



Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales

Diversidad de hongos endófitos asociados al fuste de *Araucaria araucana* (Mol) K. Koch en el Parque Nacional Villarrica, sector Puesco, Chile.

Patrocinante: Sr. Cristian González S.

Trabajo de Tesina presentado como parte
de los requisitos para optar al Título de
Ingeniera en Conservación de Recursos Naturales

SOLEDAD FRANCISCA ORTEGA SIERRA

VALDIVIA
2025

Índice de materias

Página

i	Calificación del Comité de Titulación	i
ii	AGRADECIMIENTOS	ii
iv	RESUMEN	iii
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	<i>Araucaria araucana</i> (Molina) K. Kolch	1
1.2	Hongos endófitos	3
1.3	Hipótesis	5
1.3.1	Objetivo general	5
1.3.2	Objetivos específicos	6
2.	MÉTODOS	7
2.1	Área de estudio	7
2.2	Colecta de muestras	8
2.3	Aislamiento e identificación de hongos endófitos	9
2.3.1	Caracterización morfológica macroscópica	9
2.3.2	Caracterización morfológica microscópica de los hongos endófitos	9
2.3.3	Caracterización molecular de los hongos endófitos	10
2.4	Análisis estadístico	11
3	RESULTADOS	13
3.1	Caracterización morfológica macroscópica	13
3.2	Caracterización morfológica microscópica de los hongos endófitos	14
3.3	Caracterización molecular de los hongos endófitos	16
3.4	Análisis diversidad	18
4	DISCUSIÓN	23
5	CONCLUSIONES	27
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
Anexos	1 Reverso de cepas de hongos endófitos aislados de tarugos de <i>A. araucana</i> .	34
	2 Caracterización morfológica macroscópica de cepas de hongos endófitos aislados de tarugos de <i>A. araucana</i> .	34
	3 Caracterización morfológica microscópica para morfotipos aislados de tarugos de <i>A. araucana</i> .	36
	4 Concentraciones de ADN extraído para morfotipos aislados de tarugos de <i>A. araucana</i> .	42
	5 Análisis de normalidad para índices de Shannon y DAP.	43
	6 Géneros aislados a partir de tarugos de <i>A. araucana</i> y su correspondiente frecuencia de aparición.	43

Calificación del Comité de Titulación

		Nota
Patrocinante:	Sr. Cristian González S.	5,75
Informante:	Sr. Francisco Tello A.	5,35
Informante:	Srta. Javiera Manriquez A.	6,2

El Patrocinante acredita que el presente Trabajo de Titulación cumple con los requisitos de contenido y de forma contemplados en el Reglamento de Titulación de la Escuela. Del mismo modo, acredita que en el presente documento han sido consideradas las sugerencias y modificaciones propuestas por los demás integrantes del Comité de Titulación.



Sr. Cristian González S.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradecer al Dr. Cristian González por su elección al elegirme para realizar este proyecto, a Francisco Tello por su apoyo en los análisis estadísticos y especialmente a Javiera Manriquez por todo lo enseñado y su constante apoyo a pesar de las limitaciones de tiempo en la realización de los análisis en laboratorio, sin este paso hubiera sido imposible llevar a cabo la investigación. De igual manera agradecer al Laboratorio de Salud de Bosque y a sus integrantes por su apoyo y orientación en diversos ámbitos.

A mi familia en su gran extensión por siempre confiar en mí y mis capacidades, a Ginette Sierra, por sus palabras, por su apoyo incondicional desde la distancia y por ser un pilar fundamental para seguir adelante a pesar de las adversidades. A César Añazco, por su sabiduría y enseñarme el valor de la naturaleza desde la infancia, les agradezco a ambos su confianza para darme la posibilidad de estudiar lo que más me mueve.

A mis amigas y amigos que fueron un hogar estos años de aprendizaje, que me sostuvieron e hicieron este proceso mucho más amigable, sin ellas/os nada de esto hubiera sido lo mismo.

RESUMEN

Araucaria araucana es una especie endémica de Chile y Argentina de gran importancia científica, a pesar de ser catalogada como un fósil viviente, se desconocen gran parte de sus interacciones con microorganismos con los que coexiste como lo son los hongos endófitos. Los hongos endófitos son organismos que habitan y establecen relaciones con sus hospederos sin causar un daño aparente, estos se desarrollan la mayor parte de su vida dentro de los tejidos de la planta. La diversidad de hongos endófitos que habitan en *A. araucana* y su relación ecológica con la conífera ha ido escasamente estudiada, el objetivo del estudio fue determinar la diversidad de hongos endófitos asociados al fuste de *A. araucana* en el Parque Nacional Villarrica. Para ello se extrajeron 20 tarugos de individuos de *A. araucana*, dividiendo en 10 segmentos cada tarugo, se extrajo el ADN de un total de 31 aislados de cultivos puros caracterizados morfológicamente y por medio de análisis molecular se amplificó y secuenció la región del espaciador transcrito interno (ITS) y la subunidad grande (LSU). Se identificaron 17 géneros y una clase (Eurotiomycetes) de hongos endófitos asociados al fuste de *A. araucana*, la mayoría correspondientes a la división Ascomycota (88,9%), seguido de Basidiomycota (5,6%) y la división Mucoromycota (5,6%). La comunidad fúngica presentó una diversidad moderadamente alta (2,38) de hongos endófitos con una baja dominancia por parte de algún género y equilibrados en su abundancia. La mayor abundancia estuvo representada por el género *Penicillium* (Eurotiales), seguido de *Pragmopora* (Helotiales) y *Coniothyrium* (Pleosporales). La comunidad fúngica del estudio comprendió en su mayoría hongos con roles principalmente endófitos, sin embargo, una minoría representó roles principalmente patógenos. La identificación de la diversidad de hongos endófitos que alberga *A. araucana* juega un rol importante para poder reconocer su asociación endofítica y las interacciones específicas entre estos hongos endófitos y su hospedero.

Palabras clave: *Araucaria araucana*, hongos endófitos, comunidad fúngica

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Araucaria araucana* (Molina) K. Kolch

Araucaria araucana (Molina) K. Kolch, es una especie perteneciente a la familia Araucariaceae, la cual está representada en Chile únicamente por el género *Araucaria*. Esta conífera es una especie perennifolia y dioica de hasta 50 metros de altura; tronco de hasta 2 metros de diámetro (Goth *et al.* 2014). La copa es reducida en los árboles maduros con ramas insertas en verticilos regulares que les da un aspecto de paraguía de base circular (Díaz-Vaz 1984). La corteza es gruesa, agrietada y en forma de placas hexagonales (García y Ormazabal 2008).

A. araucana es endémica de Chile y Argentina, la superficie total que ocupa la especie no supera los 450.000 ha, de las cuales el 75% pertenecen a Chile (casi la totalidad protegida) y el resto a Argentina (36% protegidas) (Goth *et al.* 2014). En Chile se distribuye en la Cordillera de los Andes desde Laguna del Laja, Provincia del Biobío, hasta el norte de la Provincia de Valdivia, entre los 800 y 1.700 metros de altitud (García y Ormazabal 2008). Mientras que su distribución costera es discontinua en la cordillera de Nahuelbuta, Provincia de Malleco, y en los Altos de Tirúa, sector de Villa Las Araucarias, Provincia de Cautín (García y Ormazabal 2008), donde se presenta desde los 850 hasta los 1.400 m s.n.m. (González *et al.* 2013). En Argentina se ubica en Ruca Choroy (Neuquén) y su zona aledaña Pulmarí, cubriendo 4.000 ha; el 66% de esta superficie se encuentra dentro del Parque Nacional Lanín (Goth *et al.* 2014).

A. araucana se encuentra en rodales puros o asociada principalmente a distintas especies del género *Nothofagus*, donde comúnmente se presenta como un árbol dominante (González *et al.* 2013). Presenta diversas asociaciones de acuerdo con la altitud y latitud en que se encuentre este tipo forestal, las comunidades vegetales asociadas a altas cumbres de Nahuelbuta se denominan bosques resinosos templado costero de *A. araucana* (Luebert y Pliscoff 2018), con la presencia de *A. araucana* que se asocia principalmente a *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst. (Luebert y Pliscoff 2018). En latitudes intermedias se asocia con *N. dombeyi* y *Nothofagus pumilio* (Poepp. Et Endel.) Krasser. (Drake *et al.* 2005), mientras que la asociación Araucaria-Lenga es la más característica del nivel altitudinal superior y la asociación Araucaria-Coigüe lo es en los sectores medios de las laderas occidentales de la Cordillera de los Andes (Drake *et al.* 2005).

En los Andes forma extensos rodales puros, a menudo sobre pronunciadas laderas volcánicas o en asociación con especies del bosque templado lluvioso que incluyen *Nothofagus antártica* (G. Forst.) Oerst., *N. dombeyi*, *N. pumilio*, *Saxegothaea conspicua* Lindl. y escasamente *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Milanca (Goth *et al.* 2014). Entre los 1.200 y 1.600 m s.n.m., en las laderas altas de la cordillera

de los Andes de las regiones del Biobío y de La Araucanía se presentan formaciones dominantes de *A. araucaria*, denominados Bosques resinosos de coníferas (Lueber y Pliscoff 2018). Los bosques de *A. araucana* son los más septentrionales, bajo condiciones relativamente frías y secas y en algunos casos marcan el límite altitudinal de la vegetación. (Lueber y Pliscoff 2018).

A. araucana es una especie de lento desarrollo y muy longeva ya que alcanza aproximadamente los 1000 años (González *et al.* 2013). Crece en sitios altamente restrictivos asociada a suelos poco profundos y de buen drenaje, sobre rocas volcánicas andesíticas y basálticas cuaternarias cubiertas por capas de cenizas volcánicas recientes, pumicitas y escorias volcánicas (González *et al.* 2013).

Las poblaciones de *A. araucana* presentan una alta capacidad de adaptación y plasticidad, sobreviviendo a condiciones extremas con limitaciones ambientales como vientos, vulcanismo, incendios y falta de agua predominante en los suelos en los que crece. Sin embargo, su drástica disminución ha estado influenciada principalmente por el efecto del cambio climático y las presiones antrópicas, como la ganadería, la recolección excesiva de semillas y de leña por el ser humano, la invasión de pinos exóticos plantados masivamente, o la ocurrencia de incendios severos (Sanguinetti 2014), por lo que la preservación de la diversidad genética de las poblaciones remanentes se ha visto afectada (González *et al.* 2013).

Estudios recientes han revelado la existencia de una diferenciación genética entre las poblaciones costeras y andinas, con diferencias significativas como resultado. Estas variaciones podrían explicarse por la separación de poblaciones debido a eventos de glaciación y/o vulcanismo o estarían actualmente aisladas debido a un restringido flujo de genes (González *et al.* 2013).

Otra fuerte presión que ha sufrido *A. araucana* en los últimos años ha sido su situación sanitaria, el fenómeno denominado Daño Foliar de la Araucaria (DFA), se ha caracterizado por la desecación progresiva del follaje, comenzando desde las ramas inferiores hacia la copa, pudiendo culminar en la muerte del árbol. Desde su detección, CONAF ha liderado múltiples trabajos en conjunto con entidades públicas y privadas, academia y organismos internacionales, con el objeto de levantar información sobre el estado actual de los bosques de Araucaria y determinar las posibles causas del DFA (CONAF s/f).

Su tala masiva hasta mediados del siglo XX la llevó a ser considerada una especie con riesgo de extinción. En 1990 fue declarada Monumento Natural, prohibiendo su explotación y corta ilegalmente, actualmente el estado de conservación de *A. araucana* es en peligro según la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), y declarada vulnerable por el Ministerio del Medio Ambiente el año 2017, mientras que las poblaciones de la cordillera de Nahuelbuta se encuentran

en categoría peligro de extinción (MMA 2020). A pesar de su protección legal, los bosques de *A. araucana* siguen estando bajo una continua presión de disminución de superficie.

La disminución de individuos juveniles por falta de reproducción sexual y el consiguiente envejecimiento y/o la pérdida genética por falta de nuevas generaciones de árboles (Roig *et al.* 2013), conlleva a un futuro incierto para la regeneración de la especie. Actualmente diversas prácticas de restauración y conservación se llevan a cabo para mantener el acervo genético de la especie, tales como la migración asistida, el rescate de germoplasma y la viverización, las cuales buscan efectuar iniciativas de restauración con el material genético que se rescata. Particularmente, la migración asistida se ha aplicado tanto dentro de la distribución geográfica de *A. araucana*, como en el margen o fuera de su distribución histórica, con el fin de salvaguardar el potencial evolutivo de la especie (Ipinza 2019).

1.2 Hongos endófitos

Los hongos endófitos se definen como organismos que habitan al interior de la planta en cualquiera de sus órganos sin causar daño aparente al huésped (Petrini 1991), se pueden dividir en dos grupos, endófitos clavicipitales y no clavicipitales. Los clavicipitales forman simbiosis casi exclusivamente con gramíneas hospedantes, colonizan sistemáticamente a sus huéspedes y se transmiten verticalmente mediante semillas (Sieber 2007). Según Clay y Schardl (2002), las asociaciones pasto/endófito se basan principalmente en la protección del huésped contra estrés biótico y abiótico, mientras que los no clavicipitales representan especies de varias familias de ascomicetos, estos pueden aislarse de tejidos asintomáticos de plantas no vasculares, helechos y aliados, coníferas y angiospermas (Sieber 2007).

Los estudios de hongos endófitos en árboles, arbustos y helechos muestran que las especies individuales e incluso las plantas individuales típicamente albergan decenas de especies de hongos (Saikkonen *et al.* 1998). A pesar de la diversidad y abundancia que presentan los endófitos de plantas leñosas, la interacción entre el endófito y su planta hospedante ha sido poco estudiada, además, ha habido pocos intentos de integrar los aspectos ecológicos y aspectos evolutivos de los endófitos de pastos y plantas leñosas (Saikkonen *et al.* 1998).

En cuanto al origen evolutivo de los hongos endófitos, los endófitos de plantas leñosas son más diversos que los de gramíneas con respecto a géneros y especies, esto debido a la amplia gama de plantas hospedantes a nivel taxonómico (Saikkonen *et al.* 1998). Los endófitos de las plantas leñosas tienen rangos de huéspedes más amplios que los endófitos de las gramíneas y, por lo tanto, parecen estar más generalizados que los endófitos de las gramíneas (Saikkonen *et al.* 1998). Se cree que los endófitos tanto

de pastos como de plantas leñosas evolucionaron partir de hongos parásitos o patógenos (Saikkonen 2007). Para los hongos endófitos de plantas leñosas, Saikkonen (2007) señala que posiblemente su evolución fue a partir de una extensión de periodos de latencia y una reducción de la virulencia.

