



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales

Escuelas de Pregrado

**Identificación y caracterización de hongos endófitos  
aislados desde follaje de *Araucaria araucana* en el Parque  
Nacional Villarrica, Sector Puesco**

Patrocinante: Sr. Cristian González S

Trabajo de Titulación presentado como parte de los  
requisitos para optar al título de  
**Ingeniero en Conservación de Recursos Naturales**

**PAMELA TAMARA ACUÑA FERNÁNDEZ**

VALDIVIA

2025

Índice de materias		Página
i	Calificación del Comité de Titulación	i
ii	Agradecimientos	ii
iii	Resumen	iii
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Descripción general de <i>Araucaria araucana</i> (Mol.) C. Koch	1
1.2	Hongos endófitos (HE)	3
2	MÉTODOS	7
2.1	Área de estudio	7
2.2	Obtención de material biológico	8
2.3	Evaluación de la eficacia de tres protocolos de desinfección superficial de la hoja de <i>A. araucana</i>	9
2.4	Aislamiento de hongos endófitos foliares	10
2.5	Caracterización macroscópica y microscópica de HE	11
2.6	Análisis molecular de cepas de HE	12
2.7	Determinación del rol ecológico de las cepas identificadas	14
2.8	Análisis de diversidad	14
3	RESULTADOS	15
3.1	Descripción del rodal	15
3.2	Eficacia de tres protocolos de desinfección superficial	16
3.3	Caracterización macroscópica de cepas aisladas de HE	17
3.4	Caracterización microscópica de cepas aisladas de HE	20
3.5	Análisis molecular	23
3.5.1	Identificación de especies por medio de marcadores moleculares	24
3.6	Relación ecológica entre hongos y árboles hospederos	26
3.7	Análisis de diversidad	29
4	DISCUSIÓN	31
4.1	Protocolo de desinfección	31
4.2	Caracterización morfológica de cepas de HE	32
4.3	Porcentaje de identidad de secuencias LSU entre aislamientos del mismo género	33
4.4	Especies y géneros de HE aislados desde hojas de <i>A. araucana</i>	34
4.5	Relación ecológica potencial de los géneros fúngicos aislados con el estado del hospedero	37
4.6	Diversidad y riqueza de géneros de HE	38
4.7	Limitaciones del estudio y consideraciones futuras	39
5	CONCLUSIONES	39
6	REFERENCIAS	41
Anexos	1 Registro de árboles muestreados	
	2 Descripción macroscópica de colonias y características de conidias	
	3 Resultados de la cuantificación de ADN templado	

4 Resultados de los productos PCR con la amplificación de la región  
LSU

## Calificación del Comité de Titulación

	<b>Nota</b>
Patrocinante: Sr. Cristian González	<u>5,95</u>
Informante: Srta. Javiera Manríquez	<u>6,5</u>
Informante: Sr. Francisco Tello	<u>5,9</u>

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

## **Agradecimientos**

Agradezco profundamente a mis padres, Bernardita y Juan Carlos, quienes han sido un pilar fundamental en mi vida. Sin su amor, apoyo incondicional y confianza en mí, este camino no habría sido posible.

Agradezco a mi pareja, Francisco, por su constante apoyo, por motivarme y acompañarme en cada etapa de este proceso académico.

Agradezco al profesor Cristian González, por la oportunidad de realizar este trabajo, que significó una valiosa y enriquecedora experiencia.

Gracias también a Javiera Manríquez, por su dedicación, disposición y tiempo durante todo el trabajo en laboratorio.

Por último, quisiera agradecer al Laboratorio Salud de Bosques, por darme el espacio y todo lo necesario para llevar a cabo esta tesina.

## RESUMEN

*Araucaria araucana* es una especie arbórea endémica del sur de Chile y Argentina que actualmente enfrenta diversas amenazas tanto bióticas como abióticas, entre ellas la aparición de patógenos que podrían estar afectando su estado sanitario. Sin embargo, la microbiota endófito asociada a esta especie ha sido escasamente investigada. Los hongos endófitos, en particular, son microorganismos que habitan tejidos vegetales sin causar daño aparente y que pueden cumplir funciones clave en la ecología de sus hospederos, como protección frente a patógenos o mayor tolerancia al estrés. Por lo tanto, conocer su presencia en *A. araucana* es clave para comprender cómo estas interacciones simbióticas podrían influir en la relación con patógenos. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar los géneros de hongos endófitos foliares en un bosque puro de *A. araucana* en el Parque Nacional Villarrica, sector Puesco. Se recolectaron ramas de 20 árboles juveniles y se evaluaron tres protocolos de desinfección superficial para optimizar el aislamiento de colonias fúngicas, siendo el más eficiente el basado en alcohol al 70% y agua destilada estéril. Se identificaron 17 cepas correspondientes a seis órdenes y diez géneros, siendo Xylariales el más abundante, seguido de Coniochaetales. Entre los taxones destacan *Tricharina* y *Geoscypha*, asociados a ambientes post-incendio, y *Preussia*, reportado en regiones áridas, lo que sugiere adaptación a condiciones de estrés. El número de géneros por árbol no mostró relación clara con la afectación de copa, lo que indica que el rol de cada hongo podría depender de características específicas del hospedero. Finalmente, se detectó *Pewenomyces kutranfy*, hongo recientemente descrito como patógeno en *A. araucana*, lo que refuerza la importancia de estudiar las dinámicas funcionales de los hongos endófitos en especies vulnerables.

Palabras clave: *Araucaria araucana*, hongos endófitos, diversidad, estado sanitario, estrés ambiental.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Descripción general de *Araucaria araucana* (Mol.) C. Koch

*Araucaria araucana* (Mol.) C. Koch es una especie endémica del sur de Chile y Argentina que se distribuye dentro de dos áreas discontinuas en la Cordillera de los Andes y en la Cordillera de Nahuelbuta (Donoso 1981, 1993, Veblen 1982). La población más al norte se encuentra en los 37°27' lat. sur y su población en el límite sur se encuentra en los 40°03' lat. sur (Donoso 1993). En Argentina se encuentra en la provincia de Neuquén entre los 37°45' y 40°20' lat. sur (Veblen 1982).

La especie pertenece al tipo forestal Araucaria el cual se ubica entre los 600 m s.n.m. y el límite altitudinal de vegetación arbórea a los 1800 m s.n.m. aproximadamente (Donoso 1981). En esta distribución se asocia comúnmente con Lengua (*Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser) y Ñirre (*Nothofagus antártica* (G.Forst.) Oerst.) en altitudes mayores, y con Coihue (*Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst) en altitudes menores. Estas asociaciones pueden variar según la ubicación; por ejemplo, en las zonas bajas de la Cordillera de Nahuelbuta, se encuentra asociada con Mañío (*Saxegothaea conspicua* Lindl), Ulmo (*Eucryphia cordifolia* Cav.), Tineo (*Weinmannia trichosperma* Cav.) y Laurel (*Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul.) (Montaldo 1974).

Las condiciones en las que se desarrolla la especie varían significativamente según la región. En la Cordillera de la Costa, el clima es templado-cálido con una marcada influencia mediterránea donde presenta cuatro meses secos al año. En la Cordillera de los Andes, debido a la altitud, predomina un clima de alta montaña, con temperaturas mínimas bajas durante todo el año, máximas que pueden alcanzar los 30°C y precipitaciones que varían entre 1600 y 1900 mm anuales (Montaldo 1974). En la Cordillera Argentina, la especie se adapta a un clima seco de estepa con menores precipitaciones (Donoso 1993). En la Cordillera de Nahuelbuta, la precipitación anual varía entre 2000 y 4500 mm, mientras que la temperatura media oscila entre 1°C en invierno y 9°C en verano (Montaldo 1974). En esta distribución puede crecer en suelos delgados, en ocasiones cubiertos de una fina capa de ceniza volcánica (Veblen 1982).

*A. araucana* es una especie longeva y de lento crecimiento que puede vivir 1300 años o más (Montaldo 1974). Estos árboles pueden tener hábitos de crecimiento distintos dependiendo si existe competencia con otras especies por luz, donde los individuos realizan una poda natural de sus ramas inferiores para reducir su copa, tomando forma de paraguas. Cuando crecen aislados, la forma de su copa es de aspecto cónico, con ramas que se extienden en forma horizontal, con los extremos doblados hacia

arriba (Lizana 2009). Así también, los patrones de distribución y asociación con otras especies dependen fuertemente de la exposición en que se encuentre (Donoso 1993, Schmidt 1977, Veblen 1982).

La regeneración de *A. araucana* se favorece por claros en el dosel creados principalmente por la caída natural de árboles (Veblen 1982, Donoso 1993). En Argentina la especie parece depender del fuego para regenerarse en áreas abiertas, especialmente donde se asocia con *N. antártica* donde crece bajo su propio dosel (Donoso 1993). Como resultado, muestra adaptaciones para enfrentar estos eventos, como una corteza gruesa, poda natural de ramas inferiores y capacidad de rebrote vegetativo para mitigar los efectos negativos de incendios (González y Veblen 2007).

Es una especie dioica, aunque raramente monoica (Sanguinetti 2014), cuyos individuos alcanzan la madurez sexual a los 30 años, con troncos de más de 20 cm de diámetro (Muñoz 1984). La aparición de brotes de flores femeninas durante el invierno marca el inicio del ciclo reproductivo. En enero y febrero, el viento transporta el polen hacia los estróbilos femeninos para su fertilización. Los conos tardan entre 16 y 18 meses en desarrollarse, por lo que durante el segundo año entre verano y otoño pueden verse dos generaciones de conos. Finalmente, los conos alcanzan su madurez entre febrero a mayo donde dispersan sus semillas por gravedad (González *et al.* 2006).

Dada la separación geográfica entre las poblaciones costeras y andinas de araucaria, así como la diversidad de hábitats dentro de su área de distribución, es razonable esperar algún grado de diferenciación genética. En Bekessy *et al.* (2002) se detectó una extensa variabilidad genética en 13 poblaciones estudiadas ubicadas dentro de la distribución natural de la especie. Además, según las estimaciones de diversidad realizadas, no se proporciona evidencia de una reducción importante en la diversidad genética a partir de eventos históricos. Según los autores, esta variabilidad puede estar explicada por los refugios que quedaron durante la última glaciación (hace 18.000 a 20.000 años).

Esta especie se caracteriza por su alto valor ecológico, estético y sobre todo cultural, puesto que es un árbol que tiene una gran importancia para comunidades pehuenches del pueblo mapuche del sur de Chile y Argentina (Donoso 1993). Como consecuencia de su larga historia de explotación para el aprovechamiento de su madera, es que esta especie está protegida a través del Decreto N°40 de 1990 [Ministerio de Agricultura] el que la declara Monumento Nacional, por lo que también prohíbe su corta y explotación. Asimismo, su estado de conservación actual de acuerdo a la clasificación de especies según su estado de conservación del Ministerio de Medio Ambiente de se clasifica como En Peligro (EN) para las poblaciones ubicadas en la cordillera de Nahuelbuta y de Vulnerable (VU) en las poblaciones ubicadas en la Cordillera de Los Andes, según el Decreto Supremo DS 79/2018 del Ministerio de Medio Ambiente (MMA 2018).

Sin embargo, el grado de conservación que tiene este árbol en Chile no la protege de amenazas bióticas. Los cambios en las condiciones climáticas de su hábitat natural están alterando su equilibrio ecológico, lo que la vuelve más vulnerable al ataque de patógenos y al desarrollo de enfermedades. Lo anterior se reporta desde 2016 a partir de denuncias al Servicio agrícola Ganadero (SAG) por muerte de individuos de *A. araucana* en la región de la Araucanía y del Biobío (SAG 2021). La sintomatología de esta anomalía se describe como clorosis de las hojas que inicia en la parte inferior de las ramas hacia la parte superior, causando la desecación de estas, llegando incluso a causar la muerte del individuo afectado. Esta anomalía se denominó Daño Foliar de la Araucaria (DFA) (CONAF 2024).

Aunque anteriormente se describieron varios patógenos menores, estos corresponden a casos puntuales, por lo que ninguna de las especies identificadas parece ser el patógeno principal que explique los síntomas de decaimiento observados en individuos de araucaria (Balocchi 2022). Ante ello, se han realizado números estudios para determinar qué patógenos están presentes con mayor frecuencia en los árboles dañados (Besoain *et al.* 2017, Medina *et al.* 2018, Vélez *et al.* 2020, Balocchi *et al.* 2021, Sanfuentes *et al.* 2022) y así determinar la causa principal del DFA. Por ejemplo, en Balocchi *et al.* (2021) se estudiaron canchales en ramas y tallos donde se encontraron signos como ascocarpos negros similares a especies del género *Caliciopsis* descritas previamente en *A. araucana*. Sin embargo, los análisis filogenéticos mostraron la presencia de una nueva especie de hongo denominada *Pewenomyces kutranfy* (Balocchi, I. Barnes & M.J. Wing.) a la cual se aplicaron ensayos de patogenicidad donde se confirmó que esta nueva especie es capaz de producir canchales en *A. araucana*.

## 1.2 Hongos endófitos (HE)

Los hongos endófitos (HE) colonizan tejido vegetal vivo sin causar efectos negativos inmediatos u obvios (Sieber 2007). Estos microorganismos pueden establecer diversas interacciones simbióticas con sus hospederos, como parasitismo, comensalismo y mutualismo (Stone *et al.* 2004). Mayoritariamente pertenecen al phylum Ascomycota, aunque también se encuentran en Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota (Arnold 2007). Se distribuyen ampliamente en cualquier tipo de tejido, en distintos tipos de plantas ya sean herbáceas, angiospermas, gimnospermas, musgos, líquenes y helechos, y también se pueden encontrar en diversos ecosistemas tales como bosques tropicales, templados, mediterráneos, boreales, así como en campos agrícolas (Sieber 2007).

Estos hongos son altamente diversos a pequeña escala y pueden estar presentes como hifas internas, invisibles y microscópicas, cuya presencia se revela cuando esporulan. Además, la mayoría de

los endófitos son específicos del hospedero o del tejido (Stone 2004). Debido a esto, su identificación a nivel taxonómico puede resultar difícil, por lo que la ausencia de esta información es un obstáculo para el conocimiento de la diversidad de estos organismos. Sieber (2007) menciona que el número de especies de hongos endófitos detectados dependerá de factores bióticos, abióticos y factores experimentales, tales como de la especie hospedera, el tipo y disposición de la fase del tejido de la planta, condiciones edáficas y climáticas, el procedimiento de aislamiento y tamaño de muestras. Un ejemplo de esto son los HE específicos de tejidos, como los de hojas o de tejido leñoso. Los HE que son específicos de hojas pueden estar expuestos a mayores presiones selectivas a diferencia de los HE de tejido leñoso. Esto se debe a que las hojas son más dinámicas bioquímicamente y más susceptibles a daños. Estas diferencias pueden elucidar patrones en la historia de vida, especificidad, beneficios para el hospedero y capacidad para actuar como antagonistas de patógenos (Arnold 2007).

La relación mutualista entre hongos y plantas beneficia al hospedero de varias formas, como la protección mediante la producción de alcaloides, el aumento del crecimiento y la tolerancia al estrés (Sánchez *et al.* 2013). Estos beneficios se producen a través de tres mecanismos principales: 1) producción directa de enzimas y metabolitos secundarios con actividad antagonista hacia patógenos; 2) inducción o aumento de la expresión de mecanismos de defensa químicos o fisiológicos en el hospedero; y 3) ocupación del nicho de patógenos, hiperparasitismo y predación (Gao *et al.* 2010).

El hongo endófito puede generar factores de virulencia como exoenzimas y metabolitos fitotóxicos al interactuar con el tejido del hospedero, mientras que la planta responde con defensas mecánicas y bioquímicas (Schulz y Boyle 2005). Esta interacción establece un equilibrio de antagonismo. Cuando los factores de virulencia del hongo y las defensas del hospedero no están balanceados, puede resultar en estrés o senescencia del hospedero, convirtiendo al hongo en un patógeno.

Algunos géneros de HE son prometedores como controladores biológicos de enfermedades en cultivos alimentarios y forestales, puesto que estos hongos pueden colonizar una amplia gama de cultivos como soja, trigo, maíz y algodón, y tienen la capacidad de parasitar otros hongos y producir sustancias antibióticas que inhiben patógenos. Un ejemplo de esto son las especies del género *Trichoderma* (Pers.), las cuales han mostrado eficacia como biocontrolador contra enfermedades en plantaciones de *Pinus radiata* (D. Don), como la causada por *Fusarium circinatum* (Nirenberg y O'Donnell), reduciendo la mortalidad post-emergencia de plántulas según investigaciones recientes (Moraga-Suazo *et al.* 2011).

Actualmente, los estudios sobre la asociación y los efectos de los hongos endófitos en *A. araucana* son escasos. Sin embargo, investigaciones recientes han comenzado a arrojar luz sobre este tema. Por ejemplo, en Díaz-Valenzuela *et al.* (2024) aislaron cuatro cepas de hongos endófitos de las

raíces de *A. araucana* y evaluaron su capacidad para producir ácido indolacético (AIA) y solubilizar fosfatos. Los resultados mostraron que *Umbelopsis dimorpha* (Hesselt. y J.J. Ellis) W. Gams presentó la mayor producción de AIA y eficiencia en la solubilización de fosfatos, promoviendo significativamente el crecimiento de plántulas de *Nicotiana tabacum* (L.) en condiciones *in vitro*.

En otras especies del género *Araucaria*, la investigación sobre hongos endófitos también es limitada. Sin embargo, estudios en *A. angustifolia* (Bertol.) Kuntze han identificado una diversidad de hongos endófitos que contribuyen a la salud y crecimiento de las plantas, sugiriendo que estas asociaciones simbióticas pueden ser comunes y beneficiosas dentro del género (Groff *et al.* 2024).

