



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Departamento de Botánica

“Metabolitos secundarios biológicamente activos de *Ganoderma australe* en la inhibición del crecimiento de hongos de interés



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

POR GLADYS LEAL FREDES
Profesor Guía: Dra. Claudia Pérez Manríquez
Profesor Co Guía: Dra. Solange Torres Galán
Departamento de Botánica
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Noviembre, 2022
Concepción, Chile

HOJA DE FIRMAS**Profesora Guía**

Dra. Claudia Pérez Manríquez.

Departamento de Botánica.

Universidad de Concepción.

Profesora Co-Guía

Dra. Solange Torres Galán.

Departamento de Botánica.

Universidad de Concepción.



Profesores Evaluadores

Dr. José Becerra.

Departamento de Botánica.

Universidad de Concepción.

Dr. Götz Palfner.

Departamento de Botánica.

Universidad de Concepción.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a mi familia, a mi madre y padre por sus cariños y enseñanzas.

A los integrantes del laboratorio de productos naturales, por la oportunidad de trabajar y compartir con agrado.

A mis profesoras, Claudia Pérez y Solange Torres, por su cercanía, atención, tiempo y dedicación durante mi proceso educativo.

Finalmente agradezco a mis amigas, amigos y a mi micolega por su apoyo, contención y por compartir largas caminatas en la naturaleza. Que sean muchas más.



ÍNDICE GENERAL

Contenido

1.1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.2	Industria forestal en Chile	1
1.3	Estrategias de control contra hongos causantes de la alteración estética de la madera.	5
1.4	Metabolitos secundarios en hongos	6
1.5	Hongos de interés forestal	10
1.5.1	<i>Diplodia</i>	10
1.5.2	<i>Trichoderma</i>	11
1.6	Bioactividad de <i>Ganoderma</i>	12
2	METODOLOGÍA.....	15
2.1	Área de muestreo y obtención de cuerpos fructíferos	15
2.2	Identificación macro y microscópica	17
2.3	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Ganoderma australe</i>	18
2.3.1	Aislamiento de las cepas fúngicas	18
2.3.2	Cultivo en medio líquido	18
2.4	Extracción de metabolitos secundarios.....	20
2.4.1	Obtención del extracto total.....	20
2.5	Análisis cromatográficos	21

2.5.1	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).....	21
2.6	Bioactividad	22
2.6.1	Preparación de los extractos.....	22
2.7	Ensayo de susceptibilidad antifúngica	23
2.7.1	Obtención de cepas fúngicas de interés forestal.....	23
2.7.2	Método de difusión en agar.....	23
2.7.3	Ensayo de susceptibilidad antifúngica in vitro.	25
2.7.4	Efecto fungicida o fungistático.....	26
2.8	Análisis estadístico	26
3	Resultados.....	26
3.1	Recolección del material biológico.....	26
3.1.1	Características macroscópicas y microscópicas de <i>Ganoderma australe</i> G1	27
3.1.2	Características macroscópicas y microscópicas de <i>G. australe</i> G2	29
3.1.3	Características macroscópicas y microscópicas de <i>G. australe</i> G3	31
3.2	Rendimiento del micelio.....	33
3.3	Rendimiento del extracto	33
3.4	Análisis CG-MMS de los principales compuestos.....	34

3.5	Ensayo de susceptibilidad antifúngica	42
3.6	Porcentaje de inhibición de crecimiento de los hongos de interés forestal expuestos a dos concentraciones distintas de los ejemplares de <i>G. australe</i> (G1, G2 y G3).....	45
3.7	Análisis estadísticos.....	47
3.7.1	Inhibición del crecimiento para <i>Diplodia seriata</i>	47
3.7.2	Inhibición del crecimiento para <i>Trichoderma sp</i>	48
4	Discusión	50
4.1	Características macroscópicas y microscópicas de <i>Ganoderma australe</i>	50
4.2	Rendimientos.....	52
4.3	Análisis cromatográficos.....	53
4.4	Ensayo de susceptibilidad antifúngica	55
5	Conclusiones	57
6	Anexos.....	59
6.1.1	Hongos causantes de la alteración estética de la madera de coníferas.....	59
6.1.2	Características macroscópicas y microscópicas de <i>Trichoderma sp</i>	59
6.1.3	Características macroscópicas y microscópicas de <i>Diplodia seriata</i>	61

6.1.4	Análisis estadístico.....	62
6.1.5	Inhibición en el crecimiento de <i>Diplodia seriata</i>	62
6.1.6	Inhibición en el crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i>	63
7	Referencias.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Principales productos madereros producidos (Fuente: CORMA) 1	
Figura 2:	Principales países de destino de las exportaciones forestales a nivel mundial. (Fuente: CORMA)	2
Figura 3:	Crecimiento de hongos de interés forestal en madera. (Fuente: CIEFAP, 2013).....	5
Figura 4:	Mapa de los tres sitios de recolección del material fúngico: Maule, Bío-Bío y Aysén. (Fuente: Gladys Leal)	16
Figura 5:	Cultivo micelial en medio líquido de las especies de <i>Ganoderma australe</i> . A) Inoculación en medio líquido. B) Cultivo en agitador orbital (Combi-Shaker, NB-101MT) (Fuente:Gladys Leal).....	19
Figura 6:	Obtención del cultivo líquido de <i>Ganoderma australe</i> . A) Filtración al vacío. B) Obtención de la fase líquida. (Fuente: Gladys Leal)	20
Figura 7:	Etapas para la obtención del extracto total. A) separación líquido y filtración de la fase orgánica, B) sequedad al rotavapor C) Extracto total.....	21
Figura 8:	Equipo de cromatografía GC-MS. (Fuente: Gladys Leal)	22