El rol ecológico de los hongos endófitos es variado, la interacción con otros microorganismos puede generar variadas respuestas, su relación con la planta hospedera puede ir desde el mutualismo hasta la patogénesis (Rodríguez *et al.* 2009). El mutualismo ha predominado el marco conceptual sobre la evolución y ecología de los hongos endófitos, se han descrito diversos endófitos como mutualistas que protegen tanto a las gramíneas como a las coníferas contra la herbivoría de los insectos (Stone *et al.* 2004), Rosa (2021) expresa que las plantas maduras de *Festuca alta* infectadas por el endófito *Neotyphodium coenophialum* muestran una mayor tolerancia a la sequía y resistencia a las plagas de insectos y nemátodos aéreos y subterráneos.

De manera similar, Carroll (1988) propuso que los endófitos de las plantas leñosas desempeñan un papel defensivo para la planta huésped porque producen una amplia gama de micotoxinas y enzimas que pueden inhibir el crecimiento de microbios y herbívoros invertebrados. Al tomar el rol mutualista, los hongos endófitos inducen el crecimiento de la planta hospedera a cambio de tomar nutrientes y protegerse en ella, retribuyendo y beneficiando a la planta al aumentar su tolerancia al estrés y al producir metabolitos secundarios (Sánchez *et al.* 2013). La producción de metabolitos secundarios potencialmente tóxicos puede producir factores de virulencia, como exoenzimas y metabolitos fitotóxicas, para que se produzca la relación endofítica con un hongo endófito y su planta hospedera se establece una relación de antagonismo balanceado, la cual depende de la virulencia del hongo y de las defensas de la planta (Rosa 2021), sin embargo, cuando la planta se encuentra bajo condiciones de estrés el balance se torna a favor del hongo expresándose como patógeno.

Los hongos endófitos muestran característicamente un periodo prolongado y discreto en el que el crecimiento y la colonización cesan temporalmente, reanudándose tras un cambio físico o madurativo en el hospedador (Stone *et al.* 2004). En cuanto a la reproducción de endófitos en plantas leñosas, estos se transmiten horizontalmente a través de esporas asexuales, sin embargo, la frecuencia de reproducción asexual y sexual de los hongos endófitos no ha sido estudiada extensamente en plantas leñosas (Saikkonen *et al.* 1998).

Su presencia sólo se revela externamente cuando esporulan, lo que suele ser un acontecimiento estacional y efímero (Stone *et al.* 2004), además de esto, suelen ser muy específicos de un hospedador o tejido, dificultando su muestreo, los métodos convencionales son inadecuados para enumerar con

precisión a los hongos endófitos, y los detalles de la distribución incluso de los taxones más conocidos siguen siendo incompletos (Stone *et al.* 2004). Por otro lado, su detección y cuantificación suelen requerir procedimientos de aislamiento selectivo. La identificación suele implicar el examen microscópico del tejido del huésped y a menudo requiere un alto grado de conocimientos taxonómicos (Stone *et al.* 2004).

El estudio e interés entorno a los hongos endófitos ha ido en aumento debido a su contribución en la ecología vegetal y fúngica, la biología evolutiva y la investigación aplicada, desde el control biológico hasta la bioprospección (Arnold 2007). Los endófitos tienen potenciales usos como controladores biológicos, hasta el momento el control biológico ha sido empleado con éxito en el control de varias patologías vegetales (Flores 2017).

Estudios que se han realizado sobre el control biológico con hongos endófitos se han centrado en control de patógenos como *Fusarium circinatum*, *Phytophthora alni*, *P. plurivora.*, *Gremmeniella abietina*, *Cryphonectria parasitica* y *Heterobasidion annosum* mediante el uso de hongos endófitos destacando el género *Trichoderma* spp. y *Aspergillus* (Flores 2017). Además de estos, existen fitopatógenos que se pueden comportar como endófitos y también han sido utilizados como agentes de control biológico, Solís *et al.* 2023 ejemplifica con *Colletotrichum* y sus especies *C. tofieldiae* (Hiruma *et al.* 2016), *C. siamense* (Munasinghe *et al.* 2017) y *C. gloeosporioides* (Rabha *et al.* 2014).

Bajo este contexto, el estudio de hongos endófitos abre nuevas posibilidades a la investigación de sus potenciales usos como biocontroladores para plagas o enfermedades a las que se puedan ver sometidas las plantas hospederas, como puede ser el caso de *A. araucana*. El primer paso para proveer un control biológico para posibles afecciones es conocer la diversidad de microorganismos endófitos que existen en la planta hospedera, y su potencial para confrontar al posible patógeno. A partir de ello nacen la siguiente pregunta de investigación:

¿Cómo varía la diversidad de hongos endófitos entre distintos individuos de *A. araucana*?

1.3 Hipótesis

Existe una alta diversidad de hongos endófitos asociados al fuste de *A. araucana*, ya que al ser una especie relictiva y con alta capacidad de adaptación ecológica, proporciona un ambiente estable para establecer comunidades endófitas complejas.

1.3.1 Objetivo general

Determinar la diversidad de hongos endófitos asociados al fuste de *A. araucana*, utilizando como

modelo de estudio individuos del sector Puesco, Parque Nacional Villarrica, Chile.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Identificar de manera morfológica y molecular cepas de hongos endófitos extraídos de tarugos de madera de *A. araucana* desde el Parque Nacional Villarrica.
2. Caracterizar géneros de hongos endófitos extraídos de tarugos de madera de *A. araucana* desde el Parque Nacional Villarrica.
3. Determinar índices de diversidad de hongos endófitos a partir de tarugos de *A. araucana*.

2. MÉTODOS

2.1 Área de estudio

El área de estudio se ubica en el Parque Nacional Villarrica ($30^{\circ} 28' S$ $71^{\circ}45' O$), delimitado entre la región de La Araucanía y la región de Los Ríos, en las provincias de Cautín y Valdivia.

El Parque Nacional Villarrica se distribuye en tres sitios, Rucapillán, Quetrupillán o Chinay y el sector Puesco (Mera 2009). La topografía se caracteriza por altas cumbres y quebradas de pendientes abruptas, con una altitud que varía entre 600 y 3.747 m s.n.m. El clima se caracteriza por lluvias concentradas en invierno, con precipitaciones anuales que varían entre los 2.500 y los 3.000 mm; y nevazones que suelen alcanzar los 2 m de altura. Durante la temporada estival (enero-marzo) las temperaturas mínimas son de $9^{\circ}C$ y las máximas fluctúan entre los 20 y $23^{\circ}C$ (Mera 2009).

Mera (2009) constata que Finckh (1995) realizó un análisis detallado de las comunidades boscosas del Parque Nacional Villarrica, dividiéndolas en bosques siempreverdes (asociación de especies con hojas caducas y perennes), de *N. pumilio* y achaparrados de *N. antartica*. Los bosques de *N. pumilio* descritos por Finckh (1995) son cuatro, de los cuales tres comparten el sitio con *A. araucana* (Mera 2009). La asociación más importante de destacar descrita por Finckh (1995) que forma parte del parque, son los grupos aislados de *A. araucana* sobre el límite actual de los bosques (Mera 2009), los cuales se encuentran entre la vertiente sur y la sureste del volcán Villarrica a unos 1.400 m s.n.m.

Dentro de este parque se eligió el sector Puesco ($71^{\circ}, 33' O$ y $39^{\circ}, 32' S$) para la toma de muestras, ubicado a unos 56 km. de Pucón y a 25 km de Curarrehue (figura 1), el área de estudio en específico presenta una comunidad vegetacional compuesta por *A. araucana* y *N. antarctica*, donde se percibe una marcada estructura de dos estratos. El estrato superior alcanza entre 8 a 10 m y está constituido por individuos dispersos y de baja cobertura (CONAF 2013), mientras que el estrato inferior presenta una altura promedio de 6 m, más denso y con mayor cobertura se presenta Ñirre (CONAF 2013). Esta zona corresponde a formaciones de segundo crecimiento, ubicados en terrenos preferentemente planos hasta terrenos con pendientes moderadas, entre los 1.200 a 1.600 m s.n.m. (CONAF 2013).

Sector Puesco, Parque Nacional Villarrica, Chile

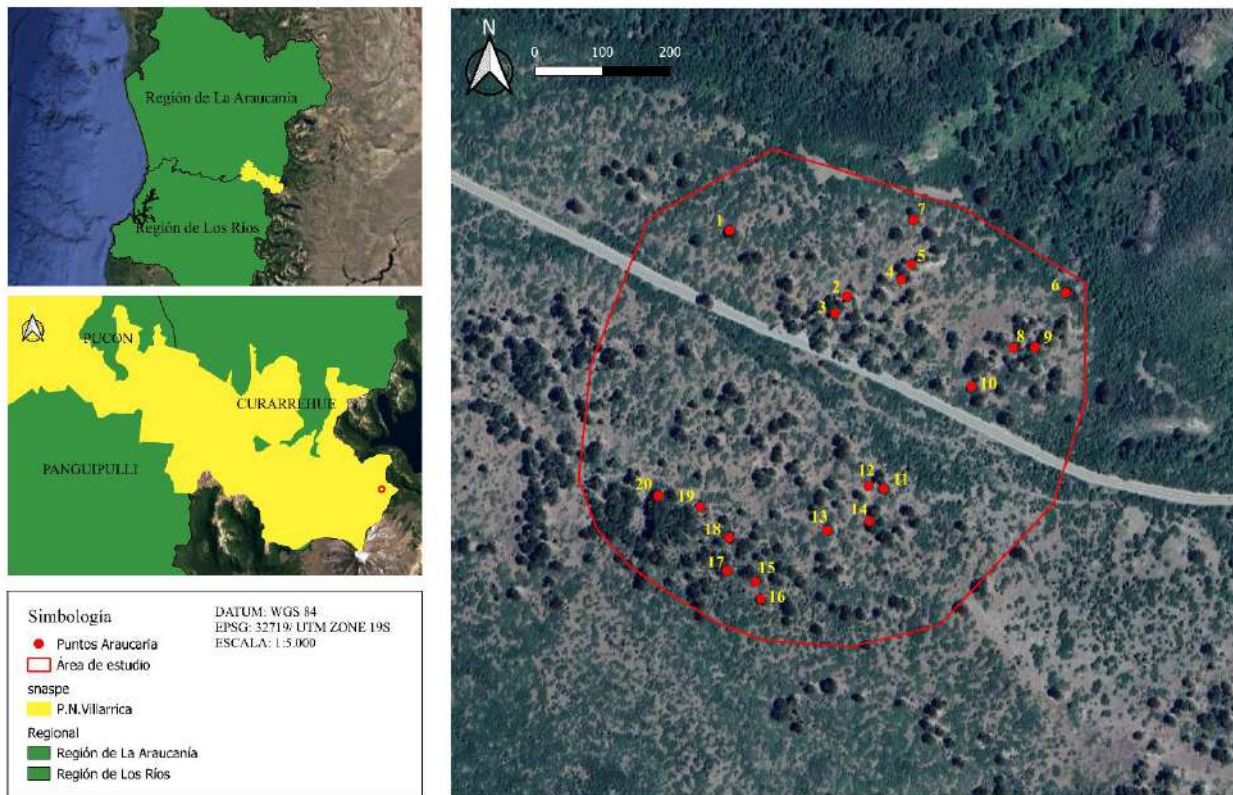


Figura 1. Área de estudio en el sector Puesco, Parque Nacional Villarrica. Los puntos rojos representan a los individuos de *A. araucana* muestreados.

2.2 Colecta de muestras

Se identificaron 20 árboles juveniles de *A. araucana* en el sector de estudio, a los cuales se les midió la altura, el DAP y coordenadas. A cada individuo se le extrajo un tarugo de aproximadamente 10 cm de largo y 0,5 de diámetro. La extracción se realizó a 1,3 m de altura desde el suelo, utilizando un taladro de incremento desinfectado con alcohol al 70% y se almacenaron en tubos falcón estériles de 50 ml rotulados. Los tarugos se almacenaron en un cooler para posteriormente ser trasladados al Laboratorio de Salud de Bosque de la Universidad Austral de Chile para su posterior procesamiento.

2.3 Aislamiento e identificación de hongos endófitos

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Salud de Bosque de la Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales de la Universidad Austral de Chile en la cámara de flujo laminar. Cada muestra de tarugo se dividió en 10 segmentos de 1 cm, en donde cada segmento (disco) fue sembrado en placas petri de dimensiones 90 x 15 mm con medio de cultivo compuesto por 19,5 g de Agar Papa Dextrosa (PDA), disuelto en 500 ml de agua destilada y suplementado con 0,005 g de antibiótico cloranfenicol. En cada placa petri se dispuso de cinco discos equidistantes entre sí, teniendo como resultado dos placas de PDA por cada muestra de tarugo, esto con el objetivo de aumentar la oportunidad de crecimiento de unidades formadoras de colonias.

Una vez procesadas todas las muestras, se sellaron con papel Parafilm para mantener su condición estéril, para posteriormente incubarlas en la estufa de cultivo a ± 24 °C de temperatura en completa oscuridad, los periodos de incubación de las muestras dependieron de la aparición de micelio, con un tiempo límite de 30 días. Transcurrido este periodo se realizó el repique de las colonias fúngicas en placas petri de dimensiones 60 x 15 mm con medio de cultivo PDA, con el fin obtener colonias puras. Cada muestra se rotuló con un código único de identificación y se realizaron tres réplicas de cada muestra repicada; una se utilizó para la identificación morfológica y microscópica; la segunda para la identificación molecular; y, la tercera para ser conservada en el cepario del Laboratorio de Salud de Bosque.

2.3.1 Caracterización morfológica macroscópica

Se realizó una caracterización morfológica preliminar de los aislados de colonias puras, se describieron sus características macroscópicas a partir de la metodología de Mier *et al.* (2002), se describió su aspecto (liso, rugoso, vellosos, cerebriforme, lanoso, floccoso, butiráceo), superficie (plana, convexa, umbonada, etc.) y consistencia (dura, blanda, mucoide, elástica, etc.). Se determinó el color del anverso y reverso de cada colonia por medio de tabla Munsell (Munsell 2009). Los aislados se agruparon según sus características macroscópicas, designándole un código único a cada agrupación para facilitar su identificación a nivel de género.

2.3.2 Caracterización morfológica microscópica de los hongos endófitos

Para cada agrupado se realizó identificación de estructuras reproductivas asexuales y esporas bajo

microscopio para poder reconocer que tan distintos eran los agrupados entre sí, y por medio de Barnett y Hunter 1998, se realizó una descripción de las esporas encontradas, asociándolas a la descripción de géneros con los que más coincidían las características. Para la identificación se utilizó la técnica de tinción de azul algodón de lactofenol (López-Jácome *et al.* 2014), la cual consistió en aplicar una gota de la tinción directamente sobre el portaobjeto y por medio de una impresión utilizando cinta adhesiva transparente, se puso una muestra microbiológica de micelio de cada cepa agrupada. La distinción se realizó bajo microscopio en el objetivo 40x, las estructuras reproductivas y esporas observadas fueron fotografiadas y analizadas a través del programa de software ImageJ, con el fin de medir el largo y ancho promedio de las esporas.

2.3.2 Caracterización molecular de los hongos endófitos

Para la identificación molecular de cada cepa, se extrajo el ADN del micelio desde cultivos puros con un crecimiento de 14 días con una temperatura de 25° C, utilizando un kit de extracción ADN fúngico E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-tek, Atralnta Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la concentración de ADN de cada cepa mediante un fluorómetro (Qubit4), tomando dos medidas de concentración con el fin de evaluar la calidad del ADN a utilizar.

Se realizaron 31 reacciones PCR, donde se utilizó un volumen total de 25 µl para cada reacción, la cual contenía 12,5 µl de SapphireAmp Fast PCR Master Mix (Takara), 2 µl de ADNg (10 ng/µl), 0,5 µl de cada cebador directo e inverso y 9,5 µl de agua desionizada.

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador Veriti™ (Applied Biosystems, USA). Se amplificaron dos marcadores: la región del espaciador transcrito interno (ITS) del ARNr [~450-800 pb] utilizando los primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') /ITS5 (5'-GGT GAGAGATTTCTGTGC-3) (White *et al.* 1990), primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') /ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (Williams *et al.* 1995). Y la subunidad grande (LSU, 28S) del ARNr [~1200 pb], utilizando el primer LR0R (5'-GTACCCGCTGAACTTAAGC-3'). Los cebadores y los perfiles térmicos de cada PCR se describen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Primers y perfiles térmicos de PCR usados para amplificar ITS y LR0R.

Región	Primer	PCR
ITS	ITS1-ITS2	3 min 95°C, 30x (1 min 95°C, 1 min 55°C, 2 min 72°C), 8 min 72°C
ITS	ITS4-ITS5	3 min 94°C, 35x (45 seg 94°C, 45 seg 53°C, 1 min 72°C), 15 min 72°C
nrLSU	LR0R-LR5	5 min 94°C, 35x (1 min 94°C, 30 seg 50°C, 2 min 72°C), 15 min 72°C

Los productos PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, la preparación del gel se llevó a cabo en un matraz de 125 ml que contenía 0,525 g de agarosa disueltos en 30 ml de tampón TAE 1x. La solución final se llevó al microondas por 30 segundos para su disolución y fue vertida en la bandeja del gel junto con los peines, los que permitieron la formación de pocillos donde se cargaron los productos de PCR. Una vez solidificado, el gel fue transferido a la cámara de electroforesis y se añadió tampón TAE 1x hasta que el gel quedó completamente cubierto.

En papel Parafilm se mezclaron 3 µl de producto de PCR con 1,5 µl de tampón de carga 6x (DNA loading dye), los cuales fueron posteriormente cargados en el gel y llevados a la cámara de electroforesis. La corrida se realizó a 100V por 40 minutos, para finalmente visualizar el gel a través de un transiluminador UV y ser fotografiado para obtener los resultados. La secuenciación se realizó en una dirección (forward) y se llevó a cabo en el Core facility, por el servicio AUSTRAL-omics (Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile).

2.4 Análisis estadístico

Para el análisis molecular de las secuencias obtenidas por el servicio Austral-omics, los archivos ABI fueron visualizados a través del programa Chromas (versión 2.6.6). Las secuencias de nucleótidos que se obtuvieron fueron comparadas a través de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, USA), con el fin de comparar las secuencias homologas presentes en la base de datos de secuencias genéticas GENBANK del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa de software Excel y el software R-Studio (versión 4.5.1), se utilizó inteligencia artificial generativa para la generación de los códigos de scripts de R-Studio.

Se generó una base de datos para el agrupamiento de morfotipos preliminares de hongos endófitos identificados a partir de sus características morfológicas, considerando variables cuantitativas (largo conidia, ancho conidia) y cualitativas (color anverso, color reverso y aspecto), con el fin de generar un análisis de agrupamiento jerárquico en un diagrama de árbol (dendrograma). Las variables cualitativas

fueron convertidas a factor a través del paquete `dplyr()`, posteriormente a través de la función `daisy()` del paquete `cluster` se construyó una matriz de similitud mediante el coeficiente de Gower diseñado para datos mixtos. Posteriormente se realizó el agrupamiento jerárquico a partir de la función `hclust()` aplicando el método Ward.D2, el cual fusiona clústeres de forma reiterada minimizando el aumento de la varianza total dentro del clúster. Se utilizó el método de medida de agrupación (Silhouette) para determinar el número de *k*. El diagrama de árbol fue visualizado a través del paquete `factoextra` por medio de la función `fviz_dend()`.

Posteriormente se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) sólo a las cepas que se logró identificar esporas asexuales, el cual se realizó con las variables cuantitativas (largo conidia, ancho conidia) con la función `prcomp()`. Se estandarizaron las variables a través de la función `scale()` y posteriormente se definió la distancia euclidiana a través de la función `dist()` y se aplicó el método de Ward.D2, posteriormente se determinó el porcentaje de varianza explicada de cada componente principal utilizando `summary(res.pca)$importance`. La representación bidimensional se graficó a través de la función `ggplot`.

Para evaluar la eficiencia del muestreo realizado se construyó una curva de rarefacción y extrapolación utilizando el paquete `iNEXT`, para ello se utilizó una matriz de abundancia por géneros de hongos endófitos, considerando el número de Hill de orden $q = 0$ (Chao *et al.* 2014). El gráfico fue visualizado a través de la función `ggplot2`.

Se estimó la diversidad sólo para las morfoespecies identificadas a nivel molecular, mediante los índices de Shannon-Wiener (H') y Simpson (1-D) se estimó la diversidad tanto a nivel general de la comunidad de hongos endófitos, como individualmente para cada árbol muestreado. Los valores del índice de Shannon-Wiener varían entre 0 a 5, mientras más alto el valor mayor es la diversidad, para su cálculo se utilizó la siguiente fórmula:

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

Donde p_i es la proporción de individuos de cada especie según el total de individuos por el logaritmo natural de la misma proporción (Magurran 2004).

Se utilizó el índice de Simpson (D), el cual indicó si hay una dominancia de género por árbol, si su valor es cercano a 1 existe un género dominante, por el contrario, si es cercano a 0 hay un balance en los géneros. Para su cálculo se utilizó la siguiente fórmula:

$$D = \sum p_i^2$$

Esta fórmula indica la sumatorio de la proporción de individuos de cada especie al cuadrado (Magurran 2004).

Se calculó el índice de Equitatividad de Pielou (J') el cual representó la uniformidad en la abundancia de géneros, su rango varía entre valores de 0 a 1, siendo 1 más equitativo. Para su cálculo se utilizó la siguiente fórmula:

$$J' = H/H_{max} = H/\ln S$$

Se generó un gráfico de dispersión con el fin de observar si existía correlación entre el DAP de cada árbol y la diversidad de Shannon calculada para cada uno, para ver si existía una tendencia a tener más diversidad de hongos endófitos a un mayor diámetro de árbol. Se evaluó normalidad a través de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los datos de DAP de los árboles y del índice de Shannon correspondiente a los géneros identificados. Se aplicó el coeficiente de correlación de Spearman puesto que los datos no cumplieron el supuesto de normalidad. El gráfico se visualizó con la función `ggscatter()` del paquete `ggpubr`.

3. RESULTADOS

Se obtuvo un total de 102 aislados de hongos endófitos provenientes de los 20 tarugos de madera colectados de *A. araucana*. Algunos aislados fueron descartados del total final debido a la contaminación de la placa Petri con bacterias o por los propios tiempos de crecimiento entre hongos endófitos, en donde hongos de crecimiento más rápido pudieron detener el crecimiento de otros hongos perdiéndose en la placa.

3.1 Caracterización morfológica macroscópica

Los aislados fueron separados en base a las diferentes características macroscópicas descritas (anexo 2) donde se describió la diferenciación entre el tipo de micelio, textura y coloración de micelio y agar, obteniendo un total de 33 morfotipos, cada uno con un código único para su posterior identificación (figura 2), lo que se realizó de igual manera con el reverso (anexo 1). La agrupación se definió como morfotipo ya que según su taxonomía son visualmente similares, pero podrían pertenecer a diferentes especies o géneros.

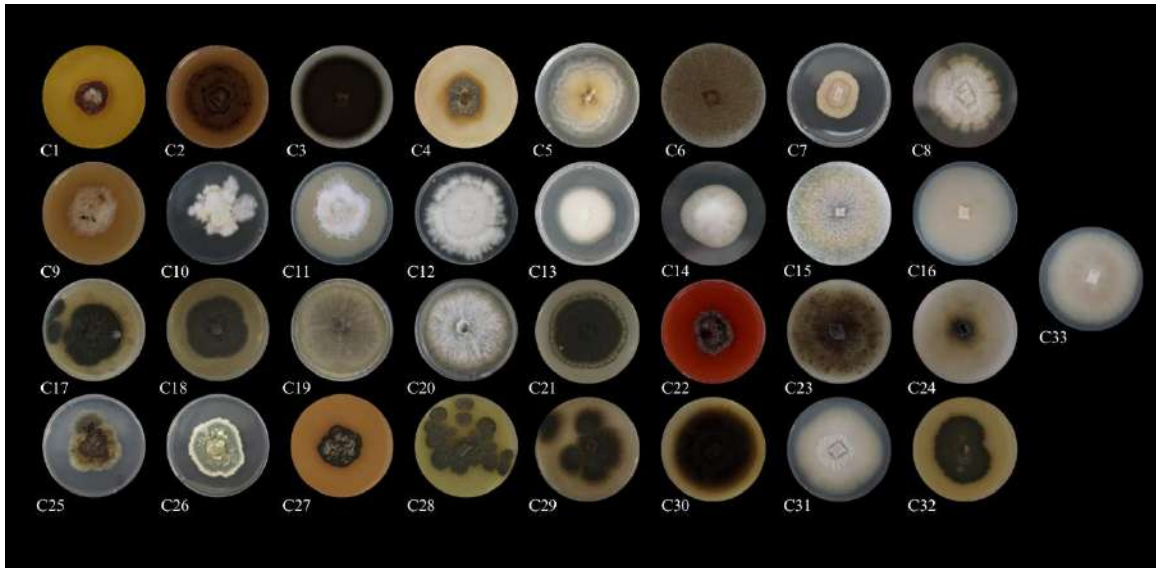


Figura 2. Anverso de cepas de hongos endófitos aislados de tarugos de *A. araucana*.

3.2 Caracterización morfológica microscópica de los hongos endófitos

A nivel microscópico se logró visualizar en 26 morfotipos de esporas asexuales y estructuras vegetativas de los hongos endófitos, principalmente hifas correspondientes a micelios característicos de la división Ascomycota, en ningún aislado se observó estructuras sexuales debido a la condición propia de cultivo *in vitro* de los hongos endófitos. En siete morfotipos no se logró diferenciar estructuras reproductivas debido a la ausencia de esporulación, sólo visualizándose de micelio o hifas (anexo 3).

A partir del dendrograma, los morfotipos se agruparon preliminarmente en 12 clústers por medio del agrupamiento jerárquico (figura 3), los caracteres determinantes de la agrupación fueron el color anverso y reverso de la placa, ya que no todos presentaban esporas asexuales (largo y ancho de conidia).

Clustering de cepas - Distancia Gower

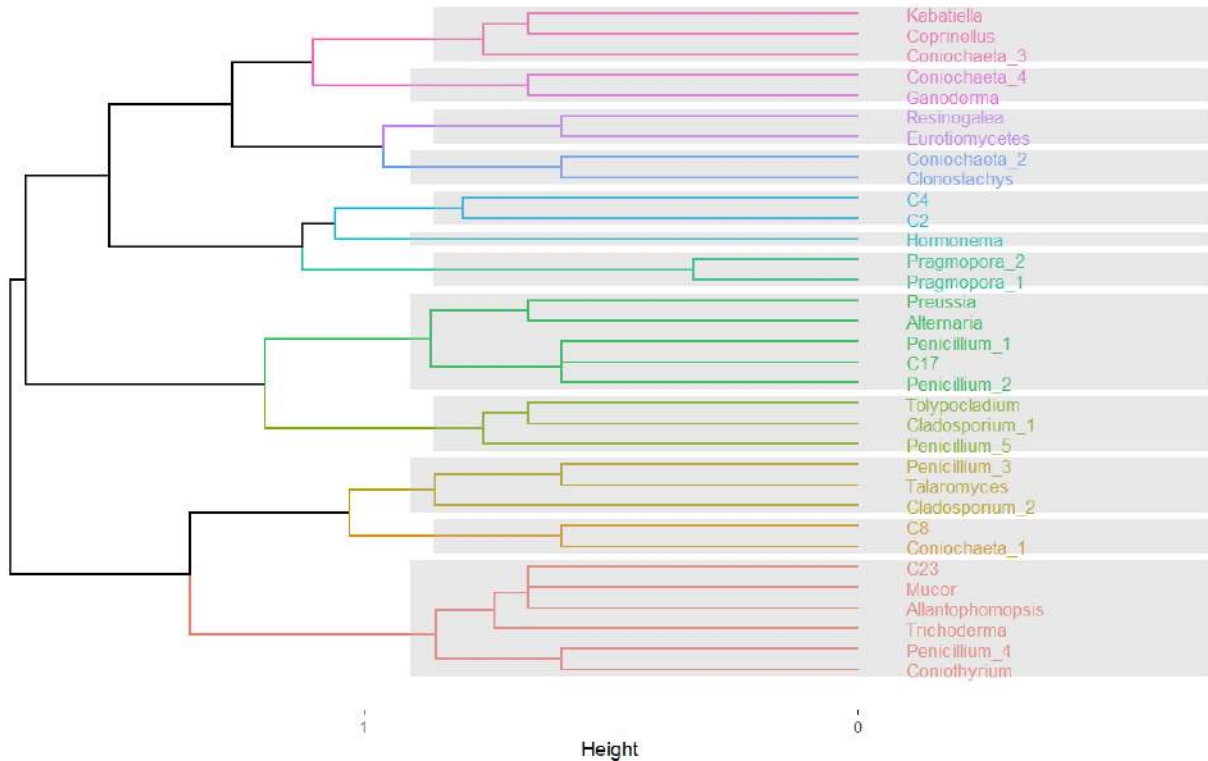


Figura 3. Dendrograma del análisis de agrupamiento jerárquico que delimita 12 morfotipos de hongos endófitos en función de sus principales características morfológicas (color anverso y reverso de la placa, largo de conidias y ancho de conidias).

A partir del análisis de componentes principales (PCA) (figura 4), se obtuvieron dos dimensiones correspondientes a las variables analizadas, la dimensión 1 (92,3%) presentó la mayor parte de la variabilidad (largo de conidia), mientras que la dimensión 2 (7,7%) aportó una parte menor de la variabilidad (ancho de conidia). En cuanto al agrupamiento jerárquico, este determinó un total de ocho clústers, obteniendo tres grupos aislados (4, 6 y 8), mientras que los demás grupos se concentraron más cercanamente a los valores más bajos de la proyección PCA.

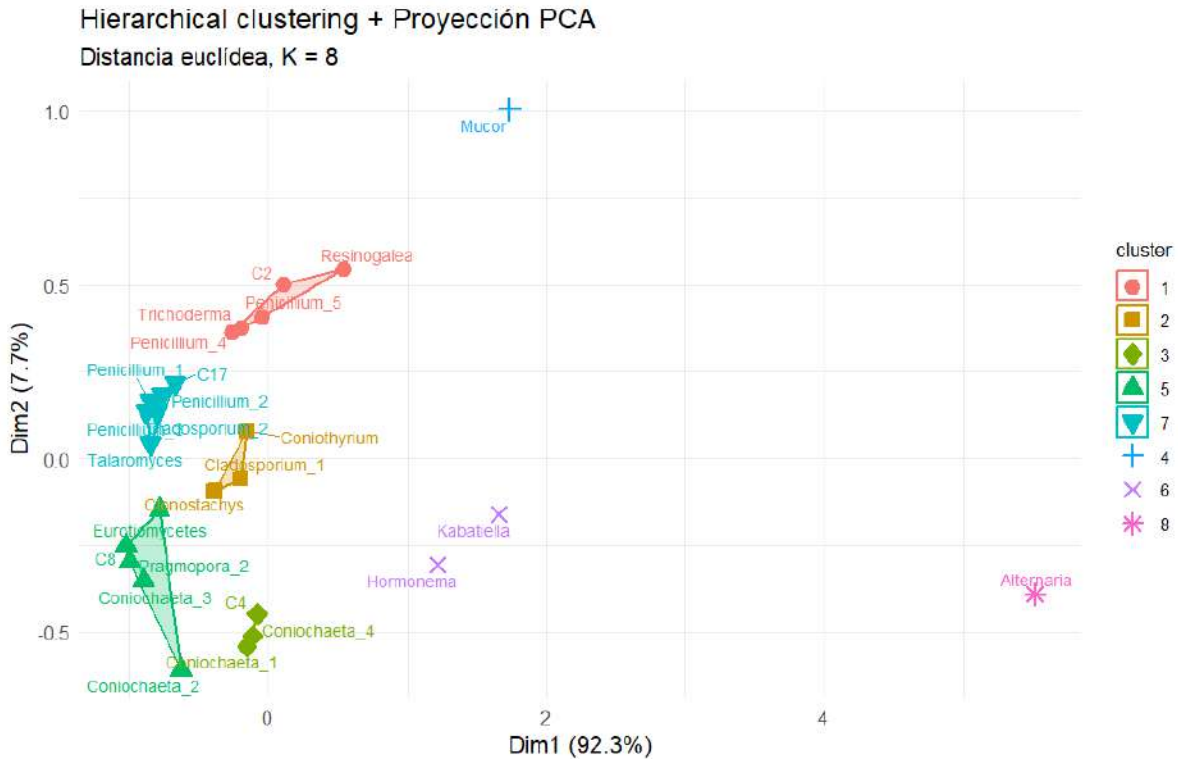


Figura 4. Proyección bidimensional del análisis de componentes principales (PCA) del agrupamiento de morfotipos de hongos endófitos, delimitado según sus características microscópicas.

3.3 Caracterización molecular de los hongos endófitos

De los 33 morfotipos agrupados se logró extraer ADN del micelio de 31 morfotipos, ya que en el proceso de cultivo de dos morfotipos se contaminaron con bacterias (C2 y C4). La cuantificación de concentración de ADN extraído para cada cepa se presenta en el anexo 4.

En cuanto a la amplificación por medio de PCR, se logró amplificar la mayoría de morfotipos con el primer LR0R, obteniendo 26 amplificaciones con banda única. Tres morfotipos fueron amplificados con los primers ITS4 e ITS5 y otros dos morfotipos amplificaron con los primers ITS1 e ITS2. Sólo un morfotipo (C8) presentó multibanda con los primers ITS4 e ITS5, el cual fue descartado para la secuenciación.

Mediante la comparación homóloga de secuencias realizadas en Genbank, NCBI y su herramienta BLAST, se consiguió identificar 28 cepas de hongos endófitos de *A. araucana*, mientras que dos secuencias pertenecientes a los morfotipos C17 y C23 no lograron ser identificadas debido a la mala calidad de la secuencia.

Cuadro 2. Identificación molecular de hongos endófitos de tarugos de *A. araucana*.

Morfotipo	Especie	Query Cover	Per. Ident	Locus	Acceso GenBank
C1	<i>Pragmopora cf. Piceae</i>	100%	99.82%	LSU	MN547971.1
C3	<i>Cladosporium sp.</i>	100%	100%	LSU	MT636935.1
C5	<i>Coprinellus sp.</i>	100%	99.60%	ITS	MT367259.1
C6	<i>Mucor plumbeus</i>	100%	100%	LSU	LT984548.1
C7	<i>Coniochaeta acaciae</i>	100%	99.78%	LSU	PP407617.1
C9	<i>Coniothyrium pyrinum</i>	100%	99.57%	LSU	MH870597.1
C10	<i>Clonostachys rosea</i>	100%	100%	LSU	PQ385860.1
C11	<i>Coniochaeta sp.</i>	99%	100%	LSU	PV190942.1
C12	<i>Ganoderma australe</i>	99%	99.42%	LSU	MT537112.1
C13	<i>Eurotiomycetes sp.</i>	100%	98.91%	LSU	MT863868.1
C14	<i>Tolypocladium sp.</i>	100%	99.74%	LSU	KU183703.1
C15	<i>Trichoderma scalesiae</i>	100%	100%	LSU	NG_069886.1
C16	<i>Kabatiella microsticta</i>	100%	99.87%	LSU	MT107181.1
C18	<i>Penicillium radiatolobatum</i>	100%	100%	LSU	NG_069773.1
C19	<i>Alternaria alstroemeriae</i>	100%	99.52%	LSU	PV397443.1
C20	<i>Preussia sp.</i>	100%	100%	LSU	OR431717.1
C21	<i>Penicillium lanosum</i>	99%	100%	LSU	MH869647.1
C22	<i>Pragmopora cf. piceae</i>	100%	99.77%	LSU	MN547971.1
C24	<i>Allantophomopsis cytisporea</i>	100%	89.63%	ITS	CP103029.1
C25	<i>Hormonema macrosporum</i>	100%	99.87%	LSU	NG_064169.1
C26	<i>Talaromyces atricola</i>	100%	97.27%	LSU	MH866653.1
C27	<i>Cladosporium crousii</i>	100%	97.65%	LSU	NG_070044.1
C28	<i>Penicillium neomiczynskii</i>	100%	98.93%	LSU	NG_069963.1
C29	<i>Penicillium sp.</i>	100%	99.62%	LSU	PV580701.1
C30	<i>Coniochaeta sp.</i>	100%	96.73%	LSU	ON193766.1
C31	<i>Coniochaeta sp.</i>	100%	99.62%	LSU	MZ475062.1
C32	<i>Penicillium expansum</i>	100%	100%	LSU	NG_069649.1
C33	<i>Resinogalea araucana</i>	99%	99.76%	LSU	OP508134.1

Todas las secuencias consultadas presentaron un porcentaje de cobertura entre 99% a 100%, lo que indica que casi todas las secuencias fueron representadas en la coincidencia. El porcentaje de identidad (Per. Ident) representó el porcentaje de nucleótidos que son idénticos entre las secuencias de cada morfotipo con las secuencias de la base de datos dentro de la región alineada. Todas las secuencias se encontraron en un porcentaje alto entre 90% a 100%, lo que indica que las secuencias de las cepas coinciden con las de la base de datos comparada.

La mayoría de las especies pertenecieron a la división Ascomycota con excepción de una especie perteneciente a la división Basidiomycota (*Ganoderma australe*) y una especie de la división Mucoromycota (*Mucor plumbeus*). El morfotipo C13 a excepción de las demás identificaciones fue clasificado como *Euromyces* sp., sin embargo, esta identificación corresponde a una clase de hongos y no a un género o especie. El morfotipo C5 identificado como *Coprinellus* sp. fue descartado para los análisis posteriores debido a la inconsistencia con su tipo de colonización.

3.4 Análisis de diversidad

Para los análisis de diversidad se agruparon los morfotipos en base a los géneros que comprendían, a excepción de la clase Eurotiomycetes, la cual se dejó tal cómo fue identificada a nivel molecular, dado que no se podía asumir que corresponda a un género en específico. En total se obtuvieron 17 géneros: *Allantophomopsis*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Coniochaeta*, *Coniothyrium*, *Ganoderma*, *Hormonema*, *Kabatiella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pragmopora*, *Preussia*, *Resinogalea*, *Talaromyces*, *Tolypocladium* y *Trichoderma*.

En cuanto al cálculo de índices de diversidad y abundancia para la comunidad completa de hongos endófitos (cuadro 3), se obtuvo un índice de Shannon ($H' = 2,38$), el cual reflejó una diversidad relativamente alta, indicando la existencia de múltiples géneros, complementariamente el índice de Simpson de $D = 0,87$, representó una alta diversidad con baja dominancia por parte de algún género, mientras que el índice de Pielou ($J = 0,83$) indicó que los géneros fueron equilibrados en sus abundancias.

Cuadro 3. Índices de diversidad y abundancia a nivel de comunidad de hongos endófitos

Shannon (H')	Simpson (D)	Pielou (J)
2,38	0,87	0,83

Se graficó la abundancia de aislados de hongos endófitos por cada árbol muestreado (figura 5), reflejando que árboles como el 1, 15 y 19 presentaron una mayor abundancia de aislamientos, seguido de

los árboles 17 y 18. La abundancia fue relativamente parecida en el resto de los árboles variando entre los 3 y 5 aislados, mientras que en árboles como el 3, 5 y 14 hubo presencia de un solo aislamiento de hongo endófito.

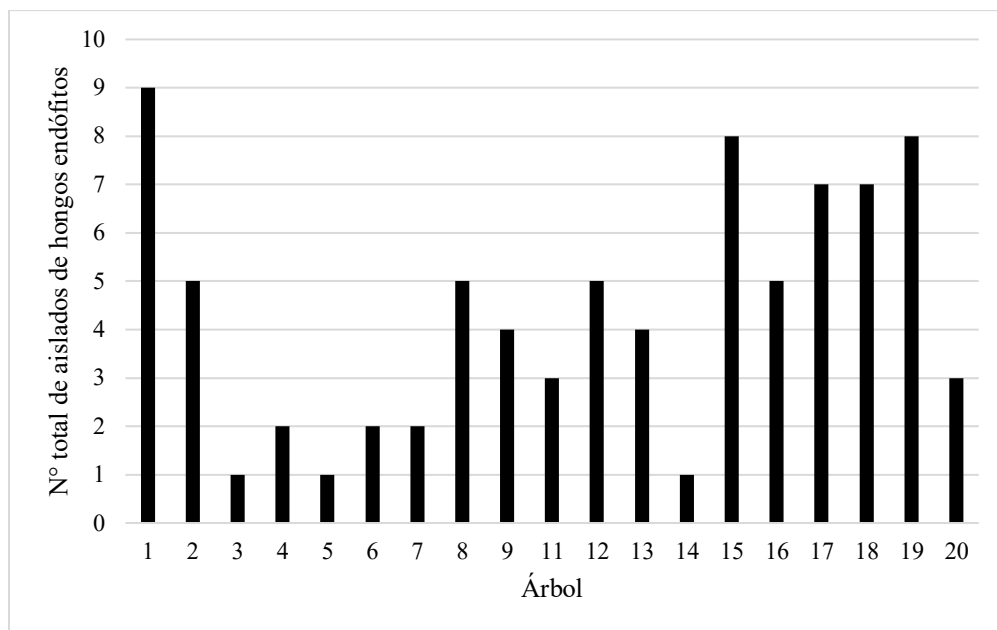


Figura 5. Abundancia de aislamiento de hongos endófitos por árbol de *A. araucana*.

Por otro lado, al calcular el índice de Shannon para cada árbol se pudo observar una diferencia notoria entre la composición de géneros hongos (figura 6). El árbol 17 fue el que presentó una mayor diversidad, teniendo la mayor cantidad de géneros colonizando, seguido de los árboles 15 y 20. La mayoría de los árboles presentaron valores intermedios entre 0,64 y 0,95, lo que indicó la presencia de pocos géneros dominantes, con una distribución desigual en la abundancia relativa de estos mismos. De manera contrastante, árboles como el 3, 5, 14 y 18 presentaron un índice de 0, lo que evidenció una nula diversidad debido a la presencia de un único género. Finalmente, el árbol 10 no fue graficado debido a la no detección de hongos.

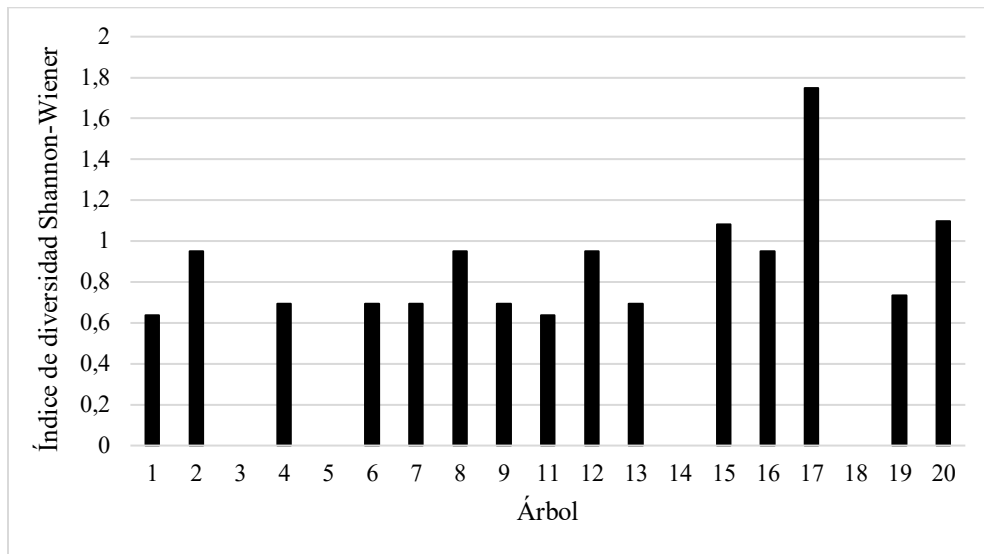


Figura 6. Diversidad de géneros por árbol a través del índice Shannon-Wiener.

Al representar la abundancia de géneros identificados (figura 7), se observaron variaciones notables, se reconoció que *Penicillium* fue el género más representado en la comunidad (n=20), siendo el género más común entre los aislados. Le siguieron *Pragmopora* (n=11), *Coniothyrium* (n=10), *Cladosporium* (n=8) y la clase Eurotiomycetes (n=8), mientras que *Coniochaeta*, *Tolyposcladium*, *Mucor* y *Kabatiella* representaron una abundancia más baja en la comunidad variando entre seis a tres aislamientos. Por último, los géneros de *Allantophomopsis*, *Alternaria*, *Clonostachys*, *Ganoderma*, *Hormonema*, *Preussia*, *Talaromyces*, *Trichoderma* y *Resinogalea* sólo se comprendieron en un aislado.

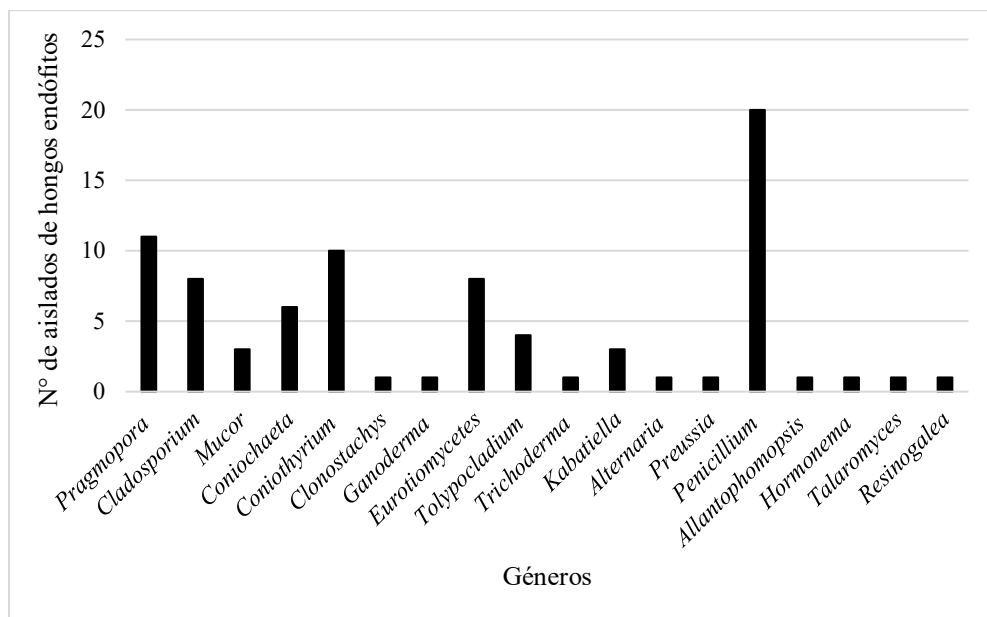


Figura 7. Abundancia de aislados por género de hongos endófitos presentes en *A. araucana*.

Con respecto a la correlación entre el DAP y el índice de diversidad de Shannon para cada árbol (figura 8), se observó una correlación positiva moderada ($R = 0,43$), aunque esta no fue estadísticamente significativa ($p = 0,064$). Se determinó usar el coeficiente de correlación de Spearman debido a que no se obtuvo una distribución normal para los datos de diversidad ($p = 0,0218$) (anexo 5).

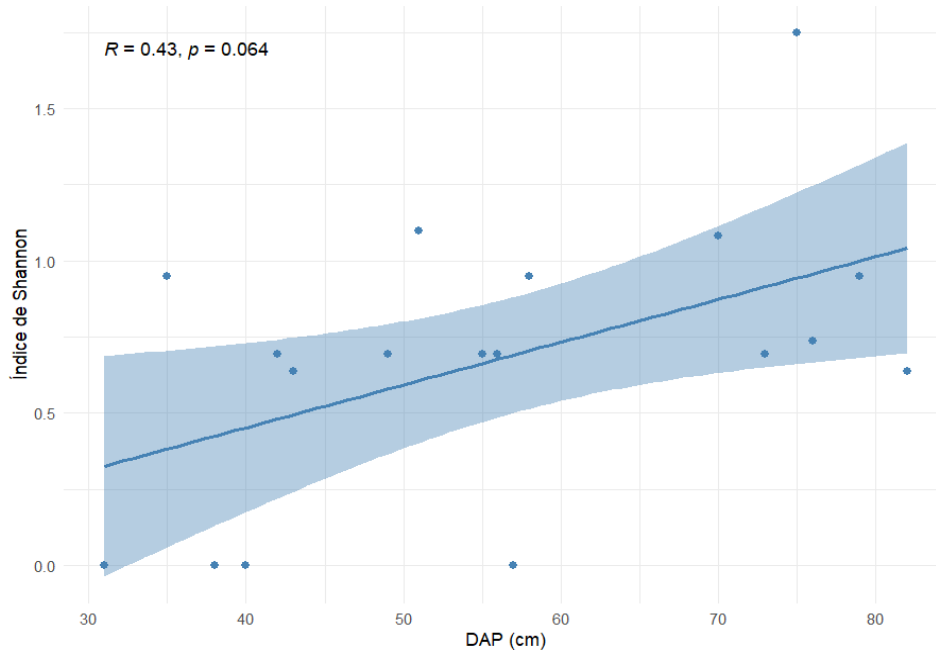


Figura 8. Correlación de Spearman entre DAP y diversidad de hongos presentes en *A. araucaria*.

La curva de rarefacción (basada en $q = 0$) (figura 9), representó la riqueza observada de géneros en función del incremento de número de aislamientos (anexo 6), el punto naranja marcó el total de aislamientos alcanzados dentro del rango muestreado (82 aislamientos), con una riqueza de 18 géneros. Mientras que la extrapolación (línea discontinua) estimó la riqueza esperada al duplicar el número de aislamientos, enseñando que la curva no aumentaría considerablemente.

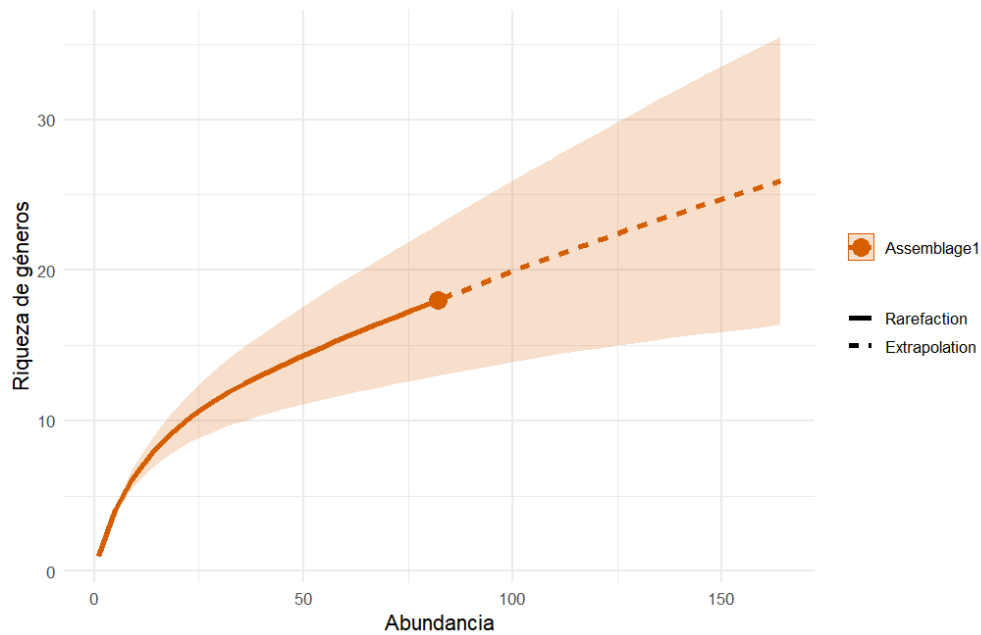


Figura 9. Curva de rarefacción (línea continua) basada en la riqueza de géneros (número de Hill $q = 0$) y su extrapolación (líneas discontinuas).

Con respecto a la diversidad de gremios tróficos del ensamble de hongos (figura 10), se observó que saprófitos/endófitos fueron los más abundantes (43,9%), seguido de endófitos (30,5%), saprófito por el 19,5%, mientras que el 6,1% de la comunidad estuvo compuesta por hongos con un rol patógeno. Cabe destacar que diversos géneros que componen la comunidad fúngica son facultativos, comportándose como endófitos, patógenos o saprófitos según el contexto ecológico (figura 10).

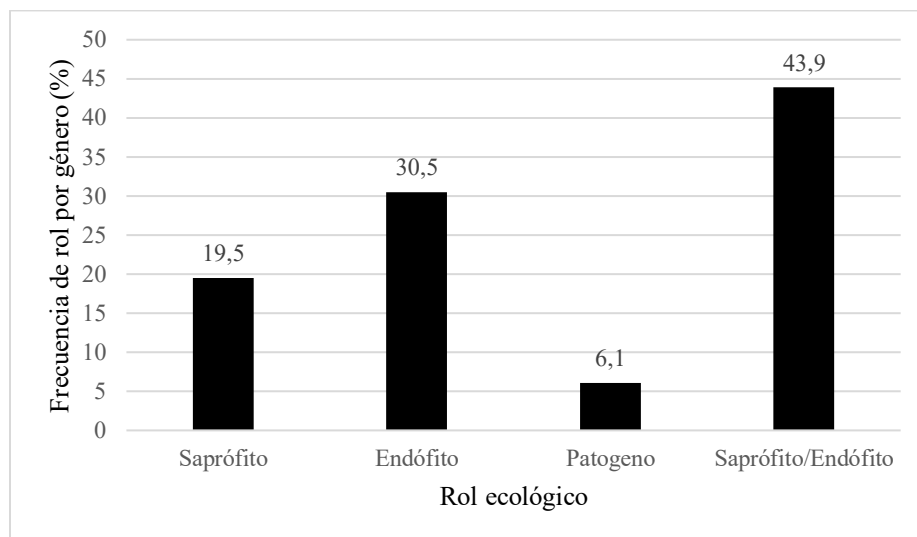


Figura 10. Frecuencia de rol ecológico en porcentaje por géneros identificados en *A. araucana*.

4. DISCUSIÓN

En cuanto a la diversidad de la comunidad fúngica asociada al fuste de *A. araucaria*, se obtuvo una diversidad moderadamente alta y una comunidad equitativamente abundante. Con respecto a los géneros identificados, el morfotipo C5 identificado como *Coprinellus* sp., no fue considerado dentro de los resultados debido a su forma de colonización, las especies del género *Coprinus* son saprofitos de distribución cosmopolita, que suelen crecer en praderas y zonas baldías, en grupos o cerca de tocones de árboles en descomposición (Tešanović *et al.* 2017), por lo que no coincide con la aislación por medio de tejido vivo del tarugo. Es posible que esta inconsistencia se deba a que la región ITS corresponde a sólo un fragmento del marcador, lo que se reafirma al revisar la secuencia y observar que es mucho más corta comparada con el resto de las secuencias utilizadas, esto pudo derivar en una asignación taxonómica poco fiable.

El género más abundante en la comunidad fue *Penicillium*, su alta frecuencia se asocia a su ecología, siendo uno de los hongos más comunes de encontrar en diversos hábitats, se ha descrito en plantas como filosférico, rizosférico y endofítico, así como, en diferentes frutos en descomposición (Yadav *et al.* 2018). En su rol como endófito representa un potencial biotecnológico, como la producción de enzimas, agentes de biocontrol, agentes promotores del crecimiento de las plantas y biorremediación (Yadav *et al.* 2018). En el presente estudio también se identificó la clase Eurotiomycetes (morfotipo C13), esta clase alberga diversos géneros entre ellos *Penicillium*, sin embargo, no se puede afirmar que este morfotipo pertenezca a aquel género, ya que se sabe que comprende un conjunto morfológico y ecológicamente dispar de hongos (Geiser *et al.* 2006).

Otro género presente correspondió a *Talaromyces* el cual está emparentado con *Penicillium*, pero con una abundancia mucho menor en este estudio, ambos pertenecen al orden de los Eurotiales, muchas de las especies de *Talaromyces* eran clasificadas formalmente en el subgénero *Penicillium Biverticillium*, sin embargo, desde el 2011 se clasificaron en *Talaromyces* (Zhai *et al.* 2016). Este género presenta metabolitos secundarios los cuales incluyen principalmente alcaloides, péptidos, policetidos y diversos compuestos estructurales (Zhai *et al.* 2016). Un estudio de Strobel *et al.* (2004) señalan que especies longevas tienen más probabilidades de albergar endófitos con productos naturales activos, como puede ser el caso de *A. araucaria* al ser una especie muy longeva y que presenta aquellos géneros con producción de metabolitos secundarios.

Un hallazgo interesante fue la presencia del género *Resinogalea*, específicamente la especie *Resinogalea araucana*, esta especie fue aislada tan sólo en un árbol del total muestreado. Estudios recientes sobre este género como Balocchi *et al.* (2023), determinaron que *R. araucana* reside en la

subclase Cryptocaliciomycetidae, la cual representa un linaje discreto de hongos calicioideos dentro de Eurotiomycetes, misma clase a la que pertenecen *Penicillium* y *Talaromyces*. Dentro de este estudio se describe que *R. araucana* esporula en la resina que cubre las ramas de *A. araucana* (Balocchi *et al.* 2023), en este caso el hongo fue aislado desde un disco de tarugo de *A. araucana*, por lo que podría haber estado colonizando una zona interna del árbol que presente resina al momento de haber realizado la extracción del tarugo.

Es importante mencionar que, dependiendo de las condiciones, muchos hongos son capaces de generar estrategias de vida multitróficas como biotrofia y saprotrofia, o necrotrofia y saprotrofia, o endofitismo y saprotrofia, ya que estas no son necesariamente "mutuamente excluyentes" (Terhonen *et al.* 2019). Varios de los géneros identificados en este estudio se han reportado con roles endófitos con un potencial como agentes antagonistas contra hongos fitopatógenos como *Coniothyrium*, *Cladosporium*, *Clonostachys* y *Trichoderma*. *Coniothyrium minutans* es un prometedor agente de control biológico fúngico del fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (de Vrije *et al.* 2001), especies de *Cladosporium* como *Cladosporium cladosporioides* y *C. sphaerospermum* resultaron ser patógenos para larvas de *Duponchelia fovealis* (Amatuzzi *et al.* 2017), mientras que *Clonostachys rosea* actúa contra hongos fitopatógenos, como *Alternaria dauci* (Sun *et al.* 2020). *Trichoderma* por su parte, además de generar control biológico contra hongos fitopatógenos, participa en la producción de enzimas celulolíticas (Sun *et al.* 2020).

En cuanto al género *Coniochaeta*, varias de sus especies se presentan como endófitos de huéspedes filogenéticamente diversos, y algunas especies producen metabolitos secundarios antimicrobianos que ayudan en la protección contra especies patógenas de plantas de *Colletotrichum* (Campos-Quiroz *et al.* 2023). Géneros como *Pragmopora*, cuentan con poca información bibliográfica sobre su rol ecológico o relación con coníferas como *A. araucana*, a pesar de eso, se pudo averiguar que ciertos endófitos pertenecientes a Heliales tienen preferencia por coníferas (Terhonen *et al.* 2019), en este caso se condice con que *Pragmopora* pertenece al orden de los Heliales y fue aislado de manera relativamente abundante (n=11) en *A. araucana*.

A modo de comparación, el estudio de Groff *et al.* (2024) también identificó géneros como *Coniochaeta*, *Preussia* y *Trichoderma*, pero en *A. angustifolia*. El género *Preussia* ha sido aislado de madera, suelo, material vegetal muerto y ocasionalmente como endófito (Mapperson *et al.* 2013). Este género presenta metabolitos secundarios, González *et al.* (2017) identificó cuatro supuestos nuevos metabolitos secundarios, sugiriendo un potencial para el descubrimiento de nuevos productos naturales.

Los géneros *Alternaria*, *Ganoderma* y *Kabatiella* tiene roles mayormente patógenos, en *Araucaria cunninghamii* se evaluó la actividad antifúngica de extractos de metanol frente a cepas de

Alternaria alternata, evidenciando que los extractos mostraron actividad contra los hongos patógenos (Sati *et al.* 2013). Al relacionar los géneros endófitos con esta información, la evidencia sugiere que *A. araucana* podría poseer una actividad antimicrobiana debido a metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos que presenta, para confirmar esto se deben realizar estudios que aislen e identifiquen aquellos componentes de la planta. Por otro lado, métodos moleculares basados en el ADN han identificado a *Ganoderma philippi* como el agente causante de la pobredumbre roja de la raíz en *A. mangium* (Mohammed *et al.* 2006). Mientras que *Kabatiella caulivora* es causante de la enfermedad de la quemadura del trébol, es el patógeno foliar más importante del trébol subterráneo (Barbetti 1995). Si bien la presencia de estos géneros no fue abundante en individuos de *A. araucana*, se debe considerar su importancia en su salud, puesto que algunos de estos hongos endófitos pueden encontrarse en latencia y por medio de algún factor externo podrían afectar a la salud de la planta tomando un rol patógeno. Algunos endófitos son potencialmente patógenos, pero la enfermedad sólo se produce en combinación con otros factores desencadenantes, en su mayoría desconocidos (Sieber 2007).

La diversidad de géneros endófitos demuestra una alta capacidad de desarrollarse en una amplia variedad de hospedantes, esta diversidad se puede deber a condiciones o variables específicas del hospedante, en este caso se quiso relacionar el DAP de los árboles muestreados con la diversidad de géneros, sin embargo, esta correlación no fue positivamente alta, se observó una tendencia a que los árboles con mayor DAP presenten una mayor diversidad de hongos endófitos, sin embargo, esta no fue una relación significativa, la correlación no implica causalidad, por lo que no se puede asegurar que el DAP tenga una influencia en la diversidad de la comunidad de hongos para el área de muestreo. La diversidad de hongos endófitos esta influenciada por la fisiología del hospedador, factores ambientales e interacciones con otros organismos (Groff *et al.* 2024), en este contexto, se plantea la posibilidad de que la longevidad de *A. araucaria* tenga influencia con el establecimiento de comunidades fúngicas diversas, al ofrecer un hábitat estable en el tiempo. Estudios revelan que la composición de especies y la abundancia relativa de hongos endófitos en las hojas de plantas de hoja ancha pueden variar ampliamente entre las etapas de desarrollo de los diversos hospedantes (Helander *et al.* 2006).

También se sabe que una tendencia consistente, confirmada repetidamente para los endófitos foliares y del tallo, es que la frecuencia general de infección aumenta con la edad de los órganos o tejidos hospedantes (Stone *et al.* 2004). A su vez, también se puede considerar la vegetación circundante asociada a *A. araucana* como un factor que influya en la diversidad de hongos endófitos, los hongos endófitos no solo pueden asociarse a un único hospedador, por ejemplo, hongos endófitos del orden Xylariales tienen amplios rangos de hospedantes que abarcan múltiples linajes de plantas terrestres (Franco *et al.* 2022). Por

lo que la longevidad de *A. araucana* sugiere más tiempo para acumular comunidades fúngicas diversas, que a la vez pueden ser influenciadas por otras especies que coexisten con *A. araucana* en el área de muestreo.

En total se identificaron una clase y 15 géneros pertenecientes a la división Ascomycota, correspondiente al 88,9% de la comunidad fúngica, un género perteneciente a la división Basidiomycota (5,6%) y un género perteneciente a la división Mucoromycota (5,6%). Otros estudios con relación a la diversidad y abundancia de hongos endófitos han tenido resultados similares, Song *et al.* (2002), evaluó la diversidad de hongos endófitos aislados de *Eunymus japonicus*, en donde el 99,4% de aislados correspondieron a la división Ascomycota. De igual manera, da Silva *et al.* (2021) estudiaron la diversidad de hongos filamentosos saprotróficos en *A. angustifolia*, si bien su relación ecológica tiene que ver más con descomposición de sustratos, la comunidad fúngica asociada a *A. angustifolia* también estuvo representada principalmente por la división Ascomycota. Estudios en otras regiones del mundo con ecosistemas totalmente distintos también albergan hongos endófitos con resultados comparables con los de este estudio, el estudio de Jain *et al.* (2021) se investigó la diversa microbiota endófito cultivable asociada con *Arnebia euchroma*, especie vegetal del desierto frío del Himalaya, donde Ascomycota fue la división más abundante (72,73%), dominado por la clase Eurotiales (42,42%) y el género *Penicillium* entre los endófitos fúngicos aislados. Todos estos antecedentes demuestran que los hongos endófitos pueden colonizar en diversos ecosistemas y en una amplia variedad de hospedantes, el hecho de que géneros como *Penicillium* sean aislados de múltiples hospedantes en distintos tipos de vegetación sugiere una colonización más generalista. Géneros con menos abundancia pueden sugerir un tipo de colonización más especializada, por lo que en este contexto es importante seguir estudiando géneros menos frecuentes en *A. araucana* como *Allantophomopsis*, *Hormonema* o *Resinogalea*, que además cuentan con poca bibliografía que sugieran el tipo de asociación con esta conífera.

En cuanto al análisis de rarefacción, este proyectó una curva que aumentaba al inicio, lo primeros aislados aportaron muchos géneros nuevos, para luego estabilizarse en el 80, a los 82 aislamientos se pudieron apreciar 17 géneros más la clase Eurotiomycetes. La extrapolación sugiere que aun duplicando el número de aislamientos la riqueza de géneros esperada no aumentaría significativamente. Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que un muestreo más intensivo aumenta la recuperación de especies raras, que probablemente también se encuentren en muchos hospedantes (Stone *et al.* 2004), esto no asegura que la diversidad aumente notablemente ya que un mayor número de aislamientos no necesariamente indica mayor riqueza. Este patrón es coherente ya que incluso con grandes números de aislamiento no necesariamente la riqueza de géneros alcanza un punto de saturación, tal como en el

estudio de Arnold y Lutzoni (2007), donde a pesar de generar curvas de acumulación con 1403 cepas de hongos endófitos, indicaron un muestreo estadísticamente incompleto. En el presente estudio el esfuerzo de muestreo para los 20 árboles demuestra que se consiguió capturar la mayoría de los géneros presentes, sin embargo, el muestreo sólo se basa en una pequeña muestra de una zona de bosque de *A. araucana* mucho más amplia del sector Puesco en el Parque Nacional Villarrica.

Es importante mencionar que se presentaron diversas limitaciones en cuanto a la realización de algunos análisis, con respecto la caracterización morfológica, tanto a nivel macroscópico como microscópico, en este estudio se demuestra que estas técnicas no fueron determinantes por sí solas para lograr identificar los géneros a los que correspondían los morfotipos, si bien se podía inferir posibles géneros, las variables cualitativas resultaban muy ambiguas. Esto se evidenció a través del dendrograma, ya que el agrupamiento jerárquico sólo contempló variables de largo y ancho de conidias, los agrupamientos no fueron exactos ya que representaban muchos morfotipos con tamaños similares, pero que al ser visualizados microscópicamente la mayoría eran distintos entre sí, para una mayor exactitud se debería haber contemplado mediciones de otras estructuras como fiálides.

Esto también se vio mediante el análisis PCA, ya que, al no haber logrado medir conidias en todos los morfotipos, la base de datos quedó incompleta agrupando principalmente a los morfotipos por el carácter color. La variación más importante fue el largo de conidia, el ancho no fue determinante de los clústeres ya que todas las conidias tenían medidas similares, por lo que de igual manera se necesitan más variables de estructuras asexuales para una mayor exactitud. Estos métodos deben complementarse con el análisis de secuencias de ADN, ya que la evidencia molecular aporta una mayor precisión y permite confirmar o corregir las identificaciones obtenidas mediante métodos clásicos (Hernández *et al.* 2024). El análisis molecular por su parte también presentó ciertas limitaciones, si bien resultó ser el método de identificación más exacto para la mayoría de morfotipos, algunos presentaron multibandas o una nula amplificación. En este contexto, lo ideal siempre es utilizar distintos marcadores moleculares con mayor variabilidad para abarcar con mayor exactitud los géneros, sin embargo, debido a las limitantes de tiempo el análisis no pudo ser más exhaustivo.

5. CONCLUSIONES

Por medio de la identificación morfológica y molecular de cepas de hongos endófitos extraídos de tarugos de *A. araucana*, se lograron identificar 17 géneros y una clase de hongos endófitos, reconociendo por primera vez su diversidad para el Sector Puesco. Por medio de los índices de diversidad designados para la comunidad fúngica descrita del sitio de estudio, se reconoció una alta

diversidad y abundancia de hongos endófitos asociados al fuste de *A. araucana* para el sector Puesco del Parque Nacional Villarrica.

La diversidad de la comunidad fúngica comprendió hongos mayoritariamente con roles endófitos, pero también una minoría presentó roles patógenos, los cuales dependiendo de las condiciones en las que se encuentre el hospedante pueden llegar a ser de importancia de manejo y control, se destaca la presencia de especies poco conocidas como *Resinogalea araucana* y *Pragmopora* sp., las cuales requieren de un mayor estudio para comprender su relación ecológica con *A. araucana*, mientras que géneros identificados como *Coniochaeta*, *Coniothyrium*, *Cladosporium*, *Clonostachys* y *Trichoderma* presentan un rol endófito interesante para el estudio de sus potenciales usos como biocontroladores.

Los bosques de *A. araucana* han permanecido poco estudiados en términos de biodiversidad microbiana, existe una amplia gama de interacciones complejas que aún no se comprenden del todo entre los hongos endófitos y sus hospedantes. El presente estudio permitió identificar la diversidad que existe en el área muestreada dentro del Parque Nacional Villarrica y caracterizar los principales roles ecológicos que comprenden sus principales géneros, finalmente, con la información abarcada se plantean nuevas proyecciones que vinculen la diversidad de hongos endófitos presentes en *A. araucana* con un potencial uso beneficioso y que genere nuevas puertas para mejoras en su salud fitosanitaria.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amatuzzi RF, N Cardoso, AS Poltronieri, CG Poitevin, P Dalzoto, MA Zawadeneak, IC Pimentel. 2017. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian Journal of Biology* 78(03):429-435. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.166681>.
- Arnold A. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology* (21):51–66.
- Arnold AE, F Lutzoni. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecología* 88(3):541-549.
- Balocchi F, I Barnes, MJ Wingfield, R Ahumada, CM Visagie. 2023. New Resinogalea species from *Araucaria araucana* resin in Chile and reclassification of the genus in the *Cryptocaliciomycetidae*. *IMA fungus* 14(1):16. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43008-023-00122-9>
- Barbetti MJ. 1995. Breakdown in Resistance of Subterrean Clovers to Clover Scorch Disease (*Kabatiella caulivora*). *Revista Australiana de Investigación Agrícola* 46(3):645-653.
- Barnett HL, BB Hunter. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Cuarta edición.
- Campos-Quiroz C, JF Castro, C Santelices, J Carrasco-Fernández, M Guerra, D Cares-Gatica, J Ortiz-Campos, Y Ocares, L Barra-Bucarei, B Theelen. 2023. Description of Two Fungal Endophytes Isolated from *Fragaria chiloensis* subsp. *chiloensis* f. *patagonica*: *Coniochaeta fragariicola* sp. nov. and a New Record of *Coniochaeta hansenii*. *Taxonomy* 3(2):183-203. DOI: <https://doi.org/10.3390/taxonomy3020014>.
- Carroll G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69:2-9.
- Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, Sander EL, Ma KH, Colwell RK, Ellison AM. 2014. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological Monographs* 84:45–67. DOI: 10.1890/13-0133.1.
- Clay K, C Schardl. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The american naturalist* 160(4):99-127.
- CONAF (Corporación Nacional Forestal, CL). 2006. Plan de Manejo Parque Nacional Conguillío. Documento de Trabajo N° 405.
- CONAF (Corporación Nacional Forestal, CL). 2013. Plan de manejo: Parque Nacional Villarrica (2.ª ed.). Departamento de Áreas Silvestres Protegidas.
- CONAF (Corporación Nacional Forestal, CL) (s/f). *Proyecto Araucaria*. CONAF. <https://www.conaf.cl/manejo-de-ecosistemas/gestion-forestal-suelos-y-agua/sanidad->

- Da Silva S, L Costa, L Gusmão. 2021. Diversity of saprotrophic filamentous fungi on *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Brazilian pine). *Brazilian Journal of Microbiology* 52(3):1489-1501. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-021-0053>.
- De Vrije T, N Antoine, R Buitelaar, S Bruckner, S Dissevelt, A Durand, S Gerlagh, E Jones, P Luth, W Ravensberg, R Renaud, A Rinzema, F Weber, J Whipps. 2001. The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: production by solid-state fermentation, application and marketing. *Applied Microbiology Biotechnology* 56:58–68. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002530100678>.
- Díaz-Vaz J. 1984. *Araucaria araucana*. Descripción anatómica. *Bosque* 5(2):117-118.
- Drake A, F Herrera, M Angel, E Acuña. 2005. Propuesta de manejo sustentable de *Araucaria araucana* (Mol. C. Koch). *Bosque* 26(1):23-32.
- Flores A. 2017. Antagonismo in vitro de hongos endófitos para su uso en el biocontrol de enfermedades forestales. *Revista Científica Estelí* 23:58-71.
- Franco ME, JH Wisecaver, AE Arnold, YM Ju, JC Slot, S Ahrendt, ..., JM U'Ren. 2022. Ecological generalism drives hyperdiversity of secondary metabolite gene clusters in xylarian endophytes. *New Phytologist* 233(3):1317-1330. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.17873>.
- García N, C Ormazabal. 2008. *Árboles nativos de Chile*. Fundación Huinay. ENERSIS.
- Geiser D, C Gueidan, J Miadlikowska, F Lutzoni, F Kauff, V Hofstetter, E Fraker, CL Schoch, L Tibell, WA Untereiner, A Aptroot. 2006. Eurotiomycetes: Eurotiomycetidae and Chaetothyriomycetidae. *Mycologia* 98(6):1053–1064. DOI: <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832633>.
- González M, M Cortés, F Izquierdo, L Gallo, C Echeverría, S Bekkesy, P Montaldo. 2013. *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch.; Araucaria (o), Pehuén, Piñonero, Pino Araucaria, Pino chileno, Pino del Neuquén, Monkey puzzle tree. En: Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina: Autoecología. María Cuneo Ediciones: Valdivia, Chile.
- González M. 2014. La educación e interpretación ambiental en las áreas silvestres protegidas del estado: La experiencia del Parque Nacional Conguillío (Región de La Araucanía) para fomentar la conservación en los visitantes. Universidad Católica de Temuco.
- González-Menendez V, J Martin, JA Siles, M González-Tejero, F Reyes, G Platas, J Tormo, O Genilloud. 2017. Biodiversity and chemotaxonomy of *Preussia* isolates from the Iberian Peninsula. *Mycol Progress* 16:713–728. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11557-017-1305-1>.
- Goth S, M Fontana, C Luna. 2014. Araucariácea nativa de Argentina: estado de conservación y características del recurso forestal *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch. *BioScriba* 7(1):11-18.

DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202420230251>.

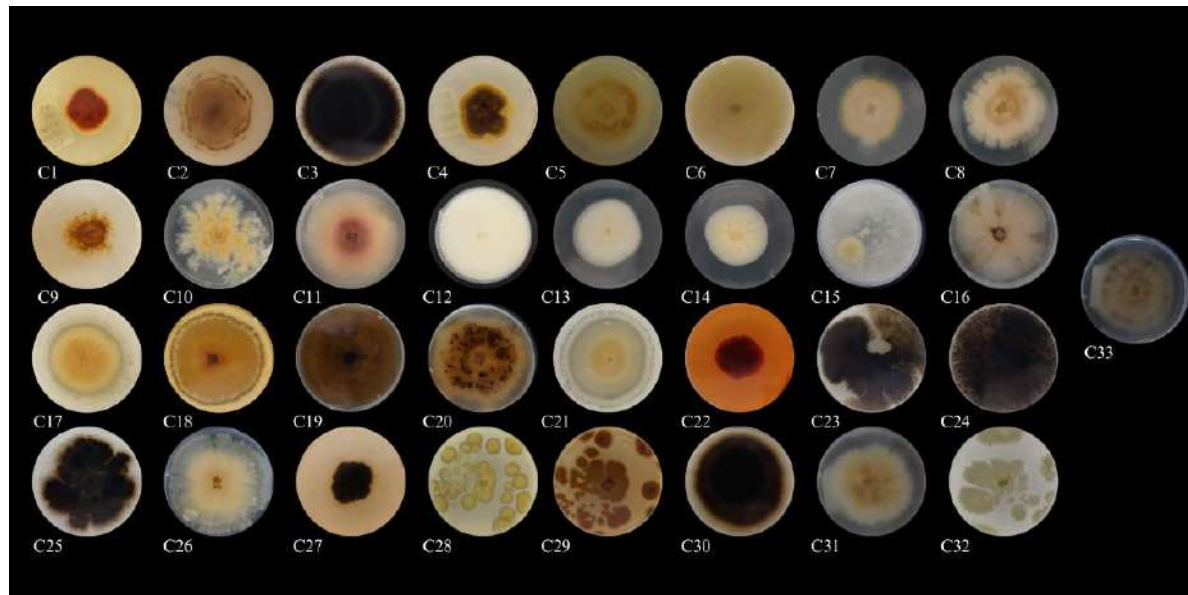
- Groff D, B Marmentini, J Gaglioti, AL Silva, A Knob. 2024. Endophytic fungi associated with *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 96. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202420230251>.
- Helander M, P Wäli, T Kuuluvainen, K Saikkonen. 2006. Birch leaf endophytes in managed and natural boreal forests. *Canadian Journal of Forest Research* 36(12):3239-3245. DOI: <https://doi.org/10.1139/x06-176>.
- Hernández M, C Pérez, L Martínez, S Carreño, R Ojeda. 2024. Técnicas Convencionales y Moleculares en la Identificación de Hongos Microscópicos de Importancia Médica. Revisión Sistemática. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar* 8(6):6759-6775. DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i6.15362.
- Ipinza R. 2019. Migración asistida para la conservación ex situ de *Araucaria araucana*. *Mundo Forestal* 35:30-33.
- Jain R, P Bhardwaj, S Pandey, S Kumar. 2021. *Arnebia euchroma*, a plant species of cold desert in the Himalayas, harbors beneficial cultivable endophytes in roots and leaves. *Frontiers in Microbiology* 12. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.696667>.
- Lillo A, H Ramírez, F Reyes, N Ojeda, M Alvear. 2011. Actividad biológica del suelo de bosque templado en un transecto altitudinal, Parque Nacional Conguillío (38° S), Chile. *Bosque* 32(1):46-56.
- López-Jácome L, M Hernández-Durán, C Colín-Castro, S Ortega-Peña, G Cerón-González, R Franco-Cendejas. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad* 3(1):10-18.
- Luebert F, P Pliscoff. 2018. Sinopsis bioclimática y vegetacional de Chile. Segunda edición. Santiago, Chile. Editorial Universitaria.
- Magurran A. 2004. Measuring Biological Diversity. *Blackwell Science Ltd*
- Mapperson R, M Kotiw, RA Davis, J Dearnaley. 2014. The Diversity and Antimicrobial Activity of *Preussia* sp. Endophytes Isolated from Australian Dry Rainforest. *Current Microbiology* 68:30–37. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0415-5>.
- Mier T, C Toriello, M Ulloa. 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos (en línea). s.l., UAM, Unidad Xochimilco, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Disponible en <https://books.google.fr/books?id=UD30RosdJSEC>.
- MMA (Ministerio de Medio Ambiente, CL), 2020. Clasificación de especies según estado de conservación.
- Mohammed CL, KM Barry, RS Irianto. 2006. Heart rot and root rot in *Acacia mangium*: identification

- and assessment. *Las actas del ACIAR* 124:26.
- Munsell Color. 2009. Geological rock-color chart: with genuine Munsell color chips.
- Pérez D, L Abraham, L Lagos, J Pérez, P Meli. 2021. Educación ambiental, conservación y restauración ecológica: debates en el bosque xerófito de *Araucaria araucana* (Molina) K.Koch, Neuquén, Argentina. *Multequina* 30(2):73-86.
- Petrini O. 1991. Fungal Endophytes of Tree Leaves. *Microbial ecology of leaves* 179-197.
- Rodríguez R, JF White, AE Arnold, RS Redman. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182(2):314-330. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>.
- Roig F, M Hadad, C Moreno, RJ Gandullo, S Piraino, E Martinez, M Gonzalez, J Arco, M Bendini, JA Boninsegna, I Peralta, E Barrio, R Bottero, DP Domínguez, E Juaneda, T Trevizor, A Duplancic. 2013. Hiatos de regeneración del bosque de *Araucaria araucana* en Patagonia: vinculaciones al uso de tierras y desertificación regional. *Zonas Áridas* 15(2):326–348.
- Rosa L. 2021. Neotropical Endophytic Fungi. Springer International Publishing.
- Sánchez R, B Sánchez, Y Sandoval, A Ulloa, B Armendáriz, M García, M Macías. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP* 16(2):132-146.
- Saikkonen K. 2007. Forest structure and fungal endophytes. *Fungal biology reviews* 21(2-3):67-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.001>.
- Saikkonen K, S Faeth, M Helander, T Sullivan. 1998. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual review of Ecology and Systematics* 29(1):319-343 DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.319>
- Sanguinetti J. 2014. Producción de semillas de *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch durante 15 años en diferentes poblaciones del Parque Nacional Lanín (Neuquén-Argentina). *Ecología austral* 24(3):265-275.
- Sati SC, S Joshi. 2013. Antifungal potential of *Araucaria cunninghamii* sweet (Araucariaceae) plant extracts. *Int. J. Pharmacol. Toxicol. Sci* 3(1):15-21.
- Sieber T. 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology* 21:75-89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.004>.
- Solís A, D Mejía, M Martínez, M Vargas, L Martínez. 2023. Hongos endófitos en la agricultura: caso café. *Acta Agrícola y Pecuaria* 9(1).
- Song X, Y Li, Z Cao, D Wang. 2022. Diversity assessment of endophytic fungi isolated from *Euonymus japonicus*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 129(2):261-269. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00588-6>.

- Stone J, J Polishook, J White. 2004. Endophytic Fungi. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods* 241-270.
- Strobel G, B Daisy, U Castillo, J Harper. 2004. Natural products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products* 67(2):257-268. DOI: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np030397v>.
- Sun Z, S Li, S D., Ren, Q., Xu, J. L., Lu, X., & Sun, M. H. 2020. Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *Journal of applied microbiology* 129(3):486-495.
- Tešanović K, B Pejin, F Šibul, M Matavulj, M Rašeta, L Janjušević, M Karaman. 2017. A comparative overview of antioxidative properties and phenolic profiles of different fungal origins: fruiting bodies and submerged cultures of *Coprinus comatus* and *Coprinellus truncorum*. *J Food Sci Technol* 54:430–438. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2479-2>.
- Terhonen E, K Blumenstein, A Kovalchuk, FO Asiegbu. 2019. Forest Tree Microbiomes and Associated Fungal Endophytes: Functional Roles and Impact on Forest Health. *Forests* 10(1):42. DOI: <https://doi.org/10.3390/f10010042>.
- Wagner N. 2013. Caracterización de la estructura de los bosques en los sitios de nidificación del carpintero negro (*Campephilus magellanicus*) en el Parque Nacional Villarrica, Chile. Tesis Ingeniero en Conservación de Recursos Naturales. Valdivia, Chile. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Austral de Chile. 54 p.
- White T, T Bruns, S Lee, J Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics.
- Williams D, M Wilson, M Lewis, J Potts. 1995. Identification of *Candida* Species by PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Intergenic Spacer Regions of Ribosomal DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 33(9):2476–2479.
- Yadav AN, P Verma, V Kumar, P Sangwan, S Mishra, N Panjiar, VK Gupta, AK Saxena. 2018. Biodiversity of the Genus *Penicillium* in Different Habitats. *Nuevos y futuros desarrollos en biotecnología y bioingeniería microbiana* 3-18.
- Zhai MM, J Li, CX Jiang, YP Shi, DL Di, P Crews, QX Wu. 2016. The Bioactive Secondary Metabolites from *Talaromyces* species. *Natural Products and Bioprospecting* 6:1-24. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13659-015-0081-3>.

ANEXOS

Anexo 1. Reverso de cepas de hongos endófitos aislados de tarugos de *A. araucana*.




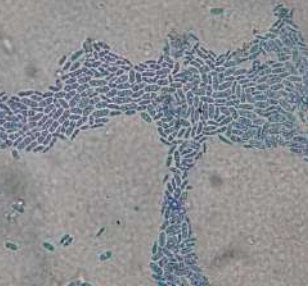




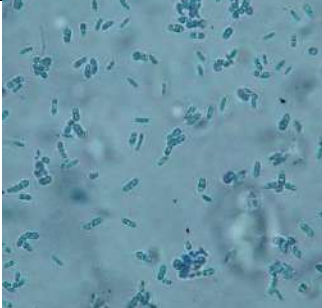

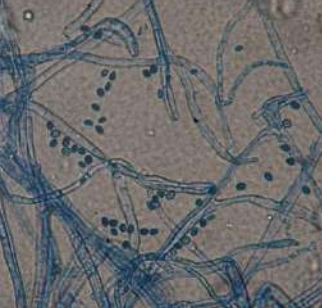

Anexo 2. Caracterización morfológica macroscópica para morfotipos aislados de tarugos de *A. araucana*.


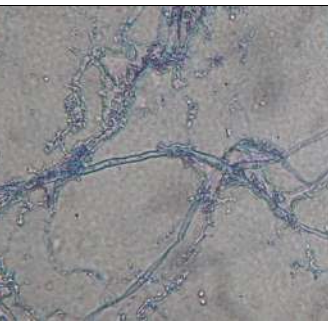



Morfotipo	Color anverso	Color reverso	Aspecto	Superficie	Consistencia
C1	Café con tonos crema	Rojo oscuro con tonos amarillos	Rugoso	Plana	Dura
C2	Café claro con tonos oscuros	Café claro con tonos crema	Zonado	Plana	Blanda
C3	Café grisáceo oscuro	Negro	Aterciopelado	Plana	Blanda
C4	Café claro	Amarillo con tonos grisáceos	Rugoso	Plana	Dura
C5	Café amarillento claro	Amarillo	Liso	Plana	Blanda
C6	Café	Gris	Pulverulento	Plana	Blanda
C7	Amarillo claro	Amarillo	Rugoso	Plana	Dura

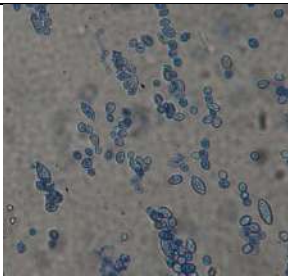
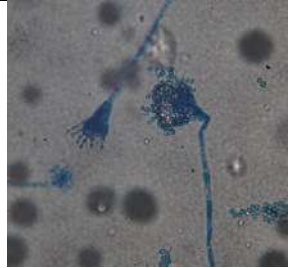




C8	Amarillo claro	Amarillo	Pulverulento	Plana	Dura
C9	Amarillo con tonos crema	Café amarillento	Pulverulento	Convexa	Blanda
C10	Blanco	Amarillo	Algodonoso	Plana	Blanda
C11	Blanco	Rosado con tonos crema	Algodonoso	Convexa	Blanda
C12	Blanco	Amarillo con tonos crema	Algodonoso	Plana	Blanda
C13	Blanco	Blanco	Aterciopelado	Plana	Blanda
C14	Blanco	Crema	Aterciopelado	Plana	Blanda
C15	Blanco con tonos verdes	Blanco	Pulverulento	Plana	Blanda
C16	Crema	Crema	Liso	Plana	Blanda
C17	Gris	Amarillo	Aterciopelado	Plana	Blanda
C18	Gris	Anaranjado	Aterciopelado	Plana	Blanda
C19	Gris	Café grisáceo oscuro	Pulverulento	Plana	Blanda
C20	Gris	Café oscuro con tonos amarillos	Pulverulento	Plana	Blanda
C21	Gris	Gris con tonos amarillos	Aterciopelado	Plana	Blanda
C22	Gris claro con tonos grises oscuros	Rojo oscuro	Rugoso	Plana	Dura
C23	Gris con tonos verdes	Gris con tonos negros	Pulverulento	Plana	Blanda
C24	Gris oscuro	Negro	Pulverulento	Plana	Blanda
C25	Verde	Gris	Mucilaginoso	Plana	Blanda
C26	Verde grisáceo	Amarillo	Aterciopelado	Plana	Blanda
C27	Verde grisáceo	Gris con tonos crema	Cerebriforme	Umbonada	Dura
C28	Verde grisáceo	Amarillo	Pulverulento	Plana	Blanda
C29	Verde grisáceo	Café amarillento	Pulverulento	Plana	Blanda
C30	Verde oscuro	Verde oscuro	Liso	Plana	Blanda
C31	Gris claro	Amarillo con tonos crema	Liso	Plana	Blanda
C32	Gris con tonos verdes	Amarillo con tonos grisáceos	Aterciopelado	Plana	Blanda
C33	Blanco	Blanco	Liso	Plana	Blanda

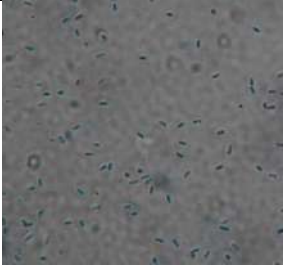


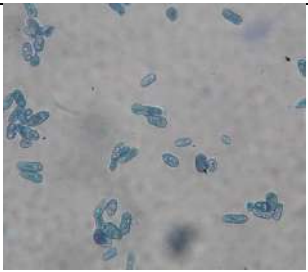

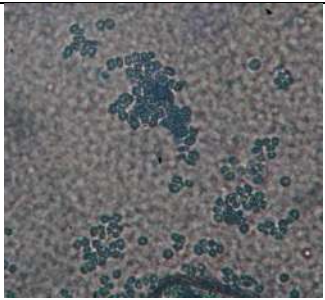
Anexo 3. Caracterización morfológica microscópica para morfotipos aislados de tarugos de *A. araucana*.


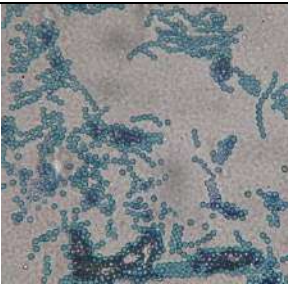
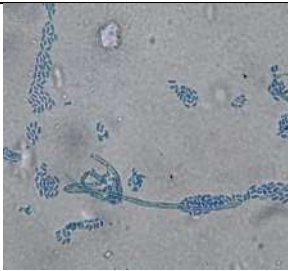

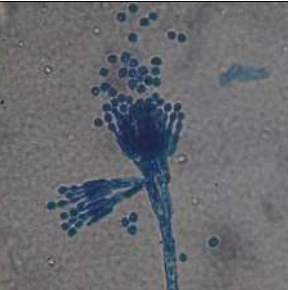
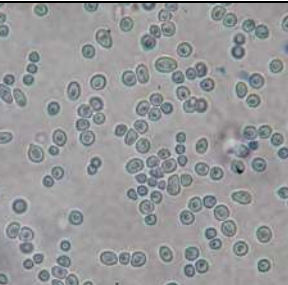
Morfotipo	Microscopía (40x)	Descripción
C1		<p>Hifa con ramificaciones.</p>
C2		<p>Conidios globosos en grandes agrupaciones, sin presencia de fialides.</p> <p>Largo promedio: 4,0 μm</p> <p>Ancho promedio: 3,9 μm</p>
C3		<p>Conidios oscuros con formas ovaladas o en forma de limón, en cadenas simples y ramificadas.</p> <p>Largo promedio: 4,7 μm</p> <p>Ancho promedio: 2,7 μm</p>
C4		<p>Conidios ovoides sin presencia de fialides.</p> <p>Largo promedio: 6,2 μm</p> <p>Ancho promedio: 2,3 μm</p>
C5		<p>Hifa con ramificaciones.</p>

C6		<p>Esporangios globosos, esporangiosporas ovoides y esféricas.</p> <p>Largo promedio: 7,3 μm</p> <p>Ancho promedio: 7,0 μm</p>
C7		<p>Conidios ovoides sin presencia de fialides.</p> <p>Largo promedio: 6,3 μm</p> <p>Ancho promedio: 2,1 μm</p>
C8		<p>Conidios ovoides sin presencia de fialides.</p> <p>Largo promedio: 2,8 μm</p> <p>Ancho promedio: 1,2 μm</p>
C9		<p>Conidios ovoides hialinos.</p> <p>Largo promedio: 4,4 μm</p> <p>Ancho promedio: 2,9 μm</p>
C10		<p>Conidios hialinos ovoides y elipsoidales.</p> <p>Largo promedio: 4,2 μm</p> <p>Ancho promedio: 2,3 μm</p>

C11		<p>Conidios ovoides sin presencia de fialides.</p> <p>Largo promedio: 5,1 μm</p> <p>Ancho promedio: 1,3 μm</p>
C12		<p>Hifas septadas con tabiques transversales.</p>
C13		<p>Conidios globosos u ovoides en cadenas.</p> <p>Largo promedio: 3,2 μm</p> <p>Ancho promedio: 1,7 μm</p>
C14		<p>Hifas septadas y delgadas.</p>
C15		<p>Conidióforos hialinos muy ramificados, conidios ovoides.</p> <p>Largo promedio: 3,4 μm</p> <p>Ancho promedio: 3,3 μm</p>

C16		<p>Conidios ovoides y elipsoidales, sin presencia de fialides.</p> <p>Largo promedio: 10,6 μm</p> <p>Ancho promedio: 5,2 μm</p>
C17		<p>Conidióforos ramificados penicilados, conidios globosos u ovoides en cadenas.</p> <p>Largo promedio: 2,5 μm</p> <p>Ancho promedio: 2,4 μm</p>
C18		<p>Conidióforos ramificados penicilados, conidios globosos u ovoides en cadenas.</p> <p>Largo promedio: 2,1 μm</p> <p>Ancho promedio: 2,1 μm</p>
C19		<p>Conidióforos oscuros, conidios obclavados u ovoides separados longitudinalmente por septos.</p> <p>Largo promedio: 22,8 μm</p> <p>Ancho promedio: 10,5 μm</p>
C20		<p>Hifas septadas con tabiques transversales.</p>
C21		<p>Conidióforos ramificados penicilados, conidios globosos u ovoides en cadenas.</p> <p>Largo promedio: 2,3 μm</p> <p>Ancho promedio: 2,2 μm</p>

C22		<p>Conidios ovoides sin presencia de fialides.</p> <p>Largo promedio: 3,0 μm</p> <p>Ancho promedio: 1,2 μm</p>
C23		<p>Hifas septadas y ramificadas</p>
C24		<p>Hifas septadas con tabiques transversales.</p>
C25		<p>Conidias hialinas, grandes y elipsoidales.</p> <p>Largo promedio: 9,7 μm</p> <p>Ancho promedio: 4,4 μm</p>
C26		<p>Conidióforos ramificados penicilados, conidios globosos u ovoides en cadenas.</p> <p>Largo promedio: 2,5 μm</p> <p>Ancho promedio: 1,9 μm</p>
C27		<p>Conidios oscuros con formas ovaladas o en forma de limón, en cadenas simples y ramificadas.</p> <p>Largo promedio: 2,3 μm</p> <p>Ancho promedio: 2,1 μm</p>

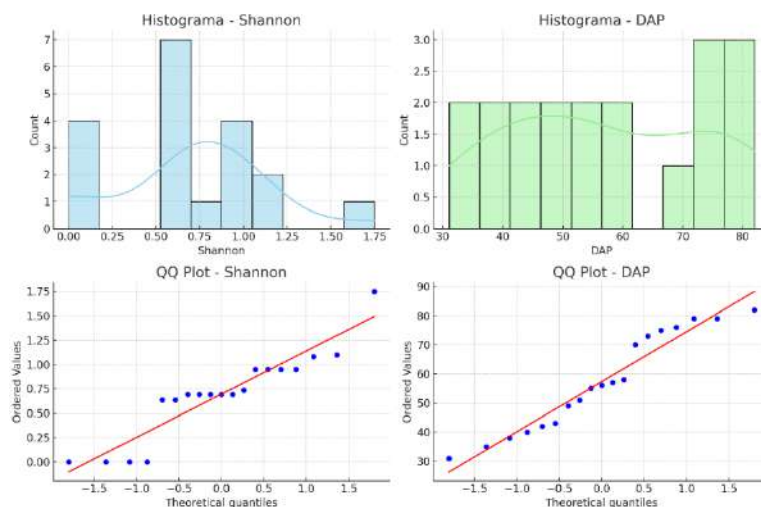
C28		<p>Conidióforos ramificados penicilados, conidios globosos u ovoides en cadenas. Largo promedio: 2,1 μm Ancho promedio: 2,0 μm</p>
C29		<p>Conidios globosos en cadenas largas, sin presencia de fialides. Largo promedio: 3,3 μm Ancho promedio: 3,2 μm</p>
C30		<p>Conidios ovoides sin presencia de fialides. Largo promedio: 3,5 μm Ancho promedio: 1,3 μm</p>
C31		<p>Conidios ovoides sin presencia de fialides. Largo promedio: 6,3 μm Ancho promedio: 2,2 μm</p>
C32		<p>Conidióforos ramificados penicilados, conidios globosos u ovoides en cadenas. Largo promedio: 3,8 μm Ancho promedio: 3,6 μm</p>
C33		<p>Conidios globosos sin presencia de fialides. Largo promedio: 5,1 μm Ancho promedio: 4,6 μm</p>

Anexo 4. Concentraciones de ADN extraído para morfotipos aislados de tarugos de *A. araucana*.

Morfotipo	Concentración (ng/μl)
C1	64,5
C3	190
C5	17,7
C6	12,5
C7	157
C8	125,5
C9	85,1
C10	63,3
C11	34
C12	58,8
C13	14
C14	94,2
C15	15,2
C16	1,5
C17	2,1
C18	135,5
C19	101,5
C20	11,6
C21	21,7
C22	12,3
C23	10,7
C24	31,1
C25	4,3
C26	34,1
C27	11,2
C28	134
C29	26,6
C30	405,5
C31	182

C32	2,0
C33	55,7

Anexo 5. Análisis de normalidad para índice de Shannon y DAP.



Anexo 6. Géneros aislados a partir de tarugos de *A. araucana* y su abundancia.

Género	Abundancia
<i>Pragmopora</i>	11
<i>Cladosporium</i>	8
<i>Mucor</i>	3
<i>Coniochaeta</i>	6
<i>Coniothyrium</i>	10
<i>Clonostachys</i>	1
<i>Ganoderma</i>	1
<i>Eurotiomycetes</i>	8
<i>Tolyptocladium</i>	4
<i>Trichoderma</i>	1
<i>Kabatiella</i>	3
<i>Preussia</i>	1
<i>Alternaria</i>	1
<i>Penicillium</i>	20
<i>Allantophomopsis</i>	1
<i>Hormonema</i>	1
<i>Talaromyces</i>	1
<i>Resinogalea</i>	1