El estudio de los hongos endófitos es un área de interés creciente en la investigación ecológica y biológica debido a su papel crucial en la salud y funcionamiento de los ecosistemas (Arnold 2007). Estos microorganismos pueden influir en la tolerancia de las plantas hospedadoras a factores de estrés biótico y abiótico, desempeñando funciones clave en su desarrollo y supervivencia (Rodríguez *et al.* 2009). Sin embargo, la diversidad de hongos endófitos foliares en *A. araucana*, una especie endémica y en estado vulnerable presente en los bosques templados del sur de Chile, sigue siendo poco conocida, especialmente considerando el deterioro de su estado fitosanitario y la creciente aparición de enfermedades que la afectan. Es por esto que comprender la composición de estos microorganismos es esencial para conocer sus interacciones con el árbol, las cuales pueden estar influenciadas por diversos factores, como las condiciones ambientales, la distribución geográfica y la estructura foliar de *A. araucana*.

Este trabajo representa una aproximación hacia la comprensión del microbioma foliar de *A. araucana* y su rol en la conservación de los bosques templados, sentando bases para futuras investigaciones sobre sus interacciones ecológicas y potenciales aplicaciones biotecnológicas. Conocer la diversidad de hongos endófitos asociados a esta especie no solo aporta al entendimiento de su ecología microbiana, sino que también puede contribuir a su conservación frente a amenazas sanitarias, como DFA y otros agentes patógenos emergentes.

En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivo general determinar la diversidad de géneros de hongos endófitos foliares asociados a *A. araucana* en el Parque Nacional Villarrica, sector Puesco.

Objetivos específicos:

- Evaluar la eficacia de tres protocolos de desinfección superficial de hojas de *A. araucana* en el aislamiento de hongos endófitos, comparando la cantidad de colonias obtenidas con cada tratamiento.
- Identificar mediante caracteres morfológicos y moleculares cepas de hongos endófitos aislados desde hojas de *A. araucana* en el Parque Nacional Villarrica.
- Caracterizar el posible rol ecológico de los hongos endófitos identificados en hojas de *A. araucana*.

## 2. MÉTODOS

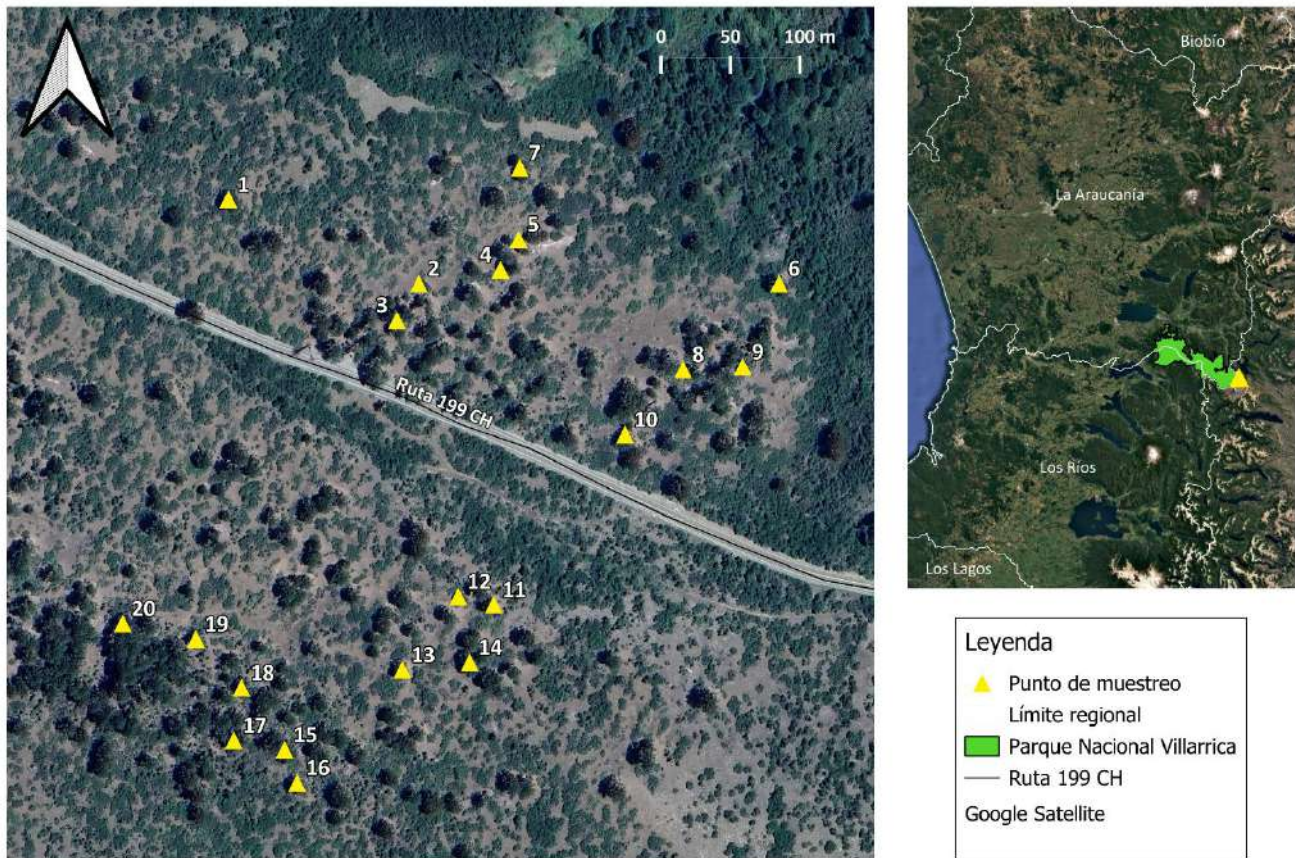
### 2.1 Área de estudio

El área de estudio comprende el Parque Nacional Villarrica, específicamente en el sector Puesco (figura 1). Este parque pertenece al Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Estado (SNASPE), por lo tanto, la toma de muestras foliares de *A. araucana* para este estudio se llevó a cabo con la previa autorización de CONAF en octubre de 2024.

El Parque Nacional Villarrica se ubica en la Región de la Araucanía, provincia de Cautín (comunas de Villarrica, Pucón, Curarrehue) y en la Región de Los Ríos, provincia de Valdivia (comuna de Panguipulli) (39°29'39"S-71°44'46"O) (CONAF 2013). Su superficie es de 54,460 ha (CONAF 2013) y alberga cuatro volcanes: Lanín, Quinquilil, Quetrupillán y Villarrica. Destacan los bosques resinosa templados andinos de *A. araucana* y *N. dombeyi*, matorral bajo templado andino de *Discaria chacaye* y *Berberis empetrifolia*, y bosques caducifolia templados andinos de *N. pumilio* y *A. araucana* (Luebert y Plissock 2017).

Según la clasificación climática de Köppen-Geiger, aplicada a Chile por Sarricolea *et al.* (2017), el parque tiene clima mediterráneo frío de lluvia invernal, tundra de lluvia invernal y mediterráneo de lluvia invernal de altura. Las temperaturas varían de 17°C en los meses cálidos a 7,3°C en los meses fríos, con una media anual de 11,5°C. Las precipitaciones anuales alcanzan los 3000 mm, concentrándose entre mayo y agosto, con abundante nieve.

El sector Puesco se ubica en la zona oriental del parque, cerca de Curarrehue, en la Ruta Internacional CH-199 hacia el Paso Mamuil Malal. Su geomorfología destaca por fuertes pendientes, afloramientos volcánicos como el Cerro Las Peinetas y la presencia del Volcán Lanín (3.747 m s.n.m.), con depósitos glaciares de origen volcánico. Este sector alberga un bosque puro de *A. araucana*, acompañado de bosques achaparrados de *N. pumilio* y *N. antarctica* en las laderas del volcán. Su hidrografía incluye el Río Puesco, que recibe aguas de deshielos andinos, y los lagos Quillehue y Tromen, este último en Argentina. Su clima es mediterráneo frío con lluvias invernales, con precipitaciones anuales cercanas a los 3,000 mm y acumulaciones de nieve que pueden superar los 2 metros en invierno (CONAF 2013).



**Figura 1.** Mapa de puntos de muestreo que corresponden a cada árbol dentro del sector Puesto en el Parque Nacional Villarrica. Elaboración propia.

## 2.2 Obtención de material biológico

Se seleccionaron 20 individuos jóvenes de *A. araucana* en el sector Puesto. Se consideraron individuos jóvenes aquellos cuya altura no superaba los 20 metros.

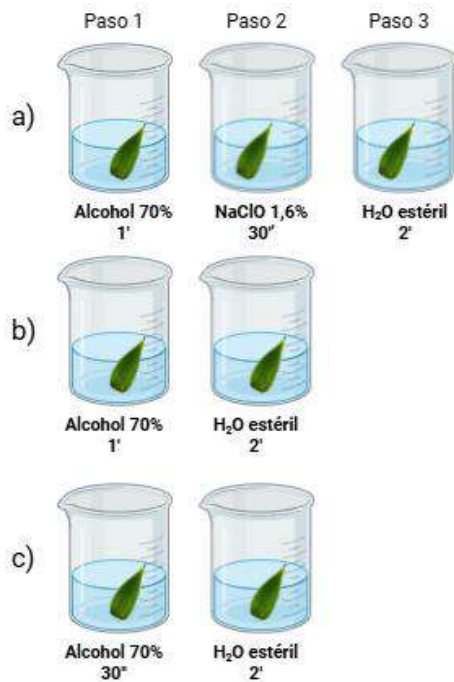
De cada árbol se recolectó una rama sana de aproximadamente 20 centímetros, la cual se extrajo desde la base de copa del árbol con un podador de altura. A cada individuo se le midió el DAP (Diámetro a la Altura del Pecho), la altura y el estado fitosanitario, además de analizar su distribución espacial junto con los árboles cercanos (anexo 1). Esto permitió confirmar que se trata de árboles juveniles y con condiciones ambientales similares entre sí. Todas las muestras recolectadas fueron etiquetadas con el número de árbol al que pertenecían y posteriormente fueron trasladadas al Laboratorio de Salud y Bosques (LSB) de la Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales de la Universidad Austral de Chile

donde fueron procesadas. Aquí cada muestra fue separada y guardada en bolsa de papel, donde se conservaron a una temperatura de 4°C para ser procesadas posteriormente.

### 2.3 Evaluación de la eficacia de tres protocolos de desinfección superficial de la hoja de *A. araucana*

Con el objetivo de obtener un mayor número de colonias de hongos endófitos (HE), se evaluó la eficacia de tres protocolos de desinfección superficial de hojas de *A. araucana*. Para ello, se seleccionaron dos ramas correspondientes a dos individuos distintos. De cada rama se extrajeron 10 hojas, las cuales fueron cortadas en segmentos de 3 mm<sup>2</sup> cada una (figura 3). Cada uno de los protocolos se aplicó a un conjunto distinto de hojas, en condiciones estériles dentro de una cámara de flujo laminar.

El primer protocolo consistió en sumergir cada hoja en alcohol al 70% por 1 minuto, luego en una solución de hipoclorito de sodio al 1,6% por 30 segundos y finalmente en agua destilada estéril por 2 minutos. El segundo protocolo consistió en sumergir cada hoja en alcohol al 70% por 1 minuto y luego en agua destilada estéril por 2 minutos. El tercer protocolo consistió en sumergir cada hoja en alcohol al 70% por 30 segundos y en agua destilada estéril por 2 minutos (figura 2). Luego de aplicado cada protocolo, las hojas se secaron con papel absorbente estéril y se cortaron en segmentos de 3 mm<sup>2</sup> de los cuales 5 se sembraron en placas Petri de 90 mm x 15 mm con 19,5 mg mL<sup>-1</sup> con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), suplementado con de 0,05 mg mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol. Para cada protocolo se utilizaron 20 placas Petri: 10 placas por rama, cada una con una hoja segmentada en 5 fragmentos dispuestos de forma aleatoria y equidistante entre sí. Cada protocolo se evaluó a los 15 días de realizado el tratamiento contando el número de colonias que se desarrolló, además del cálculo del porcentaje de colonización, el cual consiste en la proporción de segmentos foliares sembrados que desarrollaron colonias fúngicas.



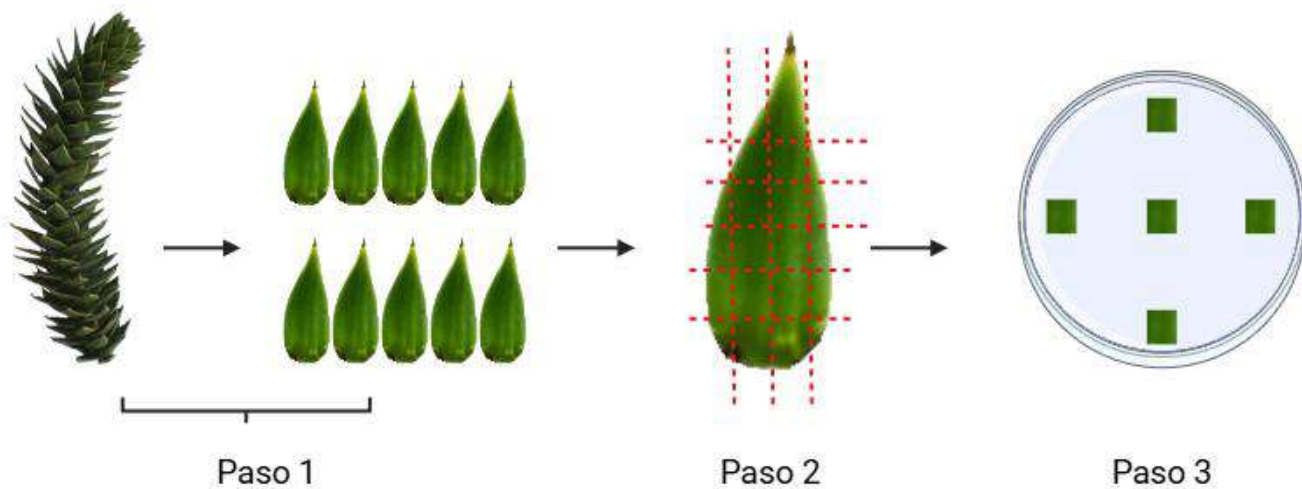
**Figura 2.** Tres protocolos de desinfección superficial aplicados a las hojas de *A. araucana*. a): Protocolo 1, b): Protocolo 2 y c): Protocolo 3. Elaboración propia mediante BioRender.

#### 2.4 Aislamiento de hongos endófitos foliares

Para el aislamiento de HE se siguió el mismo procedimiento que en la sección anterior (figura 3). A cada rama recolectada se le extrajo 10 hojas que fueron procesadas en una cámara de flujo laminar donde primeramente se le aplicó el protocolo de desinfección con más eficacia a cada hoja. Cada hoja fue secada por papel absorbente estéril para quitar el exceso de líquido.

Luego del proceso de desinfección, cada hoja se dividió en segmentos de 3 mm<sup>2</sup>, de los cuales 5 se sembraron en placas Petri de 90 mm x 15mm con 19,5 mg mL<sup>-1</sup> de Agar Papa Dextrosa (PDA), suplementado con 0,05 mg mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol. Se utilizaron 10 placas Petri por cada árbol, es decir, una placa para cada hoja segmentada. En total se utilizaron 200 placas Petri para el sitio de estudio.

En cada placa Petri se distribuyeron aleatoriamente los 5 segmentos equidistantes entre sí, con el fin de potenciar las posibilidades de crecimiento de cada sección sembrada (figura 3).



**Figura 3.** Metodología utilizada en el aislamiento de HE a partir de segmentos de hojas de *A. araucana*. Elaboración propia mediante BioRender.

Cada placa Petri se selló con papel Parafilm para mantener condiciones estériles. Posteriormente, se incubaron a una temperatura de  $24 \pm 1$  °C en oscuridad en una estufa de cultivo de la marca FOC 215E Coolerincubator, durante al menos 15 días dependiendo de la velocidad de crecimiento de las colonias. Al finalizar este periodo, se aislaron las colonias fúngicas que se desarrollaron a partir de los segmentos foliares sembrados en las placas Petri para obtener colonias puras. Para el aislamiento de colonias puras se utilizarán placas Petri de 60 mm x 15 mm con 19,5 mg mL<sup>-1</sup> de PDA, las cuales fueron etiquetadas con un código único que representará el número del árbol y el número de hoja. Cada aislamiento puro se incubó nuevamente en la estufa de cultivo por 15 días aproximadamente, de acuerdo con la velocidad de crecimiento de cada cepa.

## 2.5 Caracterización macroscópica y microscópica de HE

Los aislados puros obtenidos fueron caracterizados de acuerdo con la descripción de sus características macroscópicas: el color de la colonia (anverso y reverso) y la textura (lisa, vellosa, pulverulenta, algodonosa, aterciopelada). Posteriormente, las cepas analizadas fueron sometidas a un análisis de agrupamiento jerárquico basado en las características anteriores, agregando además las medidas de largo y ancho de conidias (valores mínimos y promedio de largo y ancho). La matriz de disimilitud se construyó utilizando la distancia de Gower (Kaufman y Rousseeuw, 1990), que permite integrar adecuadamente variables cualitativas y cuantitativas. Se aplicó el método de Ward para la formación de grupos, minimizando las diferencias internas entre morfotipos. La elección del número de

grupos ( $K = 8$ ) se determinó a partir de la inspección visual del dendrograma y fue complementada con métodos de validación como el codo, la silueta y la estadística gap (Legendre y Legendre, 1998).

Por consiguiente, se realizó el análisis microscópico de cada grupo definido en el análisis anterior, el que consistió en observar estructuras reproductivas que permitieron la diferenciación entre cepas. Para este procedimiento se realizaron preparaciones microscópicas en portaobjetos utilizando azul de lactofenol. Las mediciones de estructuras fúngicas, como conidios y conidióforos, se realizaron utilizando el software ImageJ.

El análisis de las estructuras microscópicas y la diferenciación entre cepas se realizó mediante claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998) y Pitt y Hocking (2009). Además, se consultaron fuentes complementarias disponibles en la base de datos *Mycobank* y en artículos científicos obtenidos mediante búsquedas en plataformas académicas.

Posteriormente, fueron sometidas a un Análisis de Componentes Principales (PCA) aquellas cepas donde se obtuvieron medidas de conidias (largo y ancho). Así también luego de la observación detallada de las estructuras de cada cepa, fueron sometidas a un PCA los grupos de cepas cuyas características microscópicas (forma y tamaño de conidias y conidióforos) fueron similares, con el objetivo de identificar la variación morfológica entre cepas dentro de cada grupo y seleccionar representantes que capturaran esa variabilidad, reduciendo así el número de muestras a considerar para la extracción molecular.

## 2.6 Análisis molecular de cepas de HE

Se extrajo ADN de las cepas de hongos endófitos que presentaron diferencias en sus características macroscópicas y microscópicas. Las cepas utilizadas fueron cultivadas previamente en medio de cultivo PDA a una temperatura de  $24 \pm 1$  °C en oscuridad por 15 días. La extracción se realizó utilizando el kit comercial E.Z.N.A.® Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-tek), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cuantificación del ADN se realizó con un fluorómetro Qubit 4 (Invitrogen™), empleando el kit Qubit™ dsDNA HS Assay, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizaron dos mediciones independientes por muestra.

En primera instancia, se llevó a cabo la amplificación del ADN en la región ITS (Internal Transcribed Spacer) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los partidores ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'). El

volumen final de cada muestra fue de 25  $\mu$ L, que contenía: 12,5  $\mu$ L de SapphireAmp® Fast PCR Máster Mix (Takara Bio Inc); 0,5  $\mu$ L de primer ITS 4; 0,5  $\mu$ L de primer ITS 5; 9,5  $\mu$ L de agua molecular y 2  $\mu$ L de templado de ADN.

La PCR se realizó en un termociclador Veriti® Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific bajo el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineamiento a 53°C por 45 segundos y extensión a 72° C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 15 minutos (White *et al.* 1990).

En los casos en que no se obtuvo amplificación exitosa con los partidores ITS 4 e ITS 5, se utilizó la región LSU (Large Subunit), empleando los partidores LR0R (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') y LR5 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3') bajo el siguiente perfil térmico: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, alineamiento a 50 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C durante 2 minutos y una extensión final a 72 °C por 15 minutos

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,75%. La preparación del gel se llevó a cabo en un matraz de 125 ml, el cual contenía 1,05 gr de agarosa disueltos en 60 ml de TAE 1x. En un papel Parafilm se mezcló 3  $\mu$ L de producto de PCR con 1,5  $\mu$ L de 6x DNA loading dye. Se utilizaron dos cepas distintas como controles positivos: una para ITS (ITS4 e ITS5) y otra para LSU (LR0R y LR5), ambas con una única banda. El control negativo consistió en una reacción de PCR sin ADN templado. Todos los productos, incluidos los controles, fueron cargados en el gel y procesados en la cámara de electroforesis durante 40 minutos a 100 V. Posteriormente, el gel de agarosa fue visualizado en un transiluminador.

Los productos obtenidos fueron enviados a secuenciación en dirección forward al laboratorio Core Facility de la Universidad Austral de Chile (Austral Omics). Las secuencias de nucleótidos generadas fueron editadas con el programa Chromas, eliminando los extremos de baja calidad antes de ser exportadas en formato FASTA. Luego, se analizaron mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), comparándolas con secuencias homólogas disponibles en la base de datos GenBank. La identificación taxonómica se basó en coincidencias con una cobertura de alineamiento entre 98–100% y un porcentaje de identidad igual o superior al 98% para asignaciones a nivel de género, y mayor a 99% para asignaciones a nivel de especie.

Adicionalmente, se realizaron comparaciones por pares de las secuencias LSU obtenidas pertenecientes a un mismo género utilizando la herramienta EMBOSS Needle: Pairwise Sequence Alignment (EMBL-EBI), con el objetivo de estimar los porcentajes de identidad y explorar su grado de similitud. Este análisis se consideró como un criterio preliminar de comparación, dado que el marcador

LSU es conservador y no permite una delimitación taxonómica definitiva a nivel de especie (Schoch *et al.* 2012)

Por último, las cepas identificadas molecularmente fueron almacenadas en el cepario del laboratorio (LSB) de la Universidad Austral, con el método de estasis de agua siguiendo el protocolo de Lopez-Lastra *et al.* (2002).

## 2.7 Determinación del rol ecológico de las cepas identificadas

El posible rol ecológico de las cepas fúngicas identificadas se determinó a partir de antecedentes bibliográficos y registros previos disponibles en bases de datos y literatura especializada. Para cada género identificado se revisó su comportamiento reportado como endófito, saprótrofo o patógeno, considerando su asociación conocida con plantas leñosas o con especies del género *Araucaria*. La clasificación se basó principalmente en publicaciones científicas recientes disponibles a través de Google Académico y bases de datos taxonómicas como MycoBank y USDA Fungal Databases (United States Department of Agriculture).

## 2.8 Análisis de diversidad

Para este análisis, solo se consideraron las cepas identificadas a partir del análisis molecular para así evitar la incertidumbre asociada a la asignación de género taxonómico a aquellas cepas que fueron agrupadas únicamente por similitud morfológica.

Los datos de los géneros de HE identificados fueron analizados mediante el software RStudio, utilizando el paquete vegan, una herramienta ampliamente utilizada en estudios ecológicos para la estimación de diversidad y comparación de comunidades microbianas (Oksanen *et al.* 2022).

Se calculó la riqueza observada, correspondiente al número total de géneros identificados mediante análisis molecular. Para estimar la riqueza real del sitio y corregir el posible sesgo derivado del muestreo incompleto, se utilizó el estimador Chao1, el cual se basa en la abundancia de géneros raros y proporciona una estimación más robusta de la riqueza total esperada en la comunidad (Chao 1984).

Además, se calcularon los índices de diversidad de Shannon y Simpson. El índice de Shannon considera tanto la riqueza como la equitatividad en la distribución de géneros, donde valores más altos indican una comunidad más diversa y equilibrada, mientras que valores bajos sugieren dominancia de

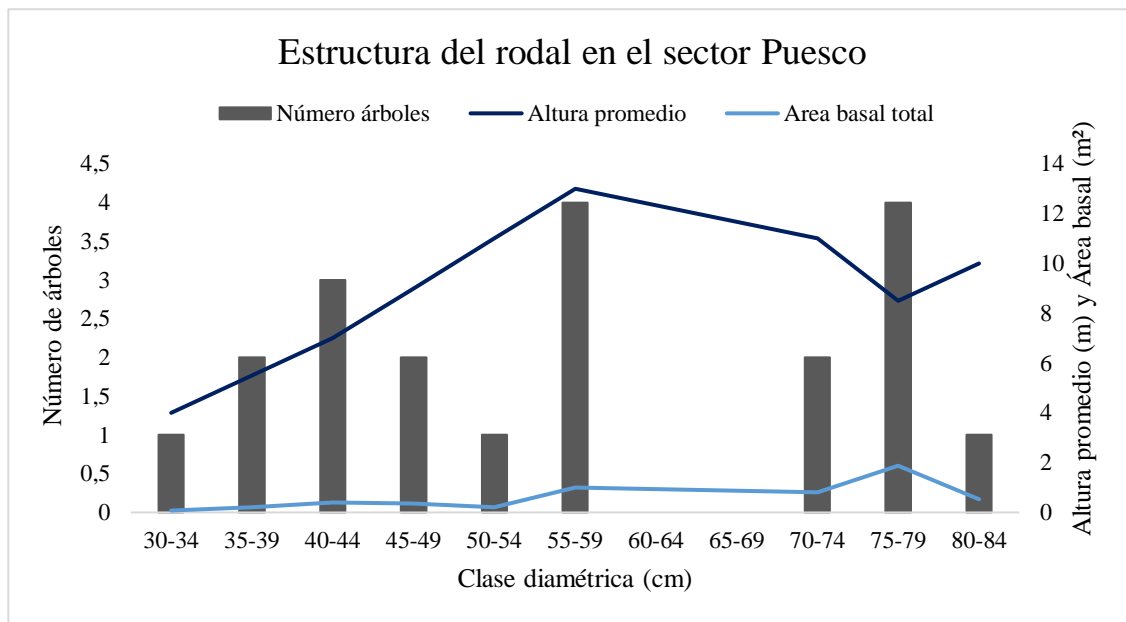
pocos géneros (Moreno *et al.* 2011). Por su parte, el índice de Simpson estima la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar pertenezcan al mismo género, siendo más sensible a los géneros dominantes: valores cercanos a 1 indican alta diversidad y baja dominancia (Magurran 2004).

Asimismo, se realizó un análisis de rarefacción a través del software EstimateS, permitiendo evaluar si el esfuerzo de muestreo fue suficiente para capturar la diversidad de géneros en el sitio. Estos análisis fueron realizados considerando el sitio de estudio como un conjunto.

### **3. RESULTADOS**

#### 3.1 Descripción del rodal

La figura 4 muestra la estructura del rodal del sitio de estudio. Es importante destacar que los árboles fueron previamente seleccionados con el criterio de ser individuos jóvenes, por lo que esta figura no representa la estructura del rodal completo. El conjunto de árboles analizado presenta una estructura mixta con árboles distribuidos dentro de las distintas clases diamétricas. Las clases diamétricas con más frecuencia de árboles es la de 55-59 y la de 75-79, mientras que las clases diamétricas de los extremos están menos representadas, lo que indica una elección intencionada hacia los árboles jóvenes. Por otro lado, la altura promedio aumenta progresivamente hasta la clase 55-59, donde alcanza su punto máximo y que disminuye hacia las clases más altas. Esto se debe a que algunos árboles de mayor diámetro tienen mayor edad, pero no son necesariamente más altos. Finalmente, el área basal total también aumenta en la clase 55-59, lo que se relaciona con el mayor número de individuos dentro de este rango.

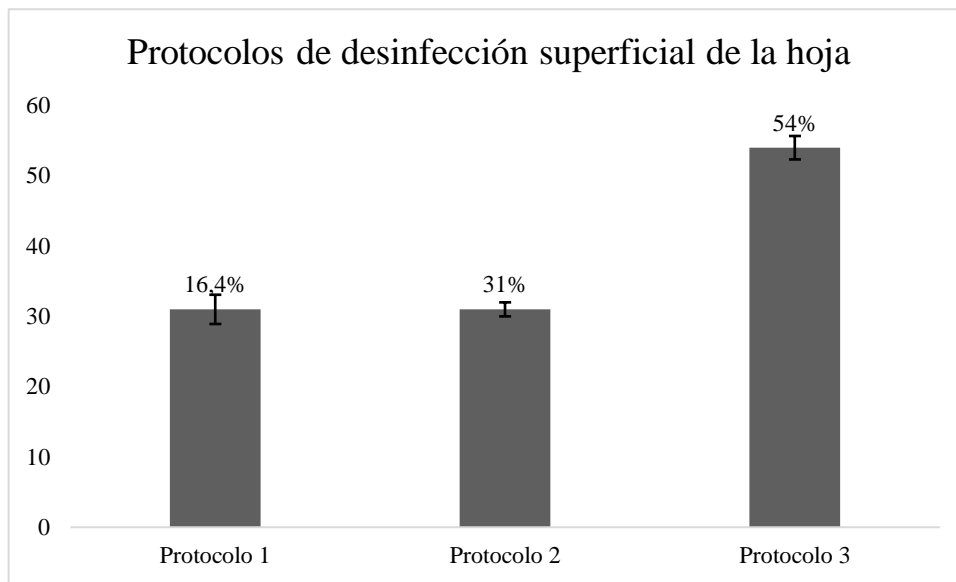


**Figura 4.** Estructura del rodal en el sector Puesco del PN Villarrica según clases diamétricas. Se presenta el número de árboles por clase, la altura promedio y el área basal total (m<sup>2</sup>).

### 3.2 Eficacia de tres protocolos de desinfección superficial

El análisis de la eficacia de los tres protocolos de desinfección superficial de hojas de *A. araucana* reveló diferencias en la cantidad de colonias de HE formadas (figura 5). Tras 15 días de incubación, el protocolo 1 mostró un total de 31 colonias que crecieron a partir de segmentos de hoja, con una desviación estándar de 2,08 y un porcentaje de colonización de 16,4%. Con el protocolo 2 crecieron un total de 31 colonias fúngica, con una desviación estándar de 1,00 y un porcentaje de colonización de 31%. Con el protocolo 3 crecieron 54 colonias fúngicas una desviación estándar de 1,67 y un porcentaje de colonización del 54%, siendo el protocolo que permitió el mayor crecimiento de colonias fúngicas y el que fue utilizado para el aislamiento de HE.

Aunque los protocolos 1 y 2 presentan el mismo número de colonias, sus porcentajes de colonización son diferentes. Esto se debe al mayor número de segmentos foliares considerados para el protocolo 1, en el cual se consideraron 500 segmentos sembrados (provenientes de 10 ramas), mientras que en los protocolos 2 y 3 solo se trabajó con dos árboles, equivalente a 100 segmentos en total. No obstante, para el protocolo 1 se consideraron los datos de los árboles utilizados en el protocolo 2 y 3, para así tener una comparación equitativa del número de colonias que creció en cada protocolo.



**Figura 5.** Resultado tras evaluar la eficacia de tres protocolos de desinfección superficial para las hojas de *A. araucana*.

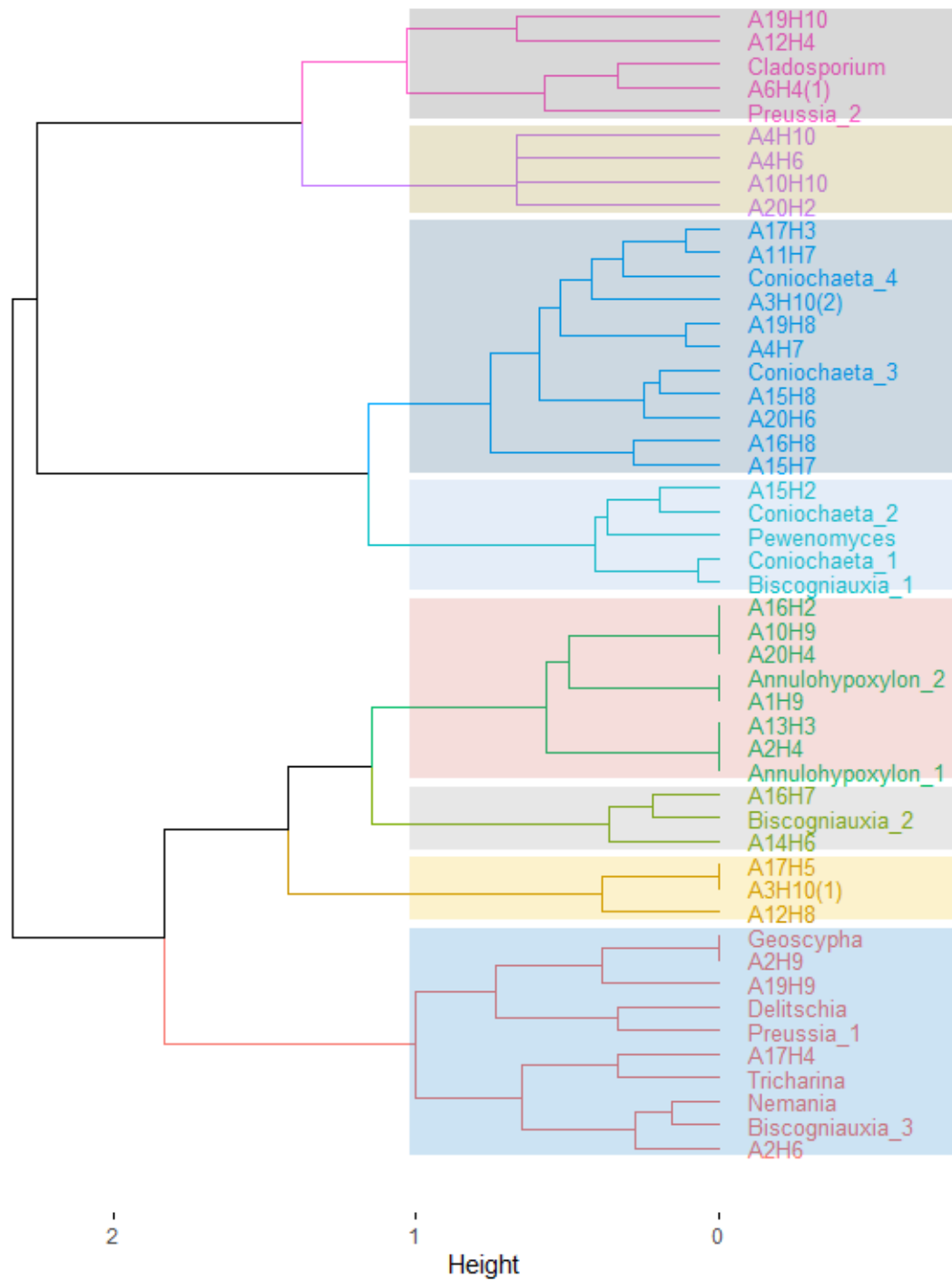
### 3.3 Caracterización macroscópica cepas aisladas de HE

Tras la aplicación del protocolo 3 de desinfección superficial, se obtuvieron un total de 115 colonias puras de hongos filamentosos a partir de los segmentos foliares sembrados. A partir de la observación y descripción de sus características macroscópicas (color anverso-reverso y textura) y con el objetivo de evitar redundancias y sobrerrepresentación de cepas similares, las colonias fueron agrupadas en 49 morfotipos preliminares (figura 6). Estos morfotipos fueron sometidos a un análisis jerárquico en base a sus características macroscópicas para seguir con el análisis microscópico de las cepas agrupadas (figura 7).



**Figura 6.** Diversidad morfológica macroscópica de 49 morfotipos (anverso) de hongos filamentosos cultivados en medio de PDA.

El agrupamiento jerárquico (figura 7) permitió definir ocho grupos diferenciados por las características macroscópicas de la colonia. Cepas del mismo género como *Annulohyphoxylon* se agruparon en el mismo cluster, mientras que otras del género *Coniochaeta* se agruparon en cluster distintos. Esto evidencia la variación de colores y texturas que se pueden observar en cepas de un mismo género. Así también, se observa un cluster que incluye seis géneros distintos tales como *Delitschia*, *Preussia*, *Nemania*, *Biscogniauxia*, *Geoscypha* y *Tricharina*, lo que también evidencia que distintos géneros pueden tener características macroscópicas similares.



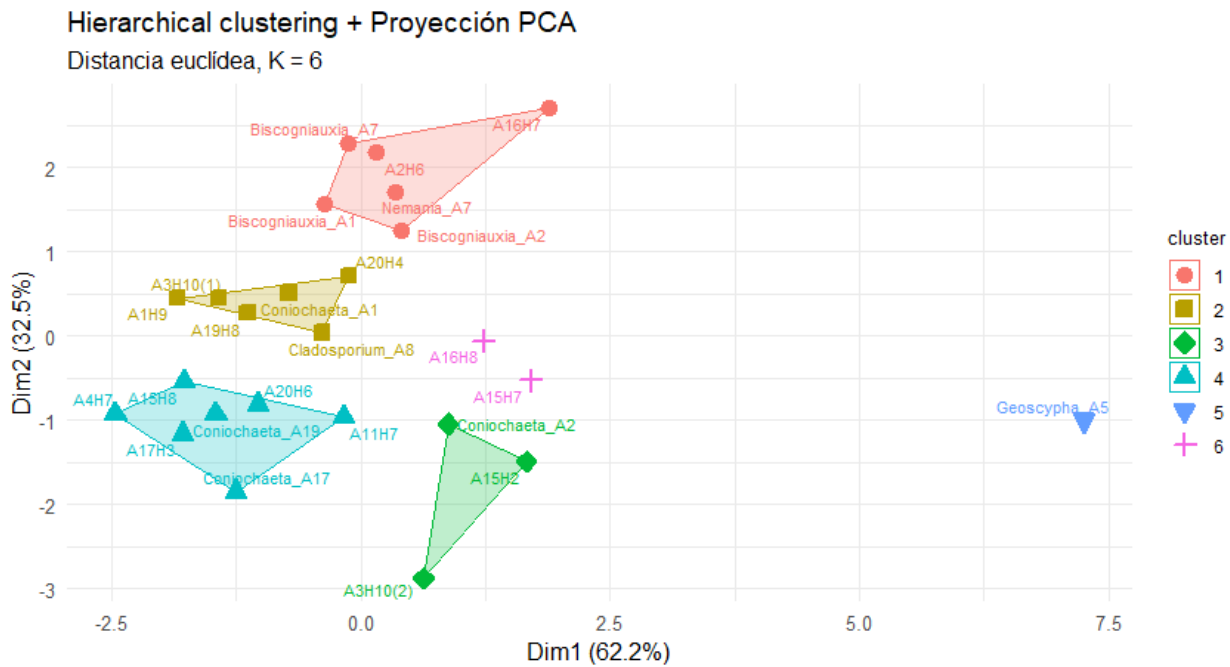
**Figura 7.** Dendrograma de agrupamiento jerárquico del total de cepas aisladas (n= 49) según características macroscópicas (color de anverso, reverso y textura). Realizado con distancia de Gower y método de Ward con K= 8.

### 3.4 Caracterización microscópica de cepas aisladas de HE

Las preparaciones microscópicas mostraron que 29 morfotipos presentaron estructuras reproductivas (conidióforos y conidias) que permitieron su diferenciación morfológica. Sin embargo, 20 morfotipos resultaron estériles, es decir, no presentaron estructuras reproductivas visibles que permitieran su caracterización taxonómica. Aunque con el análisis molecular se pudieron haber identificado estas cepas, estos aislamientos estériles no fueron considerados debido a que, al no presentar estructuras distintivas, no fue posible establecer previamente si correspondían a cepas diferentes o duplicados de otros morfotipos ya identificados. Con el fin de evitar redundancias en el análisis molecular y optimizar los recursos disponibles, se priorizaron aquellas cepas con estructuras reproductivas definidas.

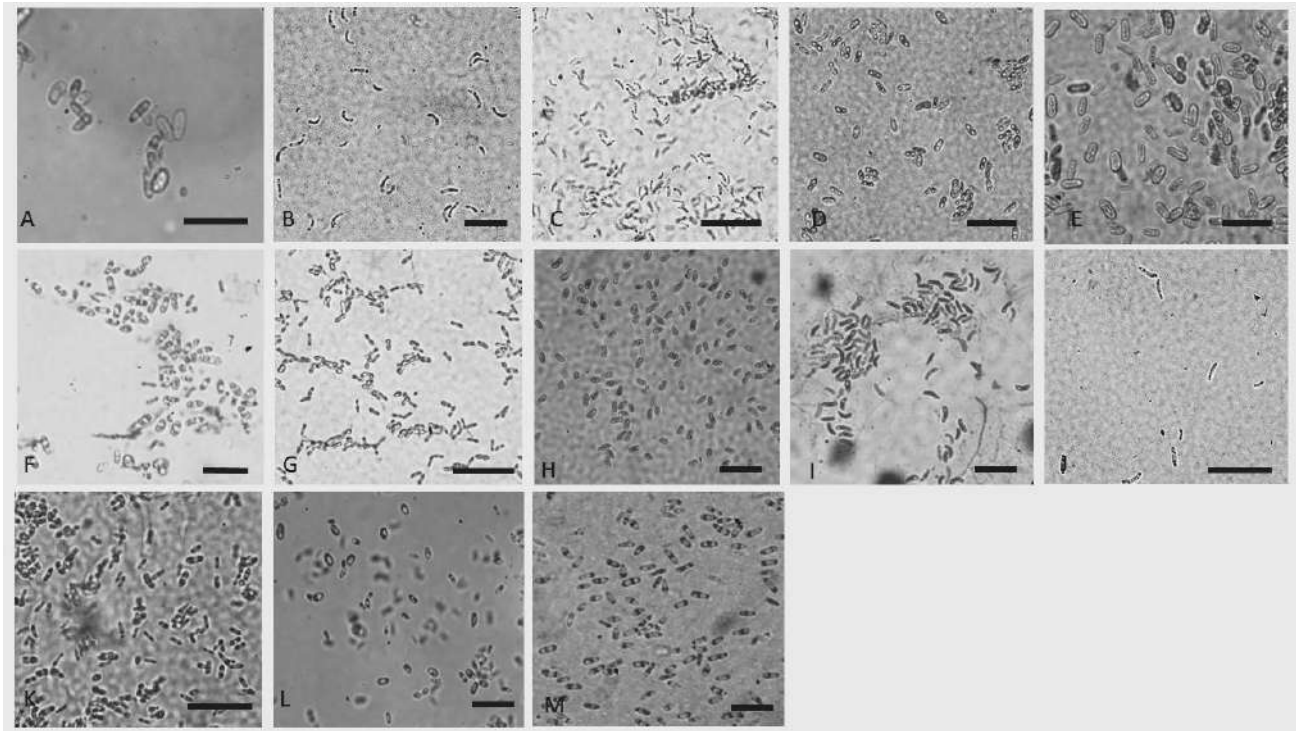
De los 29 morfotipos con estructuras reproductivas, 25 presentaron estructuras medibles de largo y ancho de conidia. Las medidas de estos morfotipos (largo mínimo, largo máximo, largo promedio, ancho mínimo, ancho máximo, ancho promedio) fueron sometidas a un Análisis de Componentes Principales (PCA) con el objetivo de visualizar agrupaciones de los morfotipos mediante similitudes de dichas medidas (figura 8).

Este análisis identificó seis agrupaciones que se diferencian entre sí, donde la Dim1 y Dim2 explican un 94,7% de la variación total. La Dim1 está explicada principalmente por el tamaño general de las conidias, ya que todas las variables de largo y ancho fueron positivas y similares entre sí (0,376–0,429). En contraste, la Dim2 está explicada por la forma de las conidias, puesto que los valores de largo son negativos (-0,364 a -0,409) y los valores de ancho son positivos (0,39–0,439), diferenciando así conidias más alargadas de aquellas más anchas.

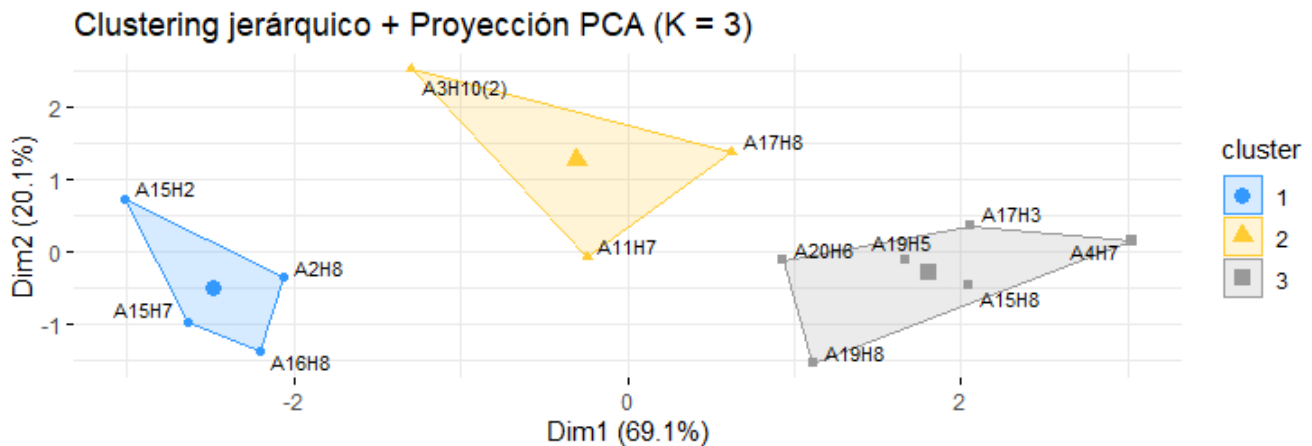


**Figura 8.** Análisis de componente principal con agrupamiento jerárquico de 25 morfotipos.

En contraste a este análisis, las cepas agrupadas dentro del clúster 3, 4 y 6, además de la cepa A19H8 agrupada en el clúster 2, presentaron características similares en cuanto a la textura y color de la colonia (textura predominantemente lisa y colores pálidos como beige, en algunos casos anaranjado), así como en la forma de las conidias, donde predominaba la forma elipsoidal a cilíndrica (figura 9). En base a las características de conidias, el grupo (n=13) fue sometido a un PCA con el objetivo de seleccionar cepas representativas de este grupo para el posterior análisis molecular (figura 10).



**Figura 9.** Conidias del conjunto. A. A2H8. B. A3H10. C. A4H7. D. A11H7. E. A15H2. F. A15H7. G. A15H8. H. A16H8. I. A17H3. J. A17H8. K. A19H5. L. A19H8. M. A20H6. Barras de escala = 10  $\mu$ m.



**Figura 10.** Análisis de componentes principales (PCA) para el grupo G1 (n=13).

Mediante el análisis realizado por el PCA combinado con un agrupamiento jerárquico, se identificaron tres grupos definidos entre las cepas analizadas del grupo. El clúster 1 agrupó a las cepas A15H2, A15H7, A16H8 y A2H8, siendo esta última la seleccionada como representante. El clúster 2 lo conformó las cepas A3H10(2), A11H7 y A17H8, siendo esta cepa la representante del subgrupo. Por otro lado, el clúster 3 agrupó a las cepas A15H8, A17H3, A19H5, A19H8 y A20H6, siendo la cepa A19H5 la representante del grupo (figura 10).

Por otro lado, la Dim1 está principalmente explicada por el tamaño general de las conidias puesto que las variables de largo y ancho tienen valores altos y negativos (-0,445 a -0,284). La Dim2 está explicada por la forma de la conidia, donde se observaron valores positivos para la variable de largo (0,358-0,409) y valores negativos para la variable de ancho (-0,660 a -0,411).

### 3.5 Análisis molecular

Como resultado del proceso de agrupación mediante análisis PCA, se seleccionaron 20 cepas representativas, en las que se incluyen las cepas agrupadas por PCA (figura 7) que si presentaron estructuras reproductivas visibles que permitieron su diferenciación, además de las tres cepas representantes del grupo n=13 con características morfológicas similares. Las 20 cepas fueron utilizadas para la extracción de ADN y posterior análisis molecular (figura 11).



**Figura 11.** Cepas seleccionadas para el análisis molecular. Lado izquierdo muestra el anverso y el lado derecho muestra el reverso de la colonia cultivada en medio PDA. Entre paréntesis se indica el código de cepa utilizado para la realización de PCR y posterior secuenciación.

### 3.5.1 Identificación de géneros mediante marcadores moleculares

La mayoría de las cepas presentó concentraciones superiores a 20 ng/μL, siendo consideradas aptas para amplificación por PCR, a excepción de la cepa A9H3 (19,3 ng/μL) y la cepa A20H4 (5,4 ng/μL) que, aunque su concentración de ADN fue menor, de igual forma se utilizaron para el PCR. (anexo 3).

Se realizó la amplificación en la región LSU utilizando los partidores LR0R y LR5. Solo la cepa P3 amplificó con doble banda por lo que no se realizó su secuenciación (anexo 5).

Finalmente, se realizó la secuenciación de 19 cepas fúngicas. En el caso de las cepas P17 y P22, amplificadas en la región ITS con los partidores ITS4 e ITS5, la baja calidad de las secuencias obtenidas impidió realizar una comparación confiable en BLAST, por lo que no fue posible asignarles una identidad taxonómica.

Se obtuvieron secuencias de calidad para un total de 17 cepas fúngicas (cuadro 1). Las cepas analizadas se distribuyeron en 6 órdenes diferentes: Xylariales, Coniochaetales, Pleosporales, Pezizales, Capnodiales y Diaporthales, abarcando familias como Graphostromataceae, Coniochaetaceae, Hypoxylaceae, Spormoriaceae, Delitschiaceae, Pezizaceae, entre otras. De las 17 cepas analizadas, 2 fueron identificadas a nivel de especie (*Geoscypha tenacella* y *Pewenomyces kutranfy*) mientras que las 15 restantes fueron identificadas a nivel de género (*Bisconiauxia* sp., *Nemania* sp., *Annulohypoxylon* sp., *Coniochaeta* sp., *Preussia* sp., *Delitschia* sp., *Tricharina* sp. y *Cladosporium* sp.)

**Cuadro 1.** Identificación taxonómica de 19 cepas fúngicas mediante análisis BLAST de secuencias LSU. Se indican orden, familia, género o especie propuesta, y los valores de cobertura e identidad obtenidos.

Código muestra	Cepa	Orden	Familia	Especie	Covertura (%)	Identidad (%)
P1	A1H1	Xylariales	Graphostromataceae	<i>Biscogniauxia sp.1</i>	98%	99,07%
P5	A2H7	Xylariales	Graphostromataceae	<i>Biscogniauxia sp.2</i>	98%	99,10%
P11	A7H3	Xylariales	Graphostromataceae	<i>Biscogniauxia sp.3</i>	98%	98,96%
P12	A7H9	Xylariales	Xylariaceae	<i>Nemania sp.</i>	100%	98,62%
P16	A13H5	Xylariales	Hypoxylaceae	<i>Annulohypoxylon sp.1</i>	100%	98,84%
P19	A17H10	Xylariales	Hypoxylaceae	<i>Annulohypoxylon sp.2</i>	100%	99,05%
P2	A1H2	Coniochaetales	Coniochaetaceae	<i>Coniochaeta sp.1</i>	100%	99,60%
P6	A2H8	Coniochaetales	Coniochaetaceae	<i>Coniochaeta sp.2</i>	100%	99,08%
P22	A17H8	Coniochaetales	Coniochaetaceae	<i>Coniochaeta sp.3</i>	99%	100%
P21	A19H5	Coniochaetales	Coniochaetaceae	<i>Coniochaeta sp.4</i>	100%	99,74%
P7	A3H5	Pleosporales	Sporormiaceae	<i>Preussia sp.1</i>	100%	100%
P10	A6H4(2)	Pleosporales	Sporormiaceae	<i>Preussia sp.2</i>	100%	99,75%
P15	A10H2	Pleosporales	Delitschiaceae	<i>Delitschia sp.</i>	98%	98,57%
P9	A5H5	Pezizales	Pezizaceae	<i>Geoscypha tenacella</i>	100%	100%
P14	A9H3	Pezizales	Pyronemataceae	<i>Tricharina sp.</i>	100%	99,87%
P13	A8H10	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium sp.</i>	100%	99,87%
P20	A7H1	Diaporthales	Cryphonectriaceae	<i>Pewenomyces kutranfy</i>	100%	99,60%

En el cuadro 2 se presentan las matrices de comparación obtenidas mediante la comparación par a par de las secuencias de la region LSU, correspondientes a un mismo género. Los valores representan el porcentaje de identidad entre cada par de secuencias.

Para el género *Coniochaeta*, los valores de identidad variaron entre 91,1% y 96,3%, siendo la mayor similitud observada entre *Coniochaeta sp.2* y *Coniochaeta sp.4* con 96,2%. En el caso de *Biscogniauxia*, se registraron porcentajes de similitud más elevados que van desde 96,2% a 99%, obteniendo la similitud máxima entre *Biscogniauxia sp.2* y *Biscogniauxia sp.3*. Para el genero *Annulohypoxylon*, el porcentaje de similitud entre las dos cepas fue de 92,5% lo cual es menor a los porcentajes entre los demás géneros. Finalmente, para *Preussia*, el análisis mostró una similitud de 94,9% entre las cepas identificadas.

**Cuadro 2.** Matriz de comparación par a par con los respectivos porcentajes de identidad para géneros con más de un aislado. a) *Coniochaeta* sp., b) *Biscogniauxia* sp., c) *Annulohypoxyton* sp., d) *Preussia* sp.

a)	<i>Coniochaeta</i> sp.1	<i>Coniochaeta</i> sp.2	<i>Coniochaeta</i> sp.3	<i>Coniochaeta</i> sp.4
<i>Coniochaeta</i> sp.1		96,3	91,1	94,6
<i>Coniochaeta</i> sp.2			92,2	96,2
<i>Coniochaeta</i> sp.3				93,7
<i>Coniochaeta</i> sp.4				

b)	<i>Biscogniauxia</i> sp.1	<i>Biscogniauxia</i> sp.2	<i>Biscogniauxia</i> sp.3
<i>Biscogniauxia</i> sp.1		96,2	96,7
<i>Biscogniauxia</i> sp.2			99,0
<i>Biscogniauxia</i> sp.3			

c)	<i>Annulohypoxyton</i> sp.1	<i>Annulohypoxyton</i> sp.2
<i>Annulohypoxyton</i> sp.1		92,5
<i>Annulohypoxyton</i> sp.2		

d)	<i>Preussia</i> sp.1	<i>Preussia</i> sp.2
<i>Preussia</i> sp.1		94,9
<i>Preussia</i> sp.2		

### 3.6 Relación ecológica entre hongos y árboles hospederos

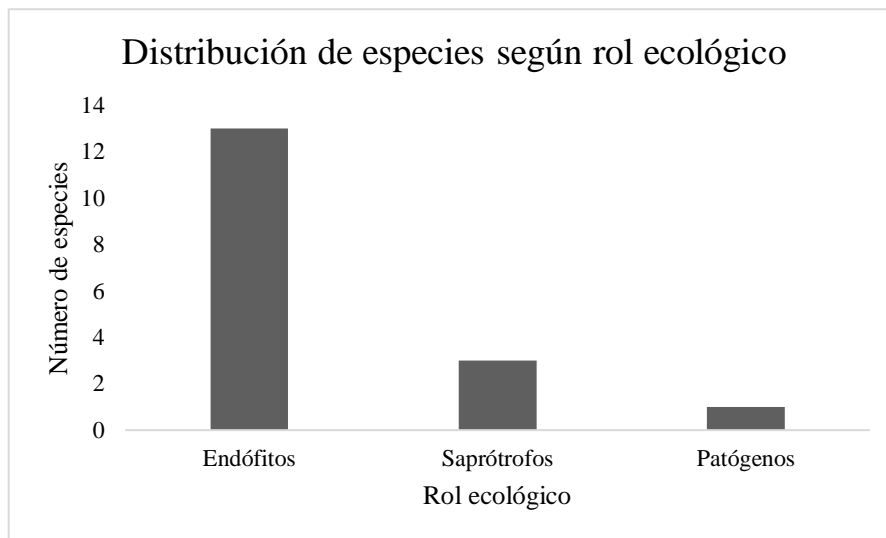
En el cuadro 3 se presenta la relación entre las cepas fúngicas identificadas, su rol ecológico y las características de los árboles desde los cuales fueron aisladas. Las asignaciones de rol ecológico se basaron en literatura especializada y registros previos, considerando funciones como endófito, saprótrofo, patógeno y patógeno potencial.

Los árboles hospederos presentaron una variación en DAP de 31 a 76 cm, en altura total de 4 a 13 m, y de afectación de la copa de 0% a 75% de daño. Se observó que hongos con roles endófitos se aislaron tanto de árboles sanos como con signos de daño, mientras que géneros con comportamiento de patógeno potencial o saprótrofo fueron frecuentes en individuos con estados sanitarios intermedios a deteriorados.

**Cuadro 3.** Características ecológicas, estructurales y taxonómicas de cepas fúngicas identificadas.

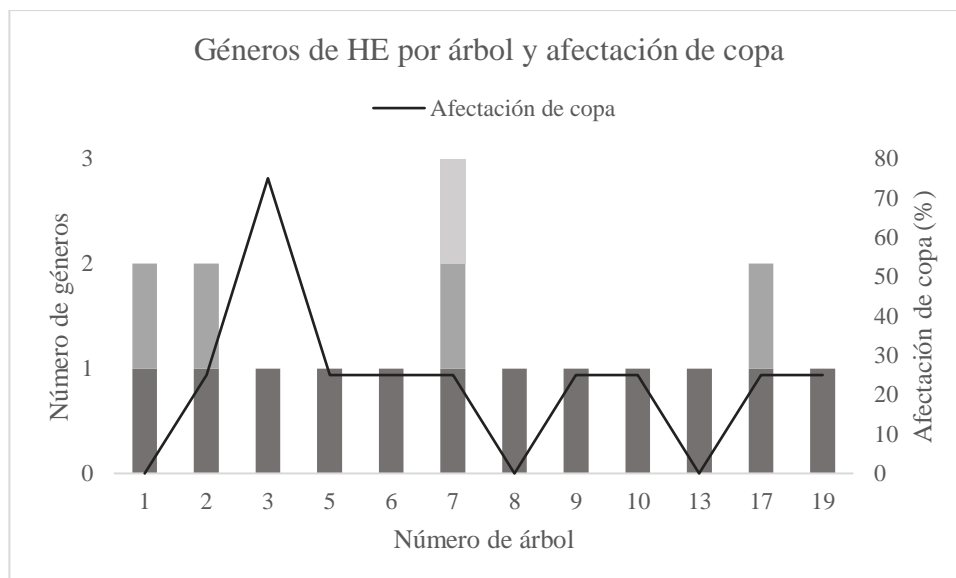
Cepa	Especie	Rol ecológico	N° de árbol	DAP(cm)	Altura (m)	Estado sanitario (%)
A1H1	<i>Biscogniauxia sp.1</i>	Endófito / Patógeno potencial	1	43	8	0
A2H7	<i>Biscogniauxia sp.2</i>	Endófito / Patógeno potencial	2	35	5	25
A7H3	<i>Biscogniauxia sp.3</i>	Endófito / Patógeno potencial	7	42	8	25
A7H9	<i>Nemania sp.</i>	Saprótrofo	7	42	8	25
A13H5	<i>Annulohypoxyton sp.1</i>	Endófito	13	73	13	0
A17H10	<i>Annulohypoxyton sp.2</i>	Endófito	17	75	7	25
A1H2	<i>Coniochaeta sp.1</i>	Endófito	1	43	8	0
A2H8	<i>Coniochaeta sp.2</i>	Endófito	2	35	5	25
A17H8	<i>Coniochaeta sp.3</i>	Endófito	17	75	7	25
A19H5	<i>Coniochaeta sp.4</i>	Endófito	19	76	6	25
A3H5	<i>Preussia sp.2</i>	Endófito / Saprótrofo	3	38	6	75
A6H4(2)	<i>Preussia sp.2</i>	Endófito / Saprótrofo	6	55	10	25
A10H2	<i>Delitschia sp.</i>	Saprótrofo	10	46	10	25
A5H5	<i>Geoscypha tenacella</i>	Endófito / Saprótrofo	5	31	4	25
A9H3	<i>Tricharina sp.</i>	Endófito	9	49	8	25
A8H10	<i>Cladosporium sp.</i>	Saprótrofo / Endófito	8	79	9	0
A7H1	<i>Pewenomyces kutranfy</i>	Patógeno	7	42	8	25

Del total de cepas identificadas a nivel molecular (17), la mayoría corresponde a endófitos estrictos o facultativo que bajo ciertas condiciones del hospedero pueden transformarse en patógenos potenciales (*Biscogniauxia sp.*), mientras que otros fueron clasificados como saprótrofos (*Nemania sp.*, *Delitschia sp.*), o incluso como patógenos confirmados, como *Pewenomyces kutranfy*. Algunas especies (como *Cladosporium sp.* o *Preussia sp.*) presentaron comportamientos intermedios, siendo consideradas endófitos o saprotrófos según el contexto (figura 12).



**Figura 12.** Distribución del número de especies fúngicas identificadas según su rol ecológico.

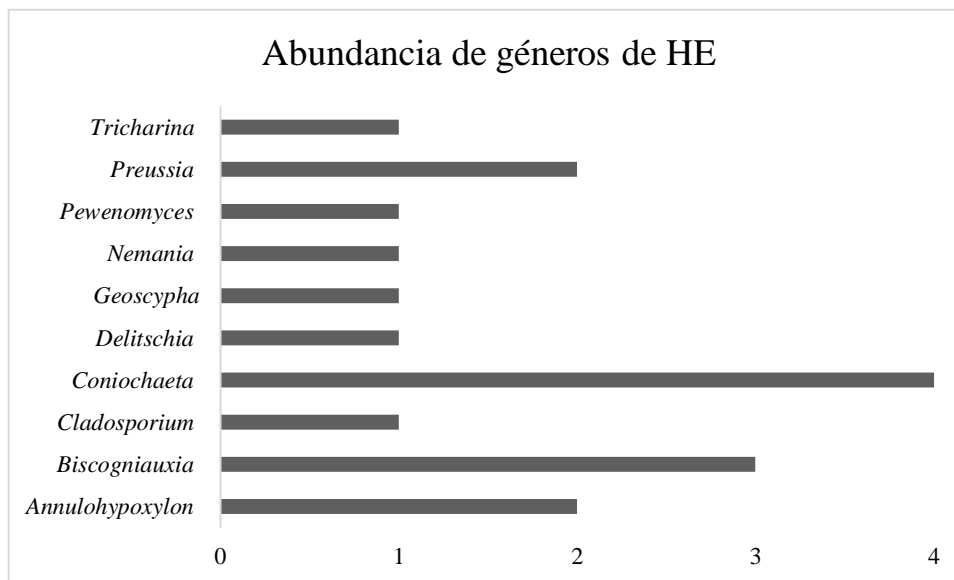
La figura 13 indica el número de géneros distintos identificados por cada árbol junto con el porcentaje de afectación de copa de cada uno. Se puede observar que no hay una relación clara entre la afectación de copa y el número de géneros de HE, como es en el caso del árbol 7 donde se observaron 3 géneros con una afectación de copa del 25%, así como en el árbol 1 y 17 que presentaron dos géneros, pero el porcentaje de afectación es de 0% y 25%, respectivamente.



**Figura 13.** Géneros de hongos endófitos por árbol y afectación de copa (%). Los colores diferentes de cada barra representan la cantidad de géneros aislados y la línea negra representa el nivel de afectación de copa por árbol.

### 3.7 Análisis de diversidad

Se identificaron un total de 10 géneros de HE foliares a partir de las cepas analizadas molecularmente. El género más frecuente fue *Coniochaeta*, con cuatro aislamientos, seguido de *Biscogniauxia* con tres. Los géneros *Preussia* y *Annulohypoxyton* estuvieron representados por dos aislamientos cada uno, mientras que los géneros *Tricharina*, *Pewenomyces*, *Nemania*, *Geoscypha*, *Delitschia* y *Cladosporium* presentaron un solo aislamiento (figura 14)



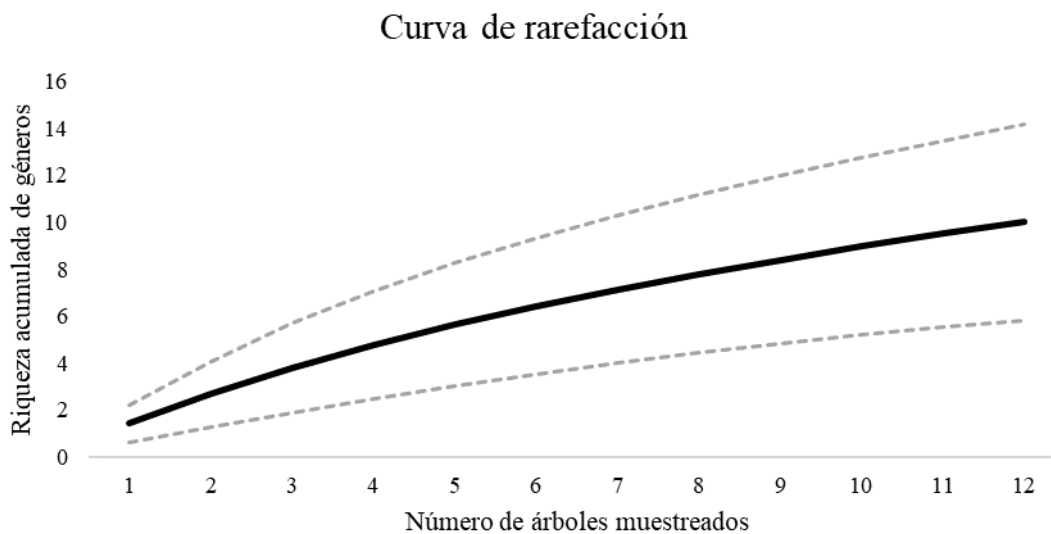
**Figura 14.** Frecuencia de géneros de hongos endófitos a partir de cepas identificadas mediante análisis molecular.

El cuadro 4 se indican los índices de diversidad de Shannon y Simpson, además de parámetros de riqueza, como la riqueza observada y el estimados de riqueza Chao 1 calculados para las 17 cepas identificadas molecularmente. El índice de Shannon fue de 2,15, lo que indica una diversidad moderada, mientras que el índice de Simpson arrojó un valor de 0,87, lo que sugiere que existe una baja dominancia de algún género sobre los demás. En cuanto a la riqueza observada, se observaron 10 géneros distintos, mientras que el estimador de Chao 1 indicó una riqueza esperada de 14,71 géneros, lo que sugiere la posibilidad de géneros no detectados en la identificación.

**Cuadro 4.** Índices de diversidad y estimadores de riqueza de géneros calculados para la comunidad de HE identificados.

	Índice	Valor
Diversidad	Shannon	2,15
	Simpson	0,87
Riqueza	Riqueza observada	10,00
	Chao 1	14,71

Por otro lado, la curva de rarefacción (figura 15) mostró un aumento progresivo en la riqueza de géneros de HE a medida que se incrementó el número de árboles muestreados. Aunque se observa que la curva comienza a estabilizarse, no se alcanza a un nivel estable claro, lo que sugiere que podrían detectarse nuevos géneros si se aumenta la identificación a la totalidad de árboles muestreados (20). Asimismo, los intervalos de confianza muestran un rango amplio, lo que indica una alta variabilidad en la estimación de la riqueza. Este resultado se condice con lo arrojado por el estimador de riqueza Chao 1.



**Figura 15.** Curva de rarefacción acumulada de HE por número de árboles muestreados. Líneas punteadas indican intervalo de confianza del 95%.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Protocolo de desinfección

Los resultados obtenidos mostraron diferencias entre los tres protocolos de desinfección superficial aplicados. El protocolo 3 fue el que permitió un mayor crecimiento de colonias fúngicas seguido por el protocolo 1 y 2. Si bien los protocolos 1 y 2 registraron el mismo número total de colonias, el porcentaje de colonización fue considerablemente menor en el protocolo 1. Esto se debe a que la diferencia de tamaño de la muestra del protocolo 1 fue mayor que el protocolo 2 y 3. Para hacer una comparación equitativa entre los tres protocolos, se consideró solo el subconjunto de segmentos provenientes de los mismos árboles utilizados en el protocolo 2 y 3. Por lo tanto, la misma cantidad de colonias fúngicas en los protocolos 1 y 2 podría deberse a que los árboles utilizados podrían haber tenido una mayor cantidad de endófitos o características foliares particulares, como hojas más delgadas o mayor contenido de humedad que facilitaron el crecimiento de colonias fúngicas en esos árboles en particular (González-Teuber *et al.* 2021).

Por otra parte, las diferencias observadas pueden deberse también a las características propias de cada protocolo de desinfección. El protocolo 3 tuvo condiciones de desinfección menos agresivas que el protocolo 1, especialmente por el menor tiempo de exposición al alcohol y a la ausencia de hipoclorito de sodio (NaOCl). Si bien el NaOCl es comúnmente usado por tener un amplio espectro antimicrobiano, su acción puede resultar agresiva sobre estructuras sensibles, como las membranas celulares y proteínas de hongos endófitos, afectando su sobrevivencia (Sahu *et al.* 2022). Por lo tanto, aunque el protocolo 1 puede haber sido eficaz para reducir microorganismos saprófitos, también pudo comprometer a los endófitos presentes en el interior del tejido foliar (Verma *et al.* 2011).

Por otro lado, aunque el protocolo 2 tuvo los mismos componentes que el protocolo 3 (alcohol al 70% y agua destilada), el tiempo de exposición a alcohol fue mayor, lo que también pudo afectar el crecimiento de colonias fúngicas. Esto coincide con lo señalado por Reissinger *et al.* (2001), quienes señalan que exposiciones prolongadas a agentes desinfectantes pueden afectar negativamente la viabilidad de los endófitos, sin necesariamente mejorar la eficacia de desinfección.

Estos resultados coinciden con los reportados por otros estudios (Schulz *et al.* 1993, Anjum y Chandra 2015, Davoudpour *et al.* 2020), los cuales concluyen que, si bien la mayoría de los métodos de desinfección son eficaces, no existe un protocolo universal que funcione de igual forma en todas las especies vegetales. Además, se destaca que la efectividad del aislamiento depende tanto de las

condiciones del protocolo como de las características propias de cada tejido, ya que las distintas estructuras foliares pueden reaccionar de manera muy diferente frente a los agentes desinfectantes.

#### 4.2 Caracterización morfológica de cepas de HE

Gran parte de este trabajo se basó en la observación de las características macroscópicas y microscópicas de cada colonia pura aislada. Este paso resulta importante cuando el objetivo es identificar las cepas mediante claves taxonómicas y se quiere evitar la repetición de cepas con características similares.

Aunque la identificación morfológica ha sido un método común para identificar hongos filamentosos, es importante señalar que presenta limitaciones para una correcta identificación, en especial cuando los cultivos son estériles (Strobel & Daisy 2003, Bhunjun *et al.* 2021). Esto se debe a que las cepas pueden cambiar su morfología dependiendo del medio de cultivo y las condiciones de incubación, como temperatura, luz o humedad (Fischer y Dott 2002, Sieber 2007). Además, las características morfológicas que se utilizan para diferenciar géneros o especies son sutiles, donde, por ejemplo, cepas de la misma especie pueden presentar variaciones morfológicas entre si (Senanayake *et al.* 2020).

En este contexto, se utilizó el Análisis de Componentes Principales (PCA) como una herramienta que permitió agrupar los 49 morfotipos en base a sus características morfológicas. Aunque este análisis permitió diferenciar 8 grupos con características macroscópicas similares dentro de cada uno, de igual forma mediante el análisis microscópico se realizó la observación detallada de cada morfotipo, puesto que en algunos casos cepas que presentaron características macroscópicas similares, presentaron forma y medida de conidias diferentes.

De los 49 morfotipos definidos, se seleccionaron 20 cepas representativas para su análisis molecular, resultando 17 cepas identificadas, las que se distribuyeron en 10 géneros pertenecientes a seis órdenes. Si bien en algunos casos las agrupaciones morfológicas coincidieron con las identificaciones moleculares, como en el caso del género *Coniochaeta* agrupado según color y textura de la colonia y forma de las conidias (figura 8), también se observaron diferencias. Por ejemplo, morfotipos distintos resultaron ser del mismo género, mientras que morfotipos similares correspondieron a géneros distintos como *Pewenomyces*, *Coniochaeta* y *Biscogniauxia*, agrupados inicialmente en un mismo grupo (figura 6).

Por lo anterior, el análisis morfológico inicial no siempre permite inferir con certeza la identificación taxonómica de las cepas, en especial cuando no se cuenta con la observación de estructuras reproductivas para hacer una diferenciación más detallada.

#### 4.3 Porcentaje de identidad de secuencias LSU entre aislamientos del mismo género

Los porcentajes de identidad obtenidos a partir de la comparación de secuencias LSU evidencian distintos niveles de similitud dentro de un mismo género. En *Coniochaeta*, los valores (91,1-96,3%) indican una relación cercana entre las cepas, pero con diferencias suficientes como para diferenciarlos a nivel de especie o diferentes variantes. De forma similar, las cepas de *Preussia* presentaron un valor de 94,9% de similitud, lo que refleja cercanía genética, pero con diferencias suficiente para diferenciarlas a nivel de especie.

En contraste, los valores obtenidos para *Biscogniauxia* (96,2-99%) muestran una mayor homogeneidad genética. El porcentaje mas alto se da entre *Biscogniauxia sp2.* y *Biscogniauxia sp.3.*, lo que sugiere que podrían corresponder a variantes intraespecíficas o incluso a un mismo taxon. Esto se condice con lo reportado en estudios anteriores donde se señala que la region LSU en algunos géneros de Xylariaceae presenta una alta conservación que dificulta la diferenciación precisa de especies (Smith *et al.* 2003, Stadler *et al.* 2014).

Por otro lado, las cepas de *Annulohypoxyton* mostraron un porcentaje de similitud de 92,5%, reflejando una diferencia marcada que permite diferenciarlos a nivel de especie. Este resultado concuerda con lo descrito para el género, donde las diferencias en LSU permiten separar especies dentro del mismo clado (Hsieh *et al.* 2005).

Estos resultados confirman que la region LSU es útil para identificar aislamientos a nivel de genero y en algunos casos discriminar entre especies dependiendo del nivel de similitud entre cepas. No obstante, para géneros con alta conservación de esta region es recomendable complementar con otros marcadores moleculares tales como ITS (Internal Transcribed Spacer), Btub ( $\beta$ -tubulina), Actina, 18S (Subunidad pequeña del ARN ribosomal), Rpb1 (Subunidad mayor de la ARN polimerasa II) o TEF1- $\alpha$  (factor de elongación de traducción 1-alfa), los cuales han mostrado mayor capacidad de identificación a nivel de especie (Schoch *et al.* 2012).

#### 4.4 Especies y géneros de HE aislados desde hojas de *A. araucana*

Los géneros y especies identificados en este estudio se distribuyen en seis ordenes diferentes, destacando el orden de los Xylariales con el mayor número de endófitos identificados (n= 6) distribuidos en 3 familias (Graphostromataceae, Xylariaceae e Hypoxylaceae). Luego le sigue el orden de los Coniochaetales (n=4) representado por una familia (Coniochaetaceae). Aunque en la actualidad no se encuentran estudios específicos de diversidad de HE en hojas de *A. araucana*, es posible establecer ciertas comparaciones con investigaciones realizadas en otras especies del género *Araucaria*. Por ejemplo, en Groff *et al.* (2024) sobre HE en *A. angustifolia*, el orden de los Xylariales también fue el más numeroso, aunque distribuido en dos familias (Hypoxylaceae y Xylariaceae). En contraste, en un estudio más antiguo sobre hongos endófitos en gimnospermas nativas de Chile (Hormazabal y Piontelli 2009) que incluyó a *A. araucana*, logró aislar solo dos HE, un ascomiceto no identificado y *Curvularia protuberata*. Aunque este resultado representa un aporte inicial, el bajo número de aislamientos limita la capacidad de caracterizar la diversidad de HE en la especie y dificulta la comparación con estudios más amplios.

Dentro del orden de los Xylariales, el género *Biscogniauxia* fue el más numeroso. Este género tiene una distribución mundial y se reconocen más de 50 taxones (Nugent *et al.* 2005). Ju *et al.* (1998) define las especies de este género como parasitas exclusivas de angiospermas dicotiledóneas, además las clasifica como saprófitas facultativas a patógenos oportunistas que invaden huéspedes débiles por la sequía, y que fructifican cuando el hospedero está altamente debilitado. Varias especies del género se han reportado en árboles con síntomas de enfermedad como *B. mediterránea* y *B. nummularia* generando canchros en *Quercus suber* (Nugent *et al.* 2005, Costa *et al.* 2020). No obstante, su clasificación como patógeno parece estar influenciado por factores ambientales, especialmente por el estrés hídrico (Vannini y Mugnozza 1991). Esto se condice con Nugent *et al.* (2005) donde se encontró que *B. nummularia* está ampliamente presente como endófito en hayas del sur de Inglaterra y algunas zonas de Gales.

El género *Nemania* y *Annulohypoxylon* pertenecen a la familia Xylariaceae y Hypoxylaceae, respectivamente, las cuales son conocidos por su actividad ligninolítica (Rogers 2000). Por un lado, *Nemania* comprende 37 especies, aunque hasta la actualidad se siguen reportando especies nuevas (Pi *et al.* 2021). Este género se caracteriza por ser saprotrofo de madera en descomposición y también se ha reportado como endófito en regiones tropicales, aunque su presencia es menos frecuente en regiones templadas (Suryanarayanan 2011, Okane *et al.* 2012). Por otro lado, el género *Annulohypoxylon* comprende 42 especies de las cuales algunas están asociadas a formación de canchros (Fournier y Lechat 2016). La mayoría de las especies del género están descritas en zonas tropicales y subtropicales, y están

comúnmente asociadas a madera muerta de dicotiledóneas (Ikeda *et al.* 2014), aunque también se han encontrado con frecuencia como endófitos en plantas con semilla (Li *et al.* 2016, Kuhnert *et al.* 2017).

El género *Coniochaeta* es un género diverso que incluye entre 50 y 120 especies (García *et al.* 2006) que pueden habitar una amplia gama de sustratos, incluyendo estiércol, madera, suelo, aguas residuales, líquenes y tejidos sanos, enfermos o senescentes de musgos, helechos, coníferas y angiospermas (Harrington *et al.* 2019). Así también, Arnold *et al.* (2021) afirman que endófitos de este género se encuentran con frecuencia en plantas y líquenes de regiones templadas y boreales. Sin embargo, también se ha reportado que especies del género son patógenos de hospederos leñosos (Damm *et al.* 2010, Szewczyk *et al.* 2017). No obstante, hay evidencia de que especies del género se han aislado de tejidos sanos (Casieri *et al.* 2009), por lo que se reafirma su rol principal como endófito.

El orden de los Pleosporales es uno de los más comunes en pastos y comprende una gran diversidad de endófitos radiculares de gramíneas (Zhang *et al.* 2012). Dentro de este orden se encuentran el género *Preussia* y *Delitschia*.

*Preussia* incluye especies que colonizan diversos sustratos como suelo, madera, materia vegetal en descomposición y estiércol, y que también han sido reportadas como hongos endófitos (Kruys & Wedin, 2009). Lo anterior se condice con otros estudios donde se han aislado especies endófitas del género (Arenal *et al.* 2007, Hoffman y Arnold 2008, Massimo *et al.* 2015) destacando su presencia en ambientes áridos, lo que podría contribuir a la tolerancia de las plantas hospedadoras frente a condiciones de estrés ambiental (Massimo *et al.* 2015, Gonzalez-Menendez *et al.* 2017, Sandberg *et al.* 2022). Este género también fue reportado por Groff *et al.* (2020) en *A. angustifolia*.

Por otro lado, el género *Delitschia* pertenece a la familia Delitschiaceae, la cual es monogénica, por lo que solo se incluye este género y un número reducido de especies (Zhang *et al.* 2012). Se clasifican como especies terrestres y saprobias que se encuentran sobre estiércol de herbívoros, madera envejecida y plantas (Hyde *et al.* 2013). Como se mencionó, el orden de los Pleosporales abarca una amplia diversidad de HE radiculares en gramíneas, lo cual se condice con lo encontrado en Pintye y Knapp (2021) donde *D. chaetomioides* fue aislado a partir de tejidos sanos de la gramínea *Festuca vaginata*, lo que sugiere que podrían considerarse un endófito radicular.

Dentro del orden de los Pezizales, se encuentran *Geoscypha* y *Tricharina*. *Geoscypha* pertenece a la familia Pezizaceae, la cual abarca una gran variedad de hábitats, por lo que puede desarrollarse sobre diferentes tipos de sustratos ya sea suelos alcalinos, arenosos, calizos, quemados, estiércol y madera. Su distribución comprende principalmente zonas templadas y ártico-alpinas, aunque también se han reportado en zonas tropicales. La mayoría de las especies de esta familia se consideran saprótrofas, pero

también podrían establecer asociaciones ectomicorrízicas (Hansen *et al.* 2001). En particular, *G. tenacella* se considera como una especie cabornícola, es decir, que crece preferentemente en sustratos carbonizados, ya sea suelo o madera quemada (Van Vooren *et al.* 2020).

Por otra parte, *Tricharina* es un género de hongos pirofílicos y comprende aproximadamente 21 especies (Aldemir *et al.* 2024). *Tricharina* se distribuye principalmente en regiones templadas, con numerosas especies registradas en Europa, América del Norte y Asia (Van Vooren *et al.* 2023). Las especies del género están bien adaptados a hábitats influenciados por el fuego gracias a sus estructuras reproductivas distintivas adaptadas a ambientes transitorios (Van Vooren *et al.* 2017).

El género *Cladosporium* tiene una distribución cosmopolita y se pueden encontrar en restos vegetales, fúngicos y otros desechos, así como también se pueden aislar con frecuencia desde el suelo, alimentos, pintura, textiles y otras materias orgánicas. También pueden colonizar lesiones foliares como invasores secundarios tras infecciones por hongos fitopatógenos (Bensch *et al.* 2012). Además, se han reportado especies del género como fitopatógenos (De Wit 2016, Cosseboom y Hu 2023). Así también se han reportado como endófito común (Hamayun *et al.* 2009, Wang *et al.* 2013, Yang *et al.* 2023).

El género *Pewenomyces* pertenece a la familia Coryneliaceae la cual alberga 9 géneros y 60 especies aproximadamente. Algunas de estas especies han sido descritas como patógenos forestales, como aquellas pertenecientes al género *Caliciopsis* tales como como *Caliciopsis moriondi* (Migliorini *et al.* 2020) y *Caliciopsis pinea* en *Pinus spp.*, *Caliciopsis pseudotsugae* en abeto de Douglas (*Pseudotsuga spp.*) y *Caliciopsis orientalis* en *Tsuga spp.* (Funk 1963). Además, dentro de este grupo se incluyen especies de *Hypsotheca*, tales como *Hypsotheca nigra* que causa agallas en ramitas de diferentes *Juniperus spp.* e *Hypsotheca pleomorpha* que causa chancros en diferentes especies de *Eucalyptus* (Pascoe *et al.* 2018).

El género *Pewenomyces* contiene cuatro especies: *P. kutranfy*, *P. lalenivora*, *P. tapulicola* y *P. kalosus* (Balocchi *et al.* 2021, 2022), la cuales fueron aisladas desde árboles de *A. araucana* en Chile y cuyo estilo de vida aun es incierto, pero probablemente correspondan a saprofitas y/o endófitas (Balocchi *et al.* 2022). En Balocchi *et al.* 2021 se describieron los síntomas y signos asociados a *P. kutranfy*, el principal causante de la enfermedad asociada al DFA. Esta enfermedad se manifiesta como un declive progresivo y muerte progresiva de las ramas, que afecta a arboles de todas las edades. El síntoma mas visible es la clorosis de las ramas enteras o parciales que ocurre de primavera a verano, seguido por la muerte y caída de las hojas. El principal signo son los canchros anilladores que se pueden observar en ramas moribundas, donde la infección comienza como pequeñas decoloraciones rojizas en la base de las

hojas, lo que provoca hinchazón del tejido y la exudación de resina. Finalmente, la infección avanza cuando el cancro anilla la rama, impidiendo el flujo de nutrientes produciendo la muerte de esta.

#### 4.5 Relación ecológica potencial de los géneros fúngicos aislados con el estado del hospedero

Se destaca la abundancia de géneros con rol ecológico de endófitos, los cuales podrían estar ayudando al hospedero a tolerar situaciones de estrés, como sequía o la presencia de patógenos. En esta línea, se encontraron géneros como *Geoscypha* y *Tricharina* (Pezizales) los cuales son capaces de vivir en ambientes post-incendio o en suelos con alto contenido de materia orgánica carbonizada. En González *et al.* 2005 determinaron un historial de incendios en bosques de *A. araucana* en el sector Quillehue, ubicado al sur del sector Puesco. Según este registro, el incendio más antiguo ocurrió en 1446 y el más reciente en 1990, lo que sugiere que la presencia de estos géneros como endófitos podría estar relacionada con la permanencia de un banco de esporas en el suelo debido a estos eventos o a una colonización oportunista debido a la acumulación de hojarasca seca o por ramas muertas. Estos géneros fueron aislados del árbol 5 y 8 cuyo estado sanitario de la copa fue de 25% y 0%, respectivamente, lo que refleja un grado menor de daño en el dosel y sugiere que estos individuos podrían estar generando microhábitats favorables para HE con preferencia por tejidos debilitados.

También se destaca la presencia de géneros cuyo rol principal se ha clasificado como coprófilo, es decir, que crecen sobre estiércol animal, pero que también actúan como saprótrofo. Dado el contexto de este estudio, no se consideró su rol como coprófilo sino como saprótrofo / endófito. Dentro de estos géneros se encuentra *Preussia* y *Delitschia* (Pleosporales), los cuales han sido reportados como endófitos en ambientes áridos, por lo que su presencia en *A. araucana* podría relacionarse con su capacidad de tolerar condiciones de estrés hídrico, como las registradas en gran parte de la distribución natural de la especie. En este estudio *P. intermedia* se aislado desde el árbol 3 con una afectación del estado sanitario de la copa del 75%, *Preussia sp.* del árbol 6 con una afectación del 25% y *Delitschia sp.* del árbol 9 con afectación de la copa del 25%, lo que sugiera que estos HE pueden estar presentes tanto en individuos sanos como debilitados.

Por otro lado, los géneros del orden Xylariales como *Biscogniauxia*, *Nemania* y *Annulohypoxyton*, estuvieron presentes en cinco árboles diferentes. Este orden se destaca por su capacidad lignolítica y su afinidad por tejidos leñosos debilitados. *Biscogniauxia sp.* fue aislado desde los árboles 1, 2 y 7, los cuales presentaron estados sanitarios de copa de 0%, 25% y 25% respectivamente, lo que sugiere una posible relación entre la presencia del hongo y el debilitamiento del hospedero.

*Nemania* sp. también fue aislado del árbol 7, reforzando esta tendencia. Por su parte, *Annulohyphoxylon* sp. se identificó en los árboles 10 y 13, con afectación de copa de 25% y 0% respectivamente. La presencia de estos hongos en árboles con signos de deterioro foliar apoya la hipótesis de que los Xylariales podrían estar actuando como endófitos latentes o patógenos oportunistas, sin embargo, se necesita más evidencia y más estudios a los árboles hospederos para considerar su rol principal.

Finalmente, *Pewenomyces kutranfy*, un género representado por especies recientemente descritas y que ha sido reportado como patógeno causante de canchros fue aislado del árbol 19, el cual presentó una afectación de la copa del 25% y no se observaron la presencia de canchros visibles al momento del muestreo. Esto podría indicar una fase latente del hongo o una colonización sin manifestación de síntomas y signos evidentes, sin embargo, dado que se trata de una especie recientemente descrita, es necesario continuar investigando su comportamiento ecológico y su rol dentro del hospedero.

#### 4.6 Diversidad y riqueza de géneros de HE

Se realizó un análisis exploratorio de diversidad basado en las frecuencias relativas de los géneros identificados a partir de las 17 cepas analizadas. Los valores obtenidos fueron de 2,15 para el índice de Shannon, 0,87 para el índice de Simpson y una estimación de riqueza de 14,71 géneros según el índice de Chao 1. Aunque estos valores demuestran que la comunidad tiene una diversidad moderada, así como baja dominancia de géneros, estos no necesariamente reflejan la diversidad real del ecosistema estudiado. Esto se debe a que las cepas utilizadas para su identificación molecular no fueron seleccionadas de forma aleatoria ni cuantitativa, sino que corresponden a una submuestra intencionada de morfotipos diferentes, con el objetivo de maximizar la diversidad observable. Además, se excluyeron las cepas estériles al no presentar estructuras reproductivas que permitieran su identificación precisa e incluirlas habría significado una asignación subjetiva. En esta línea, diversos autores han señalado (Prosser 2010, Shade *et al.* 2012) que aplicar índices de diversidad a datos que no reflejan la estructura real de la comunidad puede llevar a interpretaciones erróneas. Por lo tanto, estos resultados se deben considerar como una estimación referencial y no como una medida real de la diversidad endófito del ecosistema estudiado.

#### 4.7 Limitaciones del estudio y consideraciones futuras

Este estudio presentó diversas limitaciones que deben considerarse al interpretar los resultados. En primer lugar, un alto porcentaje de las cepas aisladas mostraron una baja esporulación, lo que dificultó su identificación morfológica a través de claves taxonómicas, especialmente considerando que la mayoría de los géneros identificados corresponden a fases teleomorfas. Solo una cepa desarrolló ascos observables, lo que ocurrió de forma accidental tras ser almacenada en condiciones de refrigeración.

En segundo lugar, la identificación molecular también presentó limitaciones. Por razones de tiempo y recursos, no fue posible extraer ADN al total de cepas aisladas, por lo que se realizó una agrupación previa en base a caracteres morfológicos. Esto implica que el número real de géneros o especies presentes podría estar subestimado. En esta línea, aunque la región molecular utilizada (LSU) permitió la identificación exitosa de todas las cepas a nivel de género, es necesario complementar con otras regiones genéticas más variables y confiables para ciertos grupos para poder identificar a nivel de especie.

En cuanto a consideraciones futuras, investigaciones futuras podrían ampliar el análisis hacia otros tejidos de la planta, como ramas, tronco y raíces, con el fin de obtener una visión más completa de la comunidad fúngica asociada a *A. araucana*. Además, se podrían incluir análisis metagenómicos para así obtener una caracterización más completa de la diversidad fúngica existente tanto a nivel taxonómico como funcional de la especie. También sería interesante incorporar ensayos funcionales, como confrontaciones in vitro entre los géneros endófitos aislados y patógenos conocidos como *P. kutranfy*, para así evaluar efectos antagonistas entre ambas cepas. De igual forma sería relevante considerar el efecto de la estacionalidad y variabilidad temporal en la composición de la comunidad endófito, lo que permitiría comprender mejor la dinámica ecológica de estas asociaciones a lo largo del año y en distintos contextos climáticos.

### 5. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio representan un avance para comprender la composición fúngica asociada a *A. araucana* en el sur de Chile. Estos resultados identificaron una comunidad de diez géneros distribuidos en seis órdenes y con variados roles ecológicos, como endófitos, saprotrófos y patógenos potenciales.

El protocolo 3 de desinfección superficial resultó ser el más eficiente para aislar un mayor número de colonias fúngicas. La evaluación y comparación de los tres protocolos permitió seleccionar el método más adecuado para las hojas de *A. araucana*, lo que favoreció un aislamiento efectivo de colonias de HE, disminuyendo el crecimiento de microorganismos saprofitos.

El análisis morfológico y molecular permitieron identificar diez géneros, los cuales que tras una revisión bibliográfica se determinó que géneros como *Geoscypha*, *Tricharina*, *Preussia* pueden adaptarse a condiciones de estrés ambiental como sequía o descomposición de materia orgánica, así como la capacidad de colonizar en ambientes carbonizados. Esto podría impactar positivamente en los individuos, ayudándolos a enfrentar condiciones adversas tanto bióticas como abióticas especialmente en el contexto de cambio climático.

En esta misma línea, la comparación entre el análisis morfológico y la identificación molecular reveló coincidencias y diferencias. Mientras que el análisis morfológico inicial permitió una agrupación preliminar de las 49 cepas, la identificación molecular indicó que algunos morfotipos similares corresponden a géneros distintos y morfotipos distintos pueden corresponder al mismo género.

Aunque el análisis de diversidad reveló una diversidad moderada de la comunidad, estos resultados deben ser interpretados con precaución debido a que la exclusión de cepas estériles y la selección intencionada de morfotipos con estructuras reproductivas limitan la posibilidad de hacer inferencias robustas sobre la comunidad fúngica total asociada a *A. araucana*.

En general, el número de géneros encontrados por árbol no parece tener relación directa con el estado sanitario de cada uno. Sin embargo, es posible que la presencia de cada género en particular esté influenciada por condiciones específicas de cada árbol (edad, daño mecánico, estrés, exposición, etc.), por lo que es necesario revisar caso a caso considerando tanto las características del árbol como del género presente.

Finalmente, estos resultados refuerzan la necesidad de seguir investigando la diversidad y dinámica funcional de hongos endófitos, en especial a los asociados a especies nativas de Chile, con el objetivo de conocer su potencial como agentes protectores o generadores de enfermedad.

## 6. REFERENCIAS

- Aldemir Terman Ş, Akçay M, Dizkirci A. 2024. Expanding the *Tricharina* Diversity in Türkiye: The Identification of *Tricharina cretea* from Nemrut Mountain. *The Journal of Fungus* 15: 29–36.
- Anjum N, Chandra R. 2015. Endophytic bacteria: Optimization of isolation procedure from various medicinal plants and their preliminary characterization. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 8(4): 233–236.
- Arenal F, Platas G, Peláez F. 2007. A new endophytic species of *Preussia* (Sporormiaceae) inferred from morphological observations and molecular phylogenetic analysis. *Fungal Diversity* 25: 1-17.
- Arnold A, Harrington A, U'Ren J, Oita S, Inderbitzin P. 2021. Two new endophytic species enrich the *Coniochaeta endophytica* / *C. prunicola* clade: *Coniochaeta lutea* sp. nov. and *C. palaoa* sp. nov. *Plant and Fungal Systematics* 66(1): 66–78.
- Arnold A, Henk D, Eells R, Lutzoni F, Vilgalys R. 2007. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia* 99(2): 185-206.
- Arnold A. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: Progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 21(2–3): 51-66.
- Balocchi F, Marincowitz S, Wingfield M, Ahumada R, Barnes I. 2022. Three new species of *Pewenomyces* (Coryneliaceae) from *Araucaria araucana* in Chile. *Mycological Progress* 21:92
- Balocchi F, Wingfield M, Ahumada R, Barnes I. 2021. *Pewenomyces kutranfy* gen. nov. et sp. nov. causal agent of an important canker disease on *Araucaria araucana* in Chile. *Plant Pathology* 70(6):1245–1254.
- Balocchi F. 2022. *Araucaria (Araucaria araucana)* canker disease in Chile: etiology and fungal diversity. Tesis doctoral. Pretoria, Sudáfrica. Facultad de Ciencias Naturales y Agrícolas, Universidad de Pretoria. 140 p.
- Barnett H, Hunter B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. *Semantics and Word Formation* 4th. 218 p.

- Bekessy S, Allnutt T, Premoli A, Lara A, Ennos R, Burgman M, Cortés M, Newton A. 2002. Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. *Heredity* 88: 243–249.
- Bensch K, Braun U, Groenewald J, Crous P. 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 72:1–401.
- Besoain X, Guajardo J, Camps R. 2017. First report of *Diplodia mutila* causing gummy canker in *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch in Chile. *Plant Disease* 101(7).
- Bhunjun C, Phillips A, Jayawardena R, Promputtha I, Hyde K. 2021. Importance of molecular data to identify fungal plant pathogens and guidelines for pathogenicity testing based on Koch’s postulates. *Pathogens* 10(9):1096
- Casieri L, Hofstetter V, Viret O, Gindro K. 2009. Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 73–83.
- Chao A. 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11(4): 265-270.
- CONAF (Corporación Nacional Forestal). 2013. Plan de Manejo del Parque Nacional Villarrica: Segunda edición. Temuco, Chile: CONAF, Departamento Áreas Silvestres Protegidas, Región de La Araucanía.
- CONAF (Corporación Nacional Forestal). 2018. Proyecto Araucaria. Consultado 10 may. 2025. Disponible en: <https://www.conaf.cl/manejo-de-ecosistemas/gestion-forestal-suelos-y-agua/sanidad-forestal/proyecto-araucaria/>
- Cosseboom S, Hu M. 2023. Identification and pathogenicity of *Cladosporium*, *Fusarium*, and *Diaporthe* spp. associated with late-season bunch rots of grape. *Plant Disease*. 107(12):2929–2934
- Costa D, Tavares R, Baptista P, Lino-Neto T. 2020. Cork oak endophytic fungi as potential biocontrol agents against *Biscogniauxia mediterranea* and *Diplodia corticola*. *Journal of Fungi* 6(4): 287.
- Damm U, Fourie P, Crous P. 2010. *Coniochaeta* (Lecythophora), *Collophora* gen. nov. and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of *Prunus* trees. *Persoonia* 24: 60–80.
- Davoudpour Y, Schmidt M, Calabrese F, Richnow H, Musat N. 2020. High resolution microscopy to evaluate the efficiency of surface sterilization of *Zea mays* seeds. *Plos one* 15(11).

- De Wit P. 2016. *Cladosporium fulvum* effectors: Weapons in the arms race with tomato. *Annual Review of Phytopathology* 54:1–23.
- Díaz-Valenzuela C, Deramond-Galvez C, Machuca Á, Chávez D. 2024. Actividad promotora del crecimiento vegetal de cuatro hongos endófitos aislados desde *Araucaria araucana*. *Siembra* 11(2).
- Donoso C. 1981. Tipos forestales de los bosques nativos de Chile. Santiago, Chile: Proyecto CONAF/PNUD/FAO.
- Donoso C. 1993. Bosques templados de Chile y Argentina. Variación, estructura y dinámica. *Ecología forestal*. Santiago, Chile. Editorial Universitaria.
- Fischer G, Dott W. 2002. Quality assurance and good laboratory practice in the mycological laboratory – compilation of basic techniques for the identification of fungi. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 205(6):433–442.
- Fournier J, Lechat C, Courtecuisse R. 2016. The genus *Annulohyphoxylon* (Xylariaceae) in Guadeloupe and Martinique (French West Indies). *Ascomycete.org* 8(4): 127–156.
- Funk A. 1963. Studies in the genus *Caliciopsis*. *Canadian Journal of Botany*, 41, 503–543.
- Gao F, Dai C, Liu X. 2010. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 4(13):1346–1351.
- García D, Stchigel A, Cano J, Caldusch M, Hawksworth D, Guarro J. 2006. Molecular phylogeny of Coniochaetales. *Mycological Research* 110(11): 1271–1289.
- González M y Veblen T. 2007. Incendios en bosques de *Araucaria araucana* y consideraciones ecológicas al madereo de aprovechamiento en áreas recientemente quemadas. *Revista Chilena de Historia Natural* 80(2):243–253.
- González M, Cortés M, Izquierdo F, Gallo L, Echeverría C, Bekkesy S, Montaldo P. 2006. *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch. En: Donoso C. (Ed.). Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Autoecología. Valdivia, Chile. Ediciones Marisa Cuneo. p. 36-53.
- González M, Veblen T, Sibold J. 2005. Fire history of *Araucaria-Nothofagus* forests in Villarrica National Park, Chile. *Journal of Biogeography* (32): 1187-1202
- Gonzalez-Menendez V, Martin J, Siles J, Gonzalez-Tejero M, Reyes F, Platas G, Tormo J, Genilloud O. 2017. Biodiversity and chemotaxonomy of *Preussia* isolates from the Iberian Peninsula. *Mycological Progress* 16: 713–728.

- González-Teuber M, Palma-Onetto V, Aguilera-Sammaritano J, Mithöfer A. 2021. Roles of leaf functional traits in fungal endophyte colonization: Potential implications for host–pathogen interactions. *Journal of Ecology* 109(8), 3234–3246.
- Groff D, Marmentini J, Gaglioti A, Da Silva P, Knob A. 2024. Endophytic fungi associated with *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 96(1): 11.
- Hamayun M, Khan S, Ahmad N, Tang D, Kang S, Na C, Sohn E, Hwang Y, Shin D, Lee B, Kim J, Lee I. 2009. *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25:627–632
- Hansen K, Laessle T, Pfister D. 2001. Phylogenetics of the Pezizaceae, with an emphasis on *Peziza*. *Mycologia* 93(5):958–990.
- Harrington A, Del Olmo-Ruiz M, U'Ren J, Garcia K, Pignatta D, Wespe N, Sandberg D, Huang Y, Hoffman M, Arnold A. 2019. *Coniochaeta endophytica* sp. nov., a foliar endophyte associated with healthy photosynthetic tissue of *Platycladus orientalis* (Cupressaceae). *Plant and Fungal Systematics* 64: 65–79.
- Hoffman M, Arnold A. 2008. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research* 112(3): 331–344.
- Hormazabal E, Piontelli E. 2009. Endophytic fungi from Chilean native gymnosperms: antimicrobial activity against human and phytopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(5): 813–819.
- Hsieh H, Ju Y, Rogers J. 2005. Molecular phylogeny of *Hypoxylon* and closely related genera. *Mycologia* 97(4): 844-65.
- Hyde K, Jones E, Liu J, Ariyawansa H, Boehm E, Boonmee S, Braun U, Chomnunti P, Crous P, Dai D, et al. 2013. Families of Dothideomycetes. *Fungal Diversity* 63: 1–313.
- Ikeda A, Matsuoka S, Masuya H, Mori A, Hirose D, Osono T. 2014. Comparison of the diversity, composition, and host recurrence of xylariaceous endophytes in subtropical, cool temperate, and subboreal regions in Japan. *Population Ecology* 56(2): 289–300.
- Ju Y, Rogers J, San Martín F, Granmo A. 1998. The genus *Biscogniauxia*. *Mycotaxon* 66: 1-98
- Kaufman L, Rousseeuw P. 1990. Finding groups in data: An introduction to cluster analysis. New York, United States. John Wiley & Sons. 342 p

- Kruys A, Wedin M. 2009. Phylogenetic relationships and an assessment of traditionally used taxonomic characters in the Sporormiaceae (Pleosporales, Dothideomycetes, Ascomycota), utilising multi-gene phylogenies. *Systematics and Biodiversity* 7(4): 465–478.
- Kuhnert E, Sir E, Lambert C, Hyde K, Hladki A, Romero A, Rohde M, Stadler M. 2017. Phylogenetic and chemotaxonomic resolution of the genus *Annulohyphoxylon* (Xylariaceae) including four new species. *Fungal Diversity* 85: 1–43.
- Legendre P, Legendre L. 1998. *Numerical Ecology* (2nd English ed.). Amsterdam, Netherlands. Elsevier. 853 p.
- Li W, Lee C, Bang S, Ma J, Kim S, Koh Y, Shim S. 2016. Isochromans and related constituents from the endophytic fungus *Annulohyphoxylon truncatum* of *Zizania caduciflora* and their anti-inflammatory effects. *Journal of Natural Products* 80(1): 1–6.
- Lizana A. 2009. *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch: Un recurso promisorio. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Fundación para la Innovación Agraria (FIA).
- López-Lastra C, Hajek A, Humber R. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany* 80: 1126-1130.
- Luebert F, Pliscoff P. 2017. Sinopsis bioclimática y vegetacional de Chile. Santiago: 2da. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/62340>
- Magurran A. 2004. Measuring biological diversity. Oxford, United Kingdom. Blackwell Publishing. 256 p.
- Massimo N, Devan M, Arendt K, Wilch M, Riddle J, Furr S, Steen C, U'Ren J, Sandberg D, Arnold A. 2015. Fungal endophytes in above-ground tissues of desert plants: infrequent in culture, but highly diverse and distinctive symbionts. *Microbial Ecology* 70(1): 61–76.
- Medina N, Vidal P, Cifuentes R, Torralba J, Keusch F. 2018. Evaluación del estado sanitario de individuos de *Araucaria araucana* a través de imágenes hiperespectrales. *Revista de Teledetección* 52:41–53.
- MINAGRI (Ministerio de Agricultura de Chile). 1990. Decreto Supremo 43 declara monumento natural a la *Araucaria araucana*.
- MMA (Ministerio de Medio Ambiente de Chile). 2018. Decreto Supremo 79 aprueba y oficializa clasificación de especies según estado de conservación, decimocuarto proceso.

- Migliorini D, Luchi N, Peperi AL, Pecori F, Aglietti C, Maccioni F, Munck I, Wyka S, Broders K, Wingfield MJ, Santini A. 2020. *Caliciopsis moriondi*, a new species for a fungus long confused with the pine pathogen *C. pinea*. *MycKeys* 73:87–108.
- Montaldo P. 1974. La bio-ecología de *Araucaria araucana* (Mol) Koch. *Boletín del Instituto Forestal Latino-Americano de Investigación y Capacitación*. 46-48: 3-55
- Moraga-Suazo P, Opazo A, Zaldúa S, González G, y Sanfuentes E. 2011. Evaluation of *Trichoderma spp.* and *Clonostachys spp.* strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71: 412-417.
- Moreno C, Barragán F, Pineda E, Pavón N. 2011. Reanálisis de la diversidad alfa: alternativas para interpretar y comparar información sobre comunidades ecológicas. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82(4): 1249-1261
- Muñoz R. 1984. Análisis de la productividad de semillas de *Araucaria araucana* (Mol.) C. Koch, en el Área de Lonquimay - IX Región. Tesis para optar al Título de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Agrarias, Veterinarias y Forestales. Escuela de Ciencias Forestales, Universidad de Chile
- Nugent L, Sihanonth P, Thienhirun S, Whalley A. 2005. *Biscogniauxia*: a genus of latent invaders. *Mycologist* 19(1): 24–28.
- Okane I, Srikitikulchai P, Tabuchi Y, Sivichai S, Nakagiri A. 2012. Recognition and characterization of four Thai xylariaceous fungi inhabiting various tropical foliages as endophytes by DNA sequences and host plant preference. *Mycoscience* 53(2): 122–132.
- Oksanen J, Blanchet F, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin P, O'Hara R, Simpson G, Solymos P, Stevens H, Szoecs E, Wagner H. 2022. *vegan: Community Ecology Package* (Version 2.6-4). [Software].
- Pascoe I, Smith I, Dinh S, Edwards J. 2018. *Caliciopsis pleomorpha* sp. nov. (Ascomycota: Coryneliales) causing a severe canker disease of *Eucalyptus cladocalyx* and other eucalypt species in Australia. *Fungal Systematics and Evolution* 2:45–56
- Pi Y, Long S, Wu Y, Liu L, Lin Y, De Long Q, Kang J, Kang Y, Chang C, Shen X C, Wijayawardene N, Zhang X, Li Q. 2021. A taxonomic study of *Nemania* from China, with six new species. *MycKeys* 83: 39–67.

- Pintye A, Knapp D. 2021. Two pleosporalean root-colonizing fungi, *Fuscospheeria hungarica* gen. et sp. nov. and *Delitschia chaetomioides*, from a semiarid grassland in Hungary. *Mycological Progress* 20: 39–50.
- Pitt J, Hocking A. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3ª edición. New York, United States. Springer. 519 p.
- Prosser J. 2010. Replicate or lie. *Environmental Microbiology* 12(7): 1806–1810.
- Reissinger A, Vilich V, Sikora RA. 2001. Detection of fungi in planta: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological research* 105: 563–6.
- Rodriguez R, White J, Arnold A, Redman R. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182(2): 314–330.
- Rogers J. 2000. Thoughts and musings on tropical Xylariaceae. *Mycological Research* 104(12): 1412–1420.
- SAG (Servicio Agrícola y Ganadero). 2021. Vigilancia *Araucaria araucana*. Consultado 10 may. 2025. Disponible en: <https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/vigilancia-araucaria-araucana>
- Sahu P, Tilgam J, Mishra S, Hamid S, Gupta A, Jayalakshmi K, Verma S, Kharwar R. 2022. Surface sterilization for isolation of endophytes: Ensuring what (not) to grow. *Journal of Basic Microbiology* 62(1): 72–91.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4(4): 406–425.
- Sánchez R, Sánchez B, Sandoval Y, Ulloa Á, Armendáriz B, García M, Macías M. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(2): 132–14
- Sandberg D, del Olmo-Ruiz M, Sykes B, Woods D, Arnold A. 2022. Three distinctive *Preussia* (Sporormiaceae) from photosynthetic stems of *Ephedra trifurca* (Ephedraceae, Gnetophyta) in southeastern Arizona, USA. *Plant and Fungal Systematics* 67(2): 63–74.
- Sanfuentes E, González M, Castillo M, Rubilar R, Besoain X, Sanhueza C, Smith M. 2022. Detection of *Phytophthora cinnamomi* on declining *Araucaria araucana* forests. *Forest Pathology* 52(6): e12765.

- 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.
- Sarricolea P, Herrera M, Meseguer-Ruiz O. 2017. Climatic regionalization of continental Chile. *Journal of Maps* 13(2): 66–73.
- Schmidt H. 1977. Dinámica de un Bosque Virgen de Araucaria — Lenga (Chile). *BOSQUE* 2(1): 3–11.
- Schoch C, Seifert K, Huhndorf S, [...], Schindel D. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (16): 6241-6246.
- Schulz B, Boyle C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* 109(6): 661-686.
- Schulz B, Wanke U, Draeger S, Aust H. 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research* 97(12): 1447–1450.
- Senanayake I, Rathnayaka A, Marasinghe D, Calabon M, Gentekaki E, Lee H, *et al.* 2020. Morphological approaches in studying fungi: collection, examination, isolation, sporulation and preservation. *Mycosphere* 11(1):2678–2754.
- Shade A, Peter H, Allison S, Baho D, Berga M, Bürgmann H, Huber D, Langenheder S, Lennon J, Martiny J, Matulich K, Schmidt T, Handelsman J. 2012. Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in Microbiology* 3: 417.
- Sieber T. 2007. Endophytic fungi in forest trees: Are they mutualists? *Fungal Biology Reviews* 21(2–3): 75-89.
- Smith G, Liew E, Hyde K. 2003. The Xylariales: a monophyletic order containing 7 families. *Fungal diversity* 13: 185-218.
- Stadler M, Læssøe T, Fournier J, Decock C, Schmieschek B, Tichy H, Peršoh D. 2014. A polyphasic taxonomy of *Daldinia* (Xylariaceae). *Studies in Mycology* 77(1): 1-143.
- Stone J, Polishook J, White J. 2004. Endophytic Fungi. In Foster M, y G Bills eds. Biodiversity of Fungi. Burlington, United States. Elsevier Academic Press. p. 241-270.
- Strobel G, Daisy B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4): 491-502.

- Suryanarayanan T. 2011. Diversity of fungal endophytes in tropical trees. *In*: Pirttilä A, A Frank eds. *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications*. Dordrecht, Netherlands. Springer. p. 67–80.
- Szewczyk W, Kwaśna H, Behnke-Borowczyk J. 2017. Fungi inhabiting knotwood of *Pinus sylvestris* infected by *Porodaedalea pini*. *Journal of Phytopathology* 165(9): 580–590.
- Van Vooren N, Lindemann U, Healy R. 2017. Emendation of the genus *Tricharina* (Pezizales) based on phylogenetic, morphological and ecological data. *Ascomycete.org* 9(4):101–123.
- Van Vooren N, Lindemann U, Healy R. 2023. Emendation of the genus *Tricharina* (Pezizales) based on phylogenetic, morphological and ecological data. Part 3. New type studies and description of two new species. *Ascomycete.org* 14(4–5):185–204.
- Van Vooren N. 2020. Reinstatement of old taxa and publication of new genera for naming some lineages of the Pezizaceae (Ascomycota). *Ascomycete.org* 12(4):179–192.
- Vannini A, Mugnoz G. 1991. Water stress: A predisposing factor in the pathogenesis of *Hypoxylon mediterraneum* on *Quercus cerris*. *European Journal of Forest Pathology* 21: 193-201.
- Veblen T. 1982. Regeneration Patterns in *Araucaria araucana* Forests in Chile. *Journal of Biogeography* 9(1): 11–28.
- Vélez M, Marfetán J, Salgado M, Taccari L. 2020. *Mortierella* species from declining *Araucaria araucana* trees in Patagonia, Argentina. *Forest Pathology* 50(6):e12591.
- Verma V, Gond S, Kumar A, Kharwar R, Boulanger L, Strobel G. 2011. Endophytic fungal flora from roots and fruits of an Indian Neem plant *Azadirachta indica* A. Juss., and impact of culture media on their isolation. *Indian Journal of Microbiology* 51(4): 469–476.
- Wang X, Radwan M, Tarawneh A, Gao J, Wedge D, Rosa L, Cutler H, Cutler S. 2013. Antifungal activity against plant pathogens of metabolites from the endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Journal of agricultural and food chemistry* 61(19):4551–4555
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* Innis M, D Gelfand, J Sninsky, T White eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, United States. Academic Press. p. 315–322.

Yang N, Zhang W, Wang D, Cao D, Cao Y, He W, Lin Z, Chen X, Ye G, Chen Z, Chen J, Wei X. 2023. A novel endophytic fungus strain of *Cladosporium*: its identification, genomic analysis, and effects on plant growth. *Frontiers in Microbiology* 14:1287582.

Zhang Y, Crous P, Schoch C, Hyde K. 2012. Pleosporales. *Fungal Diversity* 53: 1–221.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Registro de árboles muestreados de donde se extrajo las ramas para el aislamiento de hongos endófitos.

N° árbol	DAP(cm)	Altura (m)	Estado sanitario (%)	Altitud (m)
1	43	8	0	1180
2	35	5	25	1180
3	38	6	75	1180
4	56	15	25	1180
5	31	4	25	1180
6	55	10	25	1180
7	42	8	25	1180
8	79	9	0	1185
9	49	8	25	1189
10	46	10	25	1188
11	82	10	25	1184
12	58	12	50	1186
13	73	13	0	1185
14	57	15	25	1188
15	70	9	25	1187
16	79	12	25	1188
17	75	7	25	1180
18	40	5	25	1181
19	76	6	25	1184
20	51	11	25	1187

**Anexo 2.** Descripción macroscópica de colonias y características de conidias de 49 morfotipos. El guion (–) indica ausencia de observación de estructuras bajo el microscopio óptico.

Morfotipo	Macroscopía			Conidia						
	Anverso	Reverso	Textura	Largo min	Largo max	Largo prom	Ancho min	Ancho max	Ancho prom	Forma
A1H1	Blanco	Café pálido	Vellosa algodonosa	3,35	5,76	4,33	2,72	4,51	3,53	Globosa a subglobosa
A1H2	Blanco, rosa	Café claro	Vellosa	3,31	7,41	4,87	1,68	3,93	3,12	Subglobosa
A1H9	Beige, café	Café oscuro	Algodonosa	2,99	4,95	4,14	1,69	2,81	2,25	Citriforme a elipsoidal
A2H4	Beige, café	Naranja rojizo	Algodonosa	-	-	-	-	-	-	-
A2H6	Café claro	Rojo oscuro	Algodonosa	3,63	5,07	4,30	3,32	4,93	4,17	Globosa
A2H7	Beige	Crema	Lanosa	4,51	6,42	5,36	2,94	4,80	3,67	Subglobosa a elipsoidal
A2H8	Blanco crema	Beige	Vellosa	6,14	10,03	8,06	3,12	2,24	2,62	Elipsoidal a cilíndrica
A2H9	Blanco	Blanco	Algodonosa	-	-	-	-	-	-	-
A3H5	Blanca, negro	Café	Dura	-	-	45,50	-	-	8,51	Ascos
A3H10(1)	Café claro	Café oscuro	Algodonosa	3,16	6,29	4,15	2,00	2,99	2,36	Elipsoidal
A3H10(2)	Beige	Beige oscuro	Vellosa algodonosa	8,00	10,57	9,39	1,42	1,87	1,67	Curvas/arqueadas
A4H6	Beige	Café	Aterciopelada	-	-	-	-	-	-	Globosas en cadena
A4H7	Blanco crema	Rosa	Lisa aterciopelada	4,02	5,12	4,55	0,79	1,63	1,19	Cilíndrica, arqueada
A4H10	Gris	Café oscuro	Aterciopelada	-	-	-	-	-	-	-
A5H5	Blanco	Blanco amarillento	Algodonosa granulosa	10,33	19,03	13,95	4,26	7,52	6,37	Citriforme a elípticas
A6H4(1)	Café	Beige oscuro	Pulverulenta	-	-	-	-	-	-	-
A6H4(2)	Gris, café	Negro, halo café	Pulvrolenta	-	-	-	-	-	-	Globosas en cadena
A7H1	Blanco gris	Anaranjado	Vellosa	-	-	-	-	-	-	-
A7H3	Blanco	Rosa pálido	Algodonosa	3,44	4,37	3,97	3,50	4,70	3,91	Globosa
A7H9	Blanco	Café claro	Algodonosa	3,95	6,30	4,79	3,17	4,89	3,96	Fusiforme a ovoide
A8H10	Café, gris	Negro	Pulvrolenta	4,21	7,69	5,73	1,81	3,70	2,86	Fusiforme en cadena
A9H3	Blanco, café	Rojo oscuro	Algodonosa	-	-	-	-	-	-	-
A10H2	Blanco, rosa	Café y blanco	Algodonosa vellosa	-	-	-	-	-	-	Globosas
A10H9	Beige	Café claro y negro	Algodonosa	-	-	-	-	-	-	Globosas en cadena
A10H10	Rosa pálido	Blanco	Aterciopelada	-	-	-	-	-	-	-
A11H7	Café claro	Beige, centro café	Lisa	4,88	9,65	6,76	1,65	3,18	2,23	Cilíndrica, periforme
A12H4	Café oscuro	Negro, café	Dura aterciopelada	-	-	-	-	-	-	Globosas
A12H8	Café claro	Café oscuro	Pulverulenta	-	-	-	-	-	-	-
A13H3	Beige, café	Naranja pálido	Algodonosa	-	-	-	-	-	-	-
A13H5	Beige, café	Naranja	Algodonosa vellosa	-	-	-	-	-	-	-
A14H6	Beige, café	Café oscuro	Lanosa	-	-	-	-	-	-	-
A15H2	Blanco	Amarillo claro	Vellosa aterciopelada	6,91	12,11	8,78	2,48	2,48	3,67	Cilíndrica
A15H7	Café claro	Amarillo mostaza	Aterciopelada vellosa	6,50	10,56	8,17	2,11	5,26	3,38	Cilíndrica y periforme
A15H8	Naranja	Naranja	Lisa	3,88	6,29	4,85	1,17	2,51	1,64	Cilíndrica
A16H2	Beige, naranja	Café claro	Algodonosa	-	-	-	-	-	-	-
A16H7	Beige café	Beige	Lanosa	4,60	6,56	5,53	4,39	6,26	5,17	Globosas a subglobosa
A16H8	Beige	Amarillo pálido	Pulvrolenta	5,32	10,43	7,18	2,44	4,63	3,57	Elipsoide a cilíndrica
A17H3	Café claro	Beige	Lisa	4,21	6,94	5,53	0,94	1,98	1,37	Cilíndrica, arqueada
A17H4	Blanco rojizo	Rojizo	Algodonosa	-	-	-	-	-	-	-
A17H5	Café claro	Café oscuro	Algodonosa	-	-	-	-	-	-	-
A17H8	Blanco y naranja	Naranja	Lanosa vellosa	3,77	10,02	7,14	0,75	1,96	1,38	Ligeramente curvas
A17H10	Beige y café	Café oscuro	Algodonosa	-	-	-	-	-	-	-
A19H5	Beige tonos café	Blanco, café	Lisa	4,10	7,80	5,40	0,92	2,78	1,59	Cilíndrica
A19H8	Blanco, naranja	Rosa	Lisa vellosa	3,67	6,23	4,79	1,73	3,35	2,51	Cilíndrica
A19H9	Blanco	Beige	Algodonosa	-	-	-	-	-	-	-
A19H10	Rojo, café	Negro	Lanosa	-	-	-	-	-	-	-
A20H2	Café claro	Beige	Aterciopelada	-	-	-	-	-	-	-
A20H4	Beige	Café claro	Algodonosa	4,16	6,80	5,49	2,20	4,69	3,03	Ovoide a cilíndrica
A20H6	Rosa pálido	Anaranjado	Lanosa vellosa	4,48	7,80	5,77	1,47	2,49	1,98	Cilíndrica

**Anexo 3.** Resultados de la cuantificación de ADN templado. Se utilizó el promedio de dos tomas de cada muestra.

Cepa	Código muestra	Concentración ADN (ng/ $\mu$ L)
A1H1	P1	75,9
A1H2	P2	116,5
A2H7	P5	116,0
A2H8	P6	95,9
A3H5	P7	27,7
A5H5	P9	79,8
A6H4(2)	P10	201,5
A7H3	P11	182,5
A7H9	P12	69,4
A8H10	P13	342,5
A9H3	P14	19,3
A10H2	P15	25,9
A13H5	P16	325,5
A16H7	P17	112,0
A17H8	P18	232,0
A17H10	P19	377,0
A7H1	P20	259,0
A19H5	P21	379,0
A20H4	P22	5,4

**Anexo 4.** Resultados de los productos PCR con la amplificación de la región LSU, revelados mediante electroforesis en gel.