Figura 9: Diseño experimental de la prueba de susceptibilidad antifúngica con los diferentes tratamientos aplicados	25
Figura 10: Macro y micromorfología de <i>G. australe</i> (G1). A, B) Basidiomas, C) Himenio, D) Cultivo <i>in vitro</i> , E, F, G) Esporas H) Hifa fíbulada (flecha de color blanca indica presencia de fíbula) (Fuente: Gladys Leal)	28
Figura 11: Macro y micromorfología de <i>G. australe</i> (G2). A, B) Basidiomas C) Himenio, D) Cultivo <i>in vitro</i> , E, F) Esporas, G, H) Hifa fíbulada (flecha de color blanca indica fíbula) . (Fuente: Gladys Leal).....	30
Figura 12: Macro y micromorfología de <i>G. australe</i> (G3). A, B) Basidiomas, B) Himenio, D) Cultivo <i>in vitro</i> , E, F) Esporas, G) Hifas fíbulada (flecha indica presencia de fíbula) H) Hifa septada (Flecha indica presencia de hifa septada) . (Fuente: Gladys Leal)	32
Figura 10: Cromatograma del extracto obtenido en medio de cultivo líquido de <i>G. australe</i> (G1) (Fuente: Gladys Leal).....	35
Figura 11: Cromatograma del extracto obtenido en medio de cultivo líquido de <i>G. australe</i> (G2) (Fuente: Gladys Leal).....	37
Figura 12: Cromatograma del extracto obtenido en medio de cultivo líquido de <i>G. australe</i> (G3) (Fuente: Gladys Leal).....	39
Figura 13: Cromatograma del extracto obtenido del medio de cultivo líquido en ausencia del micelio de <i>G. australe</i>	41

Figura 14. Crecimiento de <i>Diplodia seriata</i> frente a los distintos tratamientos utilizados, la flecha negra indica la inhibición del crecimiento micelial. (Fuente: Gladys Leal).....	43
Figura 15: Crecimiento de <i>Trichoderma sp</i> frente a los distintos tratamientos utilizados, la flecha negra indica la inhibición del crecimiento micelial. (Fuente: Gladys Leal).....	44



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Registro de ejemplares fúngicos utilizados para estudios <i>in vitro</i> . (Fuente: Gladys Leal)	26
Tabla 2: Rendimientos de micelio liofilizado (Fuente: Gladys Leal)	33
Tabla 3: Rendimientos del extracto obtenido de ejemplares de tres regiones (Fuente: Gladys Leal)	33
Tabla 4. Principales compuestos detectados en el medio de cultivo líquido de <i>G. australe</i> (G1)	34
Tabla 5: Principales compuestos detectados en el medio de cultivo líquido de <i>G. australe</i> (G2) (Fuente: Gladys Leal)	36
Tabla 6: Principales compuestos detectados en el medio de cultivo líquido de <i>G. australe</i> (G3)(Fuente: Gladys Leal)	38
Tabla 7: Principales compuestos detectados en el medio de cultivo en ausencia de <i>G. australe</i> (Fuente: Gladys Leal)	40
Tabla 8: Porcentaje de inhibición de crecimiento para los hongos <i>Diplodia seriata</i> y <i>Trichoderma sp</i> expuestas a extractos G1, G2 y G3 de distinta concentración. Los datos representan la media de tres réplicas por tratamiento	46
Tabla 9. Diferencias significativas entre extractos. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$)	47
Tabla 10. Diferencias significativas entre concentraciones. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$)	47

Tabla 11. Diferencias significativas entre extractos. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$)	48
Tabla 12. Diferencias significativas entre concentraciones. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$)	49



RESUMEN

Los hongos de los géneros *Diplodia* y *Trichoderma* son de interés en la industria forestal en Chile, debido a que causan grandes pérdidas económicas al tener un efecto negativo sobre la permeabilidad y apariencia estética de la madera al producir coloraciones. Para evitar la propagación de estos hongos, se utilizan productos antimanchas, los cuales causan un gran impacto medioambiental debido a su alta toxicidad y efectos negativos para el ecosistema. Tales efectos hacen necesaria la búsqueda de alternativas sustentables con el medio ambiente y no tóxicas para el control del manchado de la madera. Al respecto, los hongos basidiomicetos pertenecientes al género *Ganoderma* han sido motivo de estudio ya que presentan una importante fuente de metabolitos secundarios y por la gran variedad de compuestos químicos con importante actividad antifúngica.

En este sentido, el objetivo general de este estudio es evaluar los metabolitos secundarios obtenidos de cultivos *in vitro* de *Ganoderma australe* en la inhibición del crecimiento de hongos de interés forestal. Para esto, se usaron los especímenes de *G. australe* provenientes de la región del Maule(G1), Bío-Bío(G2) y Aysén(G3) para la obtención de cultivos *in vitro*. A partir de estos cultivos, los extractos fueron obtenidos mediante extracción líquido-líquido con acetato de etilo. Se realizó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/MS), para dilucidar los compuestos presentes en los extractos. Para los ensayos de bioactividad, se evaluaron los extractos en concentraciones de

200 mg/mL y 400 mg/mL, obtenidos a partir del cultivo líquido de ejemplares de *Ganoderma australe* (Fr.) Pat presentes en Chile, en la inhibición de hongos del género *Diplodia* y *Trichoderma*.

Dentro de los principales compuestos encontrados, el más abundante proveniente desde el extracto del cultivo G1 correspondió a 2,2,4-trimetil-Diisobutirato de 1,3-pentanodiol. (% 61,5 y Tr 10,696). Del obtenido en el extracto G2, fue Bencenometanol, 4-metoxi. (%32,37 y Tr 6,602). Y para el extracto G3 el compuesto mayoritario fue Alcohol de bencilo. (%22,96 y Tr 7,321). Además, fueron encontrados dos compuestos en común en los tres especímenes el Compuesto Alcohol de bencilo (G1: (15,1% y 7,113 Tr), G2: (13,84% y 7,254 Tr) y G3: (22,98% y 7,321 Tr) y el 4-quinolinacarboxaldehído. (G1: (0,9% y 9,316 Tr), G2: (3,54% y 9,325 Tr) y G3: (3,34% Y 9,363 Tr)).

Para los tres extractos ensayados se observó una actividad diferenciada frente a los hongos de interés forestal, siendo G1 el extracto de mayor acción antifúngica contra *D. seriata* y G3 el extracto en la concentración de 400 mg/mL presentó la mayor actividad para *Trichoderma sp.*

Los extractos obtenidos de *G. australe* presentaron un efecto fungistático siendo *Diplodia seriata* la cepa más sensible a la acción de estos extractos. Por lo tanto, se acepta la hipótesis planteada en este estudio sobre el efecto inhibitorio en el crecimiento de hongos de interés forestal de los extractos provenientes de *G. australe*. Finalmente, los resultados de la investigación revelan que durante el

desarrollo del micelio de *Ganoderma australe* en cultivos *in vitro*, metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas son liberados al medio de cultivo por lo que es un proceso biológico efectivo para la obtención de metabolitos bioactivos a partir de una fuente de origen natural.

Palabras claves: Actividad antifúngica, *Ganoderma australe*, Hongos forestales



1.1 INTRODUCCIÓN

1.2 Industria forestal en Chile

La industria forestal en Chile produce variados productos madereros, entre los principales se encuentran, la producción de celulosa, astillas, madera aserrada, polines, entre otros. (CORMA s.f). (Fig. 1). Estos productos son obtenidos de los monocultivos de coníferas perteneciente a la división de las gimnospermas (Concha 2017). A nivel mundial el destino de las exportaciones forestales y madereras a en Chile a la fecha ha sido de un 32% a China, 21% a EE. UU, 6% a Japón, 4% Corea del sur y a 5% México. (Fig. 2).

Figura 1. Principales productos madereros producidos (Fuente: CORMA)



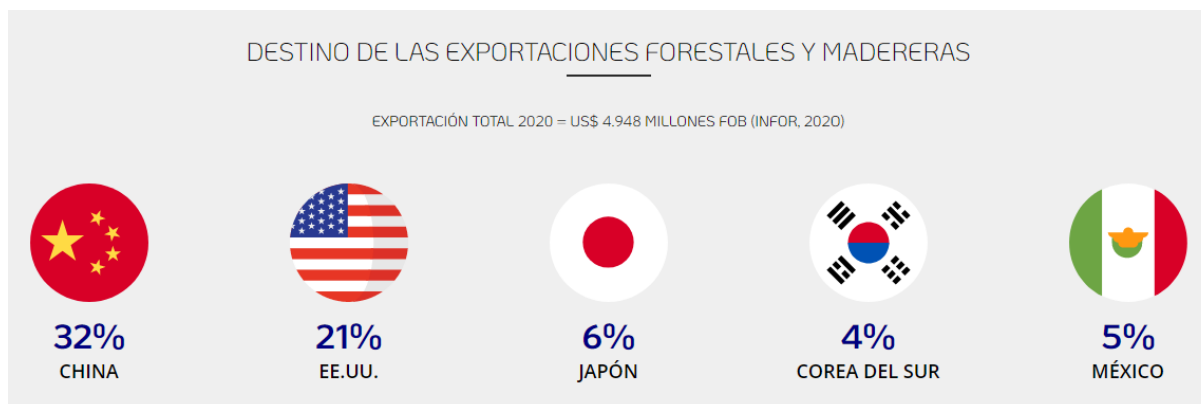


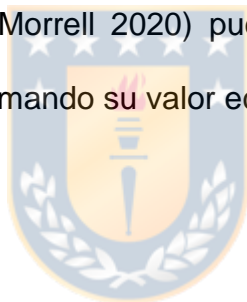
Figura 2. Principales países de destino de las exportaciones forestales a nivel mundial. (Fuente: CORMA)

En Sudamérica, la industria forestal ha sufrido múltiples enfermedades y plagas que han afectado su producción (Durán *et al.* 2008). En los ecosistemas forestales las enfermedades forman parte de los cuatro factores principales que determinan la dinámica de estos junto con las plagas, el fuego y las condiciones climáticas. Al respecto, las especies pertenecientes al reino fungi son las principales agentes causantes de enfermedades forestales, ya que atacan diferentes partes de los organismos vegetales afectando su funcionamiento en varias formas como por ejemplo, aquellos hongos que causan defoliación provocan una disminución en la tasa fotosintética; los pudridores de raíz o los causantes de canchales que debilitan el tronco o reducen el transporte desde y hacia las raíces (Villacide y Corley 2011).

Las especies pertenecientes al género *Pinus*, son de los ejemplares más cultivados con fines comerciales, debido a su gran adaptabilidad al clima y su rápido desarrollo, (Instituto Forestal de Chile [INFOR] 2020). En cuanto a la estructura de la madera de las gimnospermas, está constituida por diferentes tipos de células encargadas

del soporte mecánico, la conducción y almacenamiento de agua y nutrientes. Mientas que a nivel bioquímico está formada por celulosa, hemicelulosa, lignina y otros componentes de manera que las diferencias entre estos compuestos y sus proporciones dan lugar a los diferentes usos de la madera (Schirp *et al.* 2003). Por lo tanto, es considerado un producto de exportación por sus propiedades físicas, que la vuelven atractiva para su uso comercial (Zabel y Morrell 2020).

No obstante, debido al alto porcentaje de las exportaciones en Chile y al almacenamiento de la madera por periodos prolongados, ésta es susceptible al ataque de agentes biológicos que alteran su estética. Este es considerado un problema para las empresas forestales y madereras (Zabel y Morrell 2020) puesto que, pasa a ser considerada madera de calidad secundaria mermando su valor económico (Seifert 1993)



1.3 La alteración en la estética de la madera, originado por hongos

Existen antecedentes que esta alteración en sustratos leñosos, se produce por hongos de la división Ascomycota (Schmidt 2006). Dicha alteración se origina post-cosecha infectando a la madera que no ha recibido un tratamiento adecuado. Los hongos, se alimentan de compuestos celulares simples; no degradan compuestos complejos como la celulosa y la lignina, de tal manera que no ocasionan problemas físico-estructurales a la madera. (CIEFAP 2013).

La alteración estética es provocado por el crecimiento de hongos que poseen un micelio con hifas de paredes celulares oscuras debido a la presencia del pigmento melanina, la que puede dar un color azul-negro a la madera como efecto óptico ocasionado por la refracción de la luz (Schirp *et al.* 2003). (Fig 3)

Usualmente la coloración se produce en la albura, pero ocasionalmente puede presentarse en el duramen. Por consiguiente, son llamados hongos cromógenos, aquellos que penetran la madera y no pueden ser eliminados por medio de cepillado y mohos los que se desarrollan en la superficie de la madera causando decoloraciones que pueden ser eliminadas mediante el cepillado (Gamarra 2015).



Figura 3. Crecimiento de hongos que alteran la estética de la madera (Fuente: CIEFAP 2013)

1.4 Estrategias de control contra hongos causantes de la alteración estética de la madera.

Las estrategias de control que se utilizan, por lo general, se han basado en el empleo de agentes químicos, pero su utilización es cada vez menos recomendable y más restringida debido a los problemas de contaminación ambiental que derivan de su aplicación y a su toxicidad (Bruinsma 2003).

En Chile, compuestos, entre los que se destacan, los fenólicos clorados como el pentaclorofenol (PCP) y el pentaclorofenato de sodio (PCP-Na) se encuentran prohibidos desde el año 1999 por su alta toxicidad e impacto negativo en el medioambiente. (Galleguillos 2016).

Otra estrategia de control, son los baños impregnantes o antimanchas de naturaleza química y de uso indiscriminado, por ejemplo, un compuesto a base de cobre, cromo y arsénico llamado CCA, el cual es el preservante hidrosoluble para maderas más utilizado a nivel mundial, puesto que penetra y perdura en la madera tratada a presión. Sin embargo, parte de este producto químico puede pasar de la madera al suelo circundante a través del tiempo o, desprenderse de la madera y adherirse a la piel al contacto (Osmose s.f.).

Asimismo, “desde 2003, la Comunidad Europea ha limitado el uso de este protector a aplicaciones industriales en las que sea estructuralmente necesario y no haya probabilidades de entrar en contacto con personas” (Barreiro y Hirsch 2011). En Chile, el uso y control de estos productos químicos está fiscalizado por el Servicio Agrícola y Ganadero [SAG] a través del Departamento de Plaguicidas y Fertilizantes, que regula la fabricación, importación, exportación, distribución, comercio, uso y manejo de estos productos según el Decreto Ley N.º 3557 de 1980 (SAG s.f.).

Frente a lo expuesto anteriormente, se hace necesaria la búsqueda de alternativas sustentables con el medio ambiente y no tóxicas para el control de interés foresta

1.5 Metabolitos secundarios en hongos

Al respecto, los hongos basidiomicetos han sido motivo de estudio debido a la gran variedad de compuestos químicos que son capaces de sintetizar, tales como los metabolitos secundarios de variada naturaleza estructural (Palacios *et al.* 2011). Tienen

su origen en los compuestos intermediarios del metabolismo primario que, a través de procesos enzimáticos, se convierten en otros compuestos, los cuales pueden presentar una determinada actividad biológica y se producen al final de la fase de crecimiento o cuando el crecimiento es limitado por el sustrato (Cepero De García 2012; Carrillo 2018).

Esta variedad de metabolitos secundarios que presentan los hongos es porque son incapaces de sintetizar macromoléculas a partir del dióxido de carbono y la energía procedente de la luz, pues no poseen clorofila; por lo tanto, su biogénesis está condicionada principalmente por el tipo de nutrientes propios del sustrato donde se desarrollan, además de las condiciones climáticas que los rodean provocando una alteración y cambio en su metabolismo generando una amplia diversidad de compuestos químicos (Zuluaga *et al.* 2007).

De modo que se ha establecido que, aunque algunos géneros y/o especies de hongos expresan las mismas rutas biogenéticas independientemente de su origen geográfico, mientras que otros se diferencian en su producción. Por consiguiente, se han estudiado los metabolitos secundarios de hongos de diversas zonas geográficas y desde todos los hábitats posibles. Al respecto, se han investigado los metabolitos secundarios de diversos hongos que son capaces de desarrollar sustancias que pueden ser usadas para el control de hongos fitopatógenos. (Zähner *et al.* 1983 y Aqueveque 2008).

La inhibición del crecimiento por parte del patógeno puede deberse a la actividad fungicida o fungistática del extracto a evaluar. Los extractos varían en su efectividad de acuerdo con características propias de la estructura del patógeno. Un extracto inhibe el crecimiento fúngico cuando al ser colocado en un medio de cultivo logra paralizar o

impedir que la cepa colonice el medio generando una reducción en la tasa de crecimiento respecto al control (Viñuela y Jacas 1993; Soliman y Badeaa 2002).

Es por esto, que el efecto fungicida, ocurre cuando un extracto elimina por completo al patógeno al actuar en sitios claves de la ruta metabólica afectando la producción de enzimas y proteínas indispensables para la vida del microorganismo (Soliman y Badeaa 2002), mientras que el efecto fungistático que ejerce una sustanciano mata al hongo solo detiene procesos como el crecimiento, desarrollo y germinación de esporas (Veloz-García *et al.* 2010; Sánchez-León *et al.* 2015).

Se han reportado diferentes estudios que demuestran el potencial biológico en la inhibición de hongos fitopatógenos. Al respecto, sordaricin, un metabolito aislado del hongo *Xylaria sp*, presenta actividad antifúngica moderada contra *Candida albicans* (Liu *et al.* 2008). De igual forma, las estrobirulinas A y B extraídos del micelio *Strobirulus tenecellus* (Pers.) Singer ejercen un efecto antifúngico contra hongos Oomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes, y levaduras (Anke y Oberwinkler 1977).

Las especies pertenecientes a la familia polyporaceae también presentan actividades antifúngicas tales como: *Gloephyllum sepiarium* que produce inhibición en *Sacharomyces cerevisiae* y en *Aspergillis fumigatus*; de la misma forma, *Ganoderma annulare* presentan compuestos que inhiben el crecimiento micelial de *Microsporum cannes* y *Trichophyton mentagrophytes* (Ghorashi *et al.* 2003).

Al respecto, las especies de hongos pertenecientes al género *Ganoderma* son bastante estudiadas y utilizadas desde la antigüedad en la medicina tradicional oriental.

Así, a partir de los cuerpos fructíferos, micelio y esporas de diferentes especies de *Ganoderma*, se han aislados polisacáridos y variados metabolitos biológicamente activos de naturaleza esteroidea, como esteroides y triterpenos, que pueden controlar patógenos microbianos (Palacios *et al.* 2011; Zuluaga *et al.* 2007). Este género, perteneciente a la división *Basidiomycota*, clase Agaricomycetes y orden Polyporales, tiene una distribución cosmopolita, dado que se encuentran en casi todos los gradientes latitudinales con clima cálido, siendo aprovechado en los países asiáticos por sus propiedades medicinales (Fiallos 2019).

Diversos grupos químicos tales como alcaloides, triterpenos (esteroides), polisacáridos, proteínas, aminoácidos, nucleósidos, ácidos grasos y enzimas son aislados a partir de cuerpos fructíferos, micelio y esporas de especies de hongos basidiomicetos del género *Ganoderma* (Sharma *et al.* 2019). Se ha demostrado que los constituyentes más importantes, desde el punto de vista farmacológico, son triterpenos y polisacáridos (Boh *et al.* 2007). En este sentido, estudios han demostrado que *Ganoderma sp* ha inhibido hongos patógenos de interés agrícola como *Curvularia clavata* y *Phytophthora nicotinae*, obteniendo resultados similares a los tratamientos químicos que superan el 50 % de inhibición (Palacios *et al.* 2011).

1.6 Hongos de interés forestal

1.6.1 *Diplodia*

Las especies del género *Diplodia* pertenecen al orden Botryosphaariales y familia Botryosphaariaceae. Son hongos cosmopolitas con una amplia gama de hospedantes que se caracterizan por inducir enfermedades en plantas que se encuentran bajo estrés (Slippers y Wingfield 2007; Slippers *et al.* 2017). Las especies patógenas de plantas de Botryosphaariaceae atacan plantas leñosas (Mondragón *et al.* 2021).

Las especies pertenecientes al género *Diplodia* se han reportado como hongos endófitos (Crous *et al.* 2006). La dispersión y la infección endofítica, puede ocurrir a través de ascosporas o conidias siendo las estructuras de fructificación en la fase de anamorfo más comunes en la naturaleza (Slippers y Wingfield 2007).

Las características morfológicas de *Diplodia sp* como micelio septado oscuro, conidios fusiformes de color oscuro, bicelulares (21.6 μm largo x 5.6 μm ancho) que se encuentran al interior de picnidios aislados globosos marrón oscuro, son utilizadas para la identificación a nivel de género y especie. Sin embargo, estas características son variables y, en ocasiones, no son distintivas al compartirse entre especies; además, son influenciadas por la edad y el sustrato donde crecen los aislados, por lo que es necesario el uso de herramientas moleculares (Leyva 2011; Phillips *et al.* 2013; Mondragón *et al.* 2021).

1.6.2 *Trichoderma*

El género *Trichoderma* se presenta de manera natural en diferentes hábitats de amplia distribución. Este hongo se caracteriza por ser saprófito y sobrevivir en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica debido a su gran capacidad de descomponerla. Además en determinadas condiciones puede ser anaerobio facultativo, lo cual le permite tener una mayor plasticidad ecológica (Howell 2003).

La taxonomía de este género es complicada. En 1794, Persoon describió el género *Trichoderma* y, aún en la actualidad, se continúa profundizando en este aspecto. *Trichoderma* se clasifica como un hongo anamórfico. Además, el género *Trichoderma* se ubica en la clase *Hyphomycetes*, orden *Moniliales*, familia: *Moniliaceae*. Su fase sexual (estado teleomorfo) se encuentra ubicado en la clase *Ascomycetes*, serie *Pyrenomycetes*, orden *Hypocreales*, género *Hypocrea*. Las especies del género son un grupo de derivados clonales de *Hypocrea* que han perdido la capacidad de completar un ciclo (Martínez *et al.* 2015).

Las colonias de los aislamientos de *Trichoderma* presentan rápido crecimiento color blanco y se tornan verde oscuro con abundante esporulación. Durante su desarrollo y crecimiento producen hifas de 5-10 μm de ancho, que conforman el micelio septado, con paredes compuestas por quitina y glucano (Bermeo 2018).

Por otro lado, microscópicamente los conidióforos de *Trichoderma* presentan un aspecto cónico. Además, producen gran cantidad de conidios asexuales unicelulares de color verde o hialino, de forma cilíndrica, subglobosa, u oblongos con diámetro promedio

de 3- 5 μm los que se forman a partir de células conidiógenas y fiálides (singulares o en grupos) ubicados a los extremos de los conidióforos (Martínez *et al.* 2015).

1.7 Bioactividad de *Ganoderma*

En Chile, se ha reportado la presencia de hongos pertenecientes al género *Ganoderma* particularmente la especie *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. Presenta una amplia distribución al desarrollarse todo el año desde el Sur de Chile hasta Chile austral. (Hongos Chile 2012). Este es un hongo perenne sésil que parasita diferentes especies de árboles, encontrándose adherido al sustrato en su parte posterior en tocones y árboles caídos (Buchanan 2001). Presenta un basidioma leñoso semicircular de color pardo, entre amarillento y marrón oscuro, negruzco. La cara superior tiene gruesas ondas irregulares. Por otra parte, el himenio es de color blanco y está compuesto por poros de color blanco fuerte, (Martínez *et al.* 1990) que, al ser tocados, se vuelven de color café irreversible (Hongos Chile 2012).

G. australe, microscópicamente se caracteriza por presentar hifas generativas con fíbulas, esporas ovoides, de coloración café y truncadas en el ápice, con doble pared, una pared interna con proyecciones columnares que le dan la apariencia de ornamentación de tamaño 9,6-13 x 6,5-8 μm (Urcelay 2012)

No existen suficientes estudios relacionados a *Ganoderma australe* con respecto a su actividad biológica, por lo cual se conoce poco acerca de su composición química. No obstante, Nieto y Valencia (2002) estudiaron la composición química de basidiomas de *Ganoderma australe* y encontraron un porcentaje relevante de compuestos que

podrían ser utilizadas contra hongos patógenos tales como esteroides y ésteres de ácidos grasos identificados como oleato de etilo, palmitato de etilo, heptadecanoato de etilo, linoleato de etilo y estearato de etilo (Nieto y Valencia 2002).

En otro estudio, se evaluó la actividad antibacteriana de extractos de *Ganoderma australe* frente a cepas de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, por lo que identificaron compuestos esteroides, triterpenos y ácidos aplanoxídicos, los cuales son responsables de la actividad biológica (Lehmkuhl 2000).

Los estudios relacionados a la química de los hongos en Chile son escasos y sólo se han analizado los metabolitos obtenidos a partir de los cuerpos fructíferos. El crecimiento micelial *in-vitro* de hongos presenta una importante fuente de metabolitos con actividad biológica, al liberar los metabolitos secundarios al medio de cultivo líquido (Aqueveque *et al.* 2010). Esto otorga una oportunidad de desarrollar una importante línea de investigación y producción de cultivos miceliales *in vitro* para el aislamiento de diversos compuestos con actividad antibacteriana, antifúngica, nematocida, insecticida, citotóxicas, entre otras. (Liermann *et al.* 2012).

En este contexto, surge la pregunta, ¿los metabolitos secundarios aislados desde el medio de cultivo de *Ganoderma australe*, son capaces de inhibir el crecimiento de hongos de interés forestal? Para ello la hipótesis planteada es la siguiente: Los metabolitos secundarios obtenidos de cultivos *in vitro* de *Ganoderma australe* inhiben el crecimiento de hongos de interés forestal.

El objetivo general de este estudio es evaluar los metabolitos secundarios obtenidos de cultivos *in vitro* de *Ganoderma australe* en la inhibición del crecimiento de hongos de

interés forestal. Para lo mencionado, se desarrollarán los siguientes objetivos específicos:

- Obtención de basidiomas y cultivos *in vitro* de *Ganoderma australe*.
- Dilucidar los compuestos químicos presentes en los extractos provenientes del medio de cultivo *in vitro* de *G. australe*.
- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos totales provenientes del medio de cultivo *in vitro* de *G. australe*.



2 METODOLOGÍA

Reactivos y solventes

Agua destilada (H₂O), Extracto de malta Merck. Germany, Extracto de glucosa Merck. Germany, Extracto de levadura Merck. Germany, Agar Merck. Germany, Acetato de etilo Merck. Germany, Metanol 99%, Merck. Germany, Persulfato de Potasio Merck. Germany

2.1 Área de muestreo y obtención de cuerpos fructíferos

La obtención del material de estudio se realizó en tres regiones diferentes. En el parque Nacional Cerro Castillo, ubicado al sur de la región de Aysén. (46 °03'00"S 72 °11'00"O); en el Parque Nacional Federico Albert ubicado a la costa en la región del Maule. (35°43'17"S 72°32'12"O) el que se encontraba adherido a un alcornoque (*Quercus suber*) en descomposición *suber*) en descomposición. En Concepción en bosque nativo adherido a un tocón de árbol en descomposición (36 °49'48"S 73 °01'12"O). Una vez recolectados fueron almacenados y transportados desde el área de recolección hasta el Laboratorio De Química De Productos Naturales Del Departamento De Botánica de la Universidad de Concepción. Los ejemplares recolectados fueron etiquetados como G1 para el ejemplar recolectado en la región del Maule, G2 el obtenido de la región del Biobío Y G3 para el hallado en la región de Aysén. (Fig. 4)

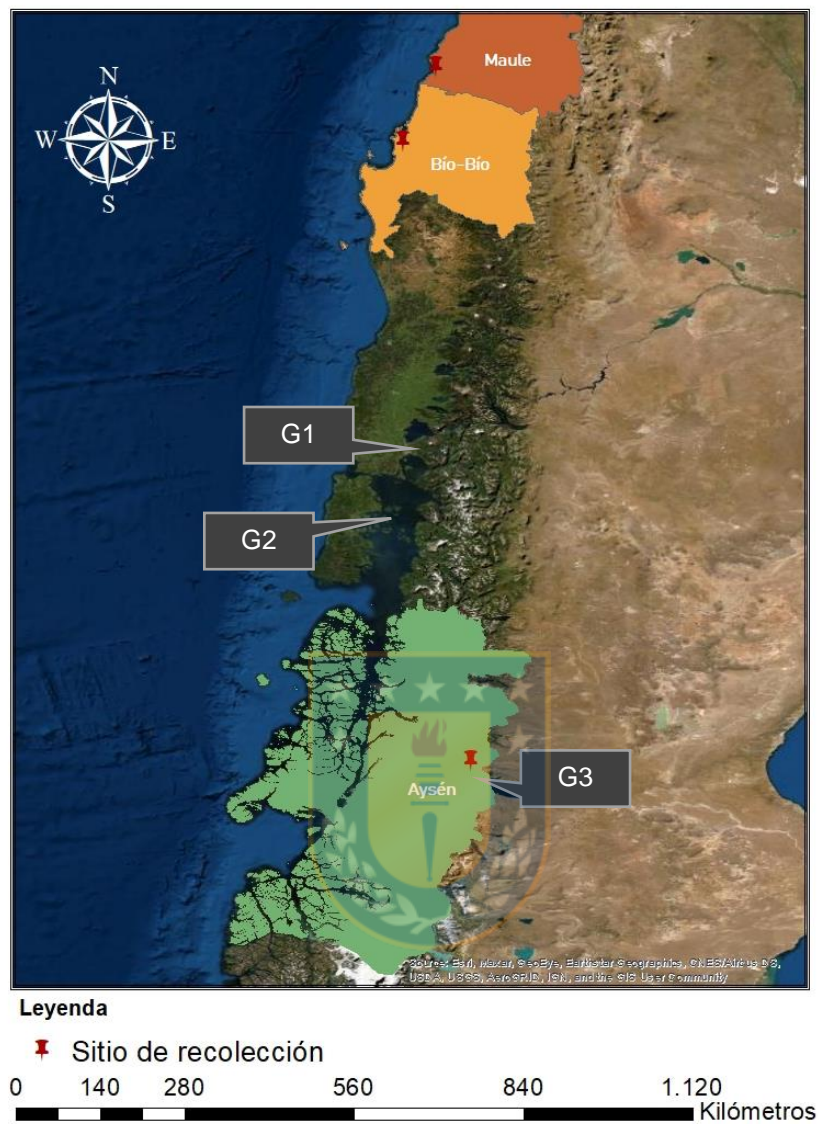


Figura 4. Mapa de los tres sitios de recolección del material fúngico: Maule, Bío-Bío y Aysén. (Fuente: Gladys Leal)

2.2 Identificación macro y microscópica

A partir de los basidiomas, se obtuvieron fotografías digitales, para la observación de los caracteres taxonómicos. Para la identificación se observaron características macroscópicas tales como dimensiones, tipo de fructificación, forma de píleo, forma del pie, tipo de himenio, crecimiento del micelio *in vitro* y elementos microscópicos como hifas septadas, presencia de fíbulas, hifas y tamaño de la espora, fueron observadas mediante microscopía óptica (Microscopio Olympus). Para la observación de los caracteres se utilizó KOH 3 % y azul de lactofenol, según lo descrito en Urcelay (2012). además, se utilizó el recurso digital *Index Fungorum*.

La determinación del tamaño de las esporas se realizó por microscopía óptica en el Laboratorio de Micología y Micorrizas de la Universidad de Concepción. Las imágenes fueron sacadas mediante un microscopio óptico Olympus con cámara Canon, montada al microscopio, las imágenes obtenidas fueron apiladas mediante el programa Helicon focus (<https://www.heliconsoft.com/>) Finalmente la escala de las imágenes se realizó con el programa Image J. (<https://imagej.nih.gov/ij/>)

2.3 Cultivo *in vitro* de *Ganoderma australe*

2.3.1 Aislamiento de las cepas fúngicas

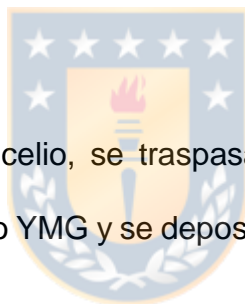
Los cultivos miceliales *in vitro* se obtuvieron de trozos de basidiomas de los diferentes ejemplares de *G. australe* recolectados en 3 diferentes localidades.

Trozos de basidiomas fueron depositados en placas petri en agar YMG (5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de extracto de malta, 15 g/L de glucosa y 20 g/L). Las placas fueron incubadas a 23 °C en una cámara de cultivo (Mermmet), en el Laboratorio de Química de Productos Naturales.

2.3.2 Cultivo en medio líquido

Una vez desarrollado el micelio, se traspasaron trozos de micelio a matraces Erlenmeyer de 1L con medio líquido YMG y se depositaron en un agitador orbital (Combi-Shaker, NB-101MT) (Fig. 5)

Luego de la formación de abundante micelio, posterior a 15 días de agitación constante el medio de cultivo fue filtrado con la finalidad de separar la biomasa del medio de cultivo líquido. La biomasa producida fue filtrada por vacío y liofilizada (Lyophilizer Cryodos, Telstar) para obtener su rendimiento final (mg/mL) (Fig. 6)



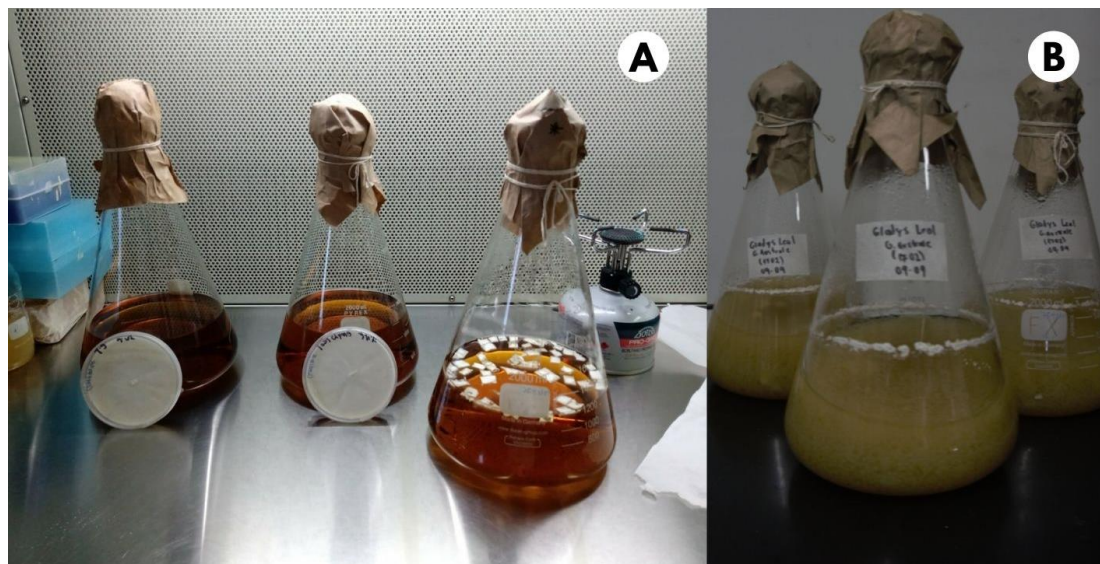


Figura 5. Cultