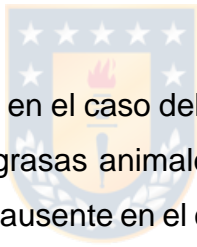
TABLA 3: Listado de los principales compuestos de interés del reporte GC-MS del cultivo a 25 °C. Se muestra el tiempo de retención en minutos, su abundancia relativa representada como el área bajo la curva y el nombre del compuesto.

Tiempo de retención (min)	Abundancia relativa (%)	Nombre del compuesto
5.798	11.988	5-Hidroximetilfurfural
7.179	14.687	Alcohol bencílico
9.259	6.448	4-Quinolinacarboxaldehído
13.240	6.375	1H-Indol-4-carboxaldehído
14.261	5.834	3-Isobutilhexahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona
14.478	9.150	3-Isobutilhexahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona
15.670	1.553	Acido hexadecanoico
16.417	2.820	Acido oleico
18.355	2.557	Pirrol[1,2-a]pirazine-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil)-
18.610	5.658	Fenol, 2,2'-metilenobis[6-(1,1-dimetil)etil]-4-metil-
19.007	2.198	Acido hexadecanoico, 3-[(trimetilsilil)oxi]propil ester
19.159	5.129	4-Hexil-1-(7-metoxicarbonilheptil)biciclo[4.4.0]deca-2,5,7-trieno
21.655	5.299	Escualeno



## DISCUSIÓN

A primera vista los resultados indican la presencia de ácidos grasos insaturados en los tres cultivos analizados mediante cromatografía. Siendo representados principalmente por ácido oleico, el cual fue producido por el hongo bajo los tres tratamientos de diferente temperatura. Sin embargo, al fijarnos en este compuesto en específico, estando presente en todos los cromatogramas, podemos observar que la abundancia relativa de este ácido graso en el extracto total del medio líquido aumenta a medida que disminuye la temperatura de incubación del cultivo. La cantidad de este compuesto en el cultivo incubado a 25° C es de un 2.82% del extracto, en el cultivo incubado a 10° C corresponde a 5.33% y finalmente el cultivo incubado a 4° C presenta un 17.19% de ácido oleico del total del extracto.



Una situación parecida se observa en el caso del ácido hexanoico, otro ácido graso encontrado generalmente en las grasas animales y algunas grasas vegetales. Si bien este compuesto se encuentra ausente en el cromatograma del cultivo incubado a 10° C, sí se encuentra presente en los cultivos incubados a 4° C y 25° C, siendo su abundancia relativa de 13,78% y 1,55% respectivamente. Nuevamente se observa la tendencia de un aumento en cantidad de ácidos grasos a medida que baja la temperatura de incubación de los cultivos, lo cual se condice con la función que proporcionan estos compuestos como componentes de membranas, sobre todo en situaciones de baja temperatura, donde un aumento de la proporción de ácidos grasos insaturados ayuda a mantener la fluidez de las membranas (Shimizu, *et al.* 1988).

De hecho, este fenómeno está bien documentado para varias especies de mohos y hongos filamentosos mesofílicos y psicofílicos, en los cuales se aprecia un aumento en el nivel de insaturación y cantidad de estos ácidos grasos en las

membranas. Además, especies como *Thamnidium* y *Mucor*, al ser cultivadas a una baja temperatura, suelen producir varios tipos de ácidos grasos poliinsaturados poco comunes en otras especies fúngicas (Manocha & Campbell 1978).

Los organismos eucariontes capaces de acumular un 20% o más de su biomasa como lípidos han sido denominados como “oleosos” en relación a plantas altas en aceites denominadas similarmente. Estos organismos están representados principalmente por levaduras, y dentro de las 60.000 especies fúngicas existentes menos de 50 acumulan más de un 25% de lípidos (Akpinar 2014). Estos datos toman gran importancia al notar que el cultivo incubado a 4° C presentó casi un 20% sólo de ácido oleico, pudiendo sobrepasar esta cantidad fácilmente al tomar en cuenta el total de ácidos grasos. También hay que considerar que estos resultados corresponden a las mediciones realizadas a los compuestos liberados al medio de cultivo líquido, por lo que, al medir los compuestos presentes en la biomasa del micelio, sobre todo tratándose de ácidos grasos, es muy probable que se encuentren en una proporción aún mayor.

Esto refuerza el argumento de que las condiciones de cultivo tienen un enorme impacto en la clase de compuestos que producirá el hongo, así como también en la cantidad de los mismos, lo cual tiene importantes implicancias en el ámbito biotecnológico, al pensar en esta especie como un potencial productor de compuestos deseables. Existe evidencia específicamente para microorganismos oleosos de que la cantidad de lípidos que son capaces de acumular está determinada por las condiciones de cultivo (Wynn, *et al.* 2001), y en este aspecto la temperatura podría ser considerado uno de los factores determinantes en lo que respecta a *Polyporus gyanus*, considerando las condiciones naturales del ambiente donde es capaz de desarrollarse.

También hay que tener en cuenta que las cantidades y tipos de lípidos individuales pueden variar entre distintos sitios y estructuras del mismo hongo, dependiendo tanto de la especie, como también de la edad, etapa de desarrollo, nutrición y condiciones ambientales donde se establece y crece el individuo (Weber 1980).

También se ha caracterizado para mohos oleosos la presencia de numerosos esteroides y sus derivados, escualeno y otros hidrocarburos, los cuales pueden proveer una función reguladora de la permeabilidad, afectando la viscosidad y el movimiento molecular de los lípidos de la membrana (Akpinar 2014). La presencia de algunos de estos compuestos se observa también para *Polyporus gyanus*. Esto podría considerarse evidencia de que algunas de las habilidades de los hongos inferiores de ambientes extremos estudiados previamente para modificar su composición química en respuesta a factores como la temperatura ambiental, podrían ser compartidas por algunas especies de basidiomicetes presentes en ambientes similares, al menos en lo que respecta a las especies de hongos degradadores de madera.

Esto se suma al renovado interés en los lípidos microbiales, esto ligado a la necesidad urgente de utilizar recursos renovables alternativos como fuentes de carbono para la producción de lípidos y también al potencial uso médico y nutricional especialmente de los ácidos grasos poliinsaturados (Akpinar 2014). En este escenario, el valor de *Polyporus gyanus* como una potencial especie fúngica productora de metabolitos secundarios de interés toma bastante importancia, representando una oportunidad de obtener uno o más productos naturales de alto valor, derivados del cultivo de este organismo en las condiciones adecuadas.

Un aspecto que vale la pena destacar es la posibilidad de utilizar desechos orgánicos vegetales para el cultivo de hongos productores de ácidos grasos con

valor nutricional y/o farmacéutico, lo que representa un potencial aprovechamiento de una enorme cantidad de biomasa disponible para obtener moléculas deseadas comercialmente (Dong & Walker 2008).

Existe bastante evidencia de las ventajas que ofrecen los sistemas de cultivo microbiales, como la posibilidad de seleccionar los metabolitos específicos que se desean como productos de la fermentación, lo cual a su vez facilita la recuperación y purificación de dichos compuestos (Ward & Singh 2005). Es prudente entonces, sugerir que algunas de estas características puedan ser compartidas con especies de basidiomicetes como la del presente estudio, por lo que trabajos de investigación más profundos son necesarios para establecer el valor real de esta y otras especies relacionadas como posibles productores a gran escala de compuestos valiosos en el ámbito comercial. Esto último toma gran relevancia ante un escenario de escasez de ciertos componentes clave de una dieta saludable presentes en los alimentos consumidos por una población mundial en constante crecimiento.

Dentro de los compuestos presentes en los extractos encontramos dos dicetopiperazinas. Las dicetopiperazinas corresponden a dipéptidos cíclicos formados por dos aminoácidos unidos por un enlace peptídico (Borthwick 2012). Estos compuestos están presentes en una gran diversidad de organismos, tanto procariontes como eucariontes, y por lo general es difícil determinar si son producto de la degradación de proteínas y péptidos o si son en realidad sintetizados *de novo* por el organismo en cuestión (Anke & Antelo 2009).

Una de las dicetopiperazinas presentes en los extractos del medio líquido de los cultivos corresponde a 3-Isobutilhexahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, también conocido como Ciclo (L-Leu-L-Pro). La presencia de este compuesto ha sido reportada en diversas cepas de especies de *Pseudomonas*, aisladas de la rizósfera

de *Triticum aestivum*, mostrando actividad antifúngica y promotora del crecimiento de la misma planta (Saini, *et al.* 2016). En otra cepa de *Pseudomonas* aislada de sedimento marino se encontró también este compuesto junto con otra dicetopiperazina, ambas mostrando actividad antiinflamatoria (Rupesh, *et al.* 2012). Este compuesto también fue encontrado en una cepa de *Pseudomonas* asociada al krill antártico *Euphausia superba*, mostrando actividad antimicrobial contra *Staphylococcus aureus* (Wang, *et al.* 2014).

La segunda dicetopiperazina presente en el medio de cultivo corresponde a Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil)-, también conocido como PPDPH. Este compuesto fue encontrado en el extracto total de una cepa de *Streptomyces* colectada del suelo de campos de arroz en Malasia. Dicho extracto mostró actividad antifúngica contra el hongo patógeno del arroz *Pyricularia oryzae* (Awla, *et al.* 2016). En otra cepa de *Streptomyces* colectada de agua salobre en la India también se encontró la presencia del compuesto PPDPH en su extracto, del cual fue luego purificado. El compuesto puro, además de mostrar actividad antifúngica como en el estudio de Awla, *et al.* 2016, también mostró actividad citotóxica moderada contra la línea celular RAW 264 (Kannabiran 2016).

Como se ha mencionado anteriormente, por lo general es complicado determinar si las dicetopiperazinas presentes en los extractos de cultivos donde se emplea extracto de levadura son efecto de la degradación de las proteínas del mismo medio o si son realmente sintetizadas *de novo* por la especie en estudio (Wang, *et al.* 2010). Sin embargo, estos compuestos se encuentran en una cantidad relativamente alta en los extractos, sobre todo en el de 10° C, por ende, es imperativo realizar un estudio más exhaustivo respecto al verdadero origen de estas moléculas, para así poder determinar si *Polyporus gayanus* es realmente un potencial productor de dicetopiperzinas con una o más actividades biológicas.

También es importante señalar la necesidad de realizar un mayor estudio de las posibles actividades biológicas que pueden presentar los extractos de esta especie, en base a la evidencia mostrada por los compuestos encontrados mediante los análisis cromatográficos. Futuras investigaciones considerarán la realización de diversos ensayos biológicos para probar la bioactividad, tanto de los extractos del medio de cultivo líquido, así como también los extractos de la biomasa del micelio del hongo.



## CONCLUSIONES

La producción de metabolitos secundarios y su variación respecto a la temperatura de cultivo en *Polyporus gayanus* Lév. 1846 fue estudiada mediante cromatografía GC-MS. Los análisis mostraron una tendencia de aumento de algunos ácidos grasos insaturados a medida que baja la temperatura de cultivo.

Este fenómeno se logra apreciar de manera muy evidente en la producción de ácido oleico, la cual aumenta de manera considerable a medida que se disminuye la temperatura del tratamiento. Sin embargo, se requiere un estudio más exhaustivo respecto a la situación que se pueda encontrar en los extractos del micelio de este hongo, ya que allí es posible encontrar la mayor cantidad y diversidad de este tipo de metabolitos, al tener un rol fundamental de estabilización de las membranas ante una baja temperatura.

También destaca la presencia de una importante cantidad de dos compuestos correspondientes a dicetopiperazinas, los cuales han sido reportados en numerosos estudios donde además se destaca su amplio rango de bioactividad. Esto deberá ser corroborado en trabajos futuros mediante diversos ensayos biológicos con el fin de determinar el potencial rol de *Polyporus gayanus* como agente antimicrobial, antifúngico, citotóxico, entre otros.



## REFERENCIAS

- ALEXOPOULOS, C., C. MIMS & M. BLACKWELL. 1996. Introductory Mycology. 4th ed. J. Wiley & Sons, Inc. New York. 869 págs.
- AQUEVEQUE, P., ANKE, T., & STERNER, O. 2002. The himanimides, new bioactive compounds from *Serpula himantoides* (Fr.) Karst. Zeitschrift für Naturforschung C, 57(3-4), 257-262.
- AQUEVEQUE, P., ANKE, T., ANKE, H., STERNER, O., BECERRA, J., & SILVA, M. 2005. Favolon B, a new triterpenoid isolated from the chilean *Mycena* sp. strain 96180. The Journal of antibiotics, 58(1), 61.
- AQUEVEQUE, P., BECERRA, J., PALFNER, G., SILVA, M., ALARCON, J., ANKE, T., & STERNER, O. 2006. Antimicrobial activity of metabolites from mycelial cultures of Chilean Basidiomycetes. Journal of the Chilean Chemical Society, 51(4), 1057-1060.
- AQUEVEQUE, P., T. ANKE, K. SÁEZ, et al. 2010. Antimicrobial activity of submerged cultures of Chilean basidiomycetes. Planta Med. 76: 1787–1791.
- AQUEVEQUE, P., CÉSPEDES, C. L., BECERRA, J., DÁVILA, M., & STERNER, O. 2015. Bioactive compounds isolated from submerged fermentations of the Chilean fungus *Stereum rameale*. Zeitschrift für Naturforschung C, 70(3-4), 97-102.
- AQUEVEQUE, P., C.L. CÉSPEDES, J. ALARCÓN, et al. 2016. Antifungal activities of extracts produced by liquid fermentations of Chilean *Stereum* species against *Botrytis cinerea* (grey mould agent). Crop Prot. 89: 95–

100.

- AQUEVEQUE, P. M., CESPEDES, C. L., KUBO, I., SEIGLER, D. S., & STERNER, O. 2017. The impact of Andean Patagonian mycoflora in the search for new lead molecules. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1401(1), 5-18.
- AKPINAR-BAYIZIT, A. 2014. Fungal lipids: the biochemistry of lipid accumulation. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(5), 409.
- ANKE, T. & WEBER D. 2009. *The Mycota XV Physiology and Genetics*. (K. Esser, Ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, 410 pp.
- AWLA, H. K., KADIR, J., OTHMAN, R., RASHID, T. S., & WONG, M. Y. 2016. Bioactive compounds produced by *Streptomyces* sp. isolate UPMRS4 and antifungal activity against *Pyricularia oryzae*. *American Journal of Plant Sciences*, 7(7), 1077-1085.
- AYER W. A., SUN M., BROWNE L. M. 1992. Chemical investigation of the metabolites from the canadian tuckahoe, *Polyporus tuberaster* *Journal of Natural Products*. 55, No. 5, pp. 649-653.
- BENTLEY, S.D., CHATER, K.F., CERDENO-TARRAGA, A.-M. CHALLIS, G.L., THOMSON, N.R., JAMES, K.D., et al. 2002. Complete genome sequence of the Model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141–147.doi:10.1038/417141<sup>a</sup>
- BINDER, M., JUSTO, A., RILEY, R., SALAMOV, A., LOPEZ-GIRALDEZ, F., SJÖKVIST, E., ... & LARSSON, K. H. 2013. Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. *Mycologia*, 105(6), 1350-1373.

- BLACKWELL, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. *American Journal of Botany*, 98(3), 426-438.
- BORTHWICK, A. D. 2012. 2, 5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. *Chemical Reviews*, 112(7), 3641-3716.
- CHÁVEZ, R., FIERRO, F., GARCÍA-RICO, R. O., & VACA, I. 2015. Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 6, 903.
- CONTRERAS, G., BARAHONA, S., SEPÚLVEDA, D., BAEZA, M., CIFUENTES, V., & ALCAÍNO, J. 2015. Identification and analysis of metabolite production with biotechnological potential in *Xanthophyllomyces dendrorhous* isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 517-526.
- DIGHTON, J. 2016. *Fungi in ecosystem processes* (Vol. 31). CRC press.
- DING, Z., LI, L., CHE, Q., LI, D., GU, Q., AND ZHU, T. 2016. Richness and bioactivity of culturable soil fungi from the Fildes Peninsula, Antarctica. *Extremophiles* 20, 425–435. doi: 10.1007/s00792-016-0833-y
- DONG, M., & WALKER, T. H. 2008. Addition of polyunsaturated fatty acids to canola oil by fungal conversion. *Enzyme and microbial technology*, 42(6), 514-520.
- DURÁN P, BARRA PJ, JORQUERA MA, VISCARDI S, FERNANDEZ C, PAZ C, MORA ML AND BOL R. 2019. Occurrence of Soil Fungi in Antarctic Pristine Environments. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7:28. doi: 10.3389/fbioe.2019.00028

- GARGANO, M. L., VAN GRIENSVEN, L. J., ISIKHUEMHEN, O. S., LINDEQUIST, U., VENTURELLA, G., WASSER, S. P., & ZERVAKIS, G. I. 2017. Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 151(3), 548-565.
- GUNDE-CIMERMAN, N., & ZALAR, P. 2014. Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine in solar salterns around the globe. *Food Technology. Biotechnology*. 52, 170–179.
- HAWKSWORTH, D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1· 5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12), 1422-1432.
- HIBBETT, D. S. 2006. A phylogenetic overview of the Agaricomycotina. *Mycologia*, 98(6), 917-925.
- KELLER, N.P., TURNER, G., & BENNETT, J.W. 2005. Fungal secondary metabolism-From biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 937–947.[doi:10.1038/nrmicro1286](https://doi.org/10.1038/nrmicro1286)
- KELLER, N. P. 2015. Translating biosynthetic gene clusters into fungal armor and weaponry. *Nature Chemical Biology*, 11(9), 671.
- KELLER, N. P. 2019. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 167-180.
- KANNABIRAN, K. 2016. Bioactivity of Pyrrolo [1, 2-a] pyrazine-1, 4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-Extracted from *Streptomyces* sp. VITPK9 Isolated from the Salt Spring Habitat of Manipur, India. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm*, 10(04).

- LIERMANN JC, THINES E, OPATZ T, ANKE H. 2012. Drimane sesquiterpenoids from *Marasmius* sp. inhibiting the conidial germination of plant-pathogenic fungi. *J Nat Prod*; 75:1983–6.
- LIM, F. Y., & KELLER, N. P. 2014. Spatial and temporal control of fungal natural product synthesis. *Natural Product Reports*, 31(10), 1277-1286.
- LORENZEN K, ANKE T. 1998. Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products. *Current Organic Chemistry*; 2:329–64.
- MANOCHA, M. S., & CAMPBELL, C. D. 1978. The effect of growth temperature on the fatty acid composition of *Thamnidium elegans* Link. *Canadian Journal of Microbiology*, 24(6), 670-674.
- MARTÍNEZ, O., & VALENZUELA, E. 2004. Aphyllophorales citados para Chile. *Boletín Micológico*, 19.
- NAMIKOSHI, M. 2006. Biologically active natural products from marine fungi. In *Biomaterials from Aquatic and Terrestrial Organisms* (pp. 297-372). CRC Press.
- NOSANCHUK, J.D., & CASADEVALI, A. 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell. Microbiology*. 5, 203–223. doi:10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x
- OMURA S., IKEDA H., ISHIKAWA J., HANAMOTO A., TAKAHASHI C., SHINOSE M. *et al.* 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci .U.S.A.* 98, 12215–12220. doi:10.1073/pnas.211433198

- PACELLI, C., SELBMANN, L., ZUCCONI, L., RAGUSE, M., MOELLER, R., SHURYAK, I., & ONOFRI, S. 2017. Survival, DNA integrity, and ultrastructural damage in Antarctic cryptoendolithic eukaryotic microorganisms exposed to ionizing radiation. *Astrobiology*, 17(2), 126-135.
- PALFNER, G. 2001. Taxomonische Studein und Ectomykorrizen aus den *Nothofagus-W*aldern Mittelsudchiles. In *Bibliotheca Mycologica*. Vol. 190. J. Cramer Ed.: 1–243. Berlin.
- PANDEY, A., DHAKAR, K., JAIN, R., PANDEY, N., GUPTA, V. K., KOOLIYOTTIL, R., ... & ADHIKARI, P. 2018. Cold adapted fungi from Indian Himalaya: untapped source for bioprospecting. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 1-8.
- RAJCHENBERG, M. 1996. Los hongos pudridores de *Nothofagus pumilio* (Lenga): identificación de los cultivos puros. *Bosque*, 17, 87-100.
- ROBINSON, C. H. 2001. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist*, 151(2), 341-353.
- RUISI, S., BARRECA, D., SELBMANN, L., ZUCCONI, L., & ONOFRI, S. 2007. Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 6(1-3), 127-141.
- RUPESH KR., MOUSHUMI PM., PRASANTHA K., & JAYACHNADRAN S . 2012. Inhibitory effects of bioactive leads isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PS3 and *Pseudomonas fluorescens* PS7 on MAP kinases and down regulation of pro inflammatory cytokines (TNF- , IL-1 ) and mediators (NO, iNOS and COX). *Toxicology in Vitro* 26(4): 571-578.

- SELBMANN, L., ZUCCONI, L., AND ONOFRI, S. (2007). Fungi in Antarctica. Rev. Environ. Sci. BioTechnol. 6, 127–141. doi: 10.1007/s11157-006-9107-y
- SHIMIZU, S., SHINMEN, Y., KAWASHIMA, H., AKIMOTO, K., & YAMADA, H. 1988. Fungal mycelia as a novel source of eicosapentaenoic acid: activation of enzyme (s) involved in eicosapentaenoic acid production at low temperature. Biochemical and biophysical research communications, 150(1), 335-341.
- TIMLING, I., & TAYLOR, D.L. 2012. Peeking through a frosty window: molecular insights into the ecology of Arctic soil fungi. Fungal Ecology 5, 419–429. doi: 10.1016/j.funeco.2012.01.009
- WANG, J. H., QUAN, C. S., QI, X. H., LI, X., & FAN, S. D. 2010. Determination of diketopiperazines of *Burkholderia cepacia* CF-66 by gas chromatography–mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 396(5), 1773-1779.
- WANG, C., TIAN, X., YANG, Q., LU, Y., MA, L., HUANG, H., & FAN, C. 2014. Diversity of Secondary Metabolites from Two Antarctic Microbes *Rhodococcus* sp. NJ-008 and *Pseudomonas* sp. NJ-011. Open Journal of Marine Science, 2014.
- WEBER, D. J. 1980. Lipid metabolism during fungal development. In Lipid biochemistry of fungi and other organisms (pp. 300-316). Springer, Boston, MA.
- WILDMAN, H. 1995. Influence of habitation on the physiological and metabolic diversity of fungi. Can. J. Bot. 73: s907–s916.
- WYNN, J. P., HAMID, A. A., LI, Y., & RATLEDGE, C. 2001. Biochemical events

leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology*, 147(10), 2857-2864.

ZJAWIONY, J. K. 2004. Biologically active compounds from Aphyllophorales (polypore) fungi. *Journal of Natural Products*, 67(2), 300-310.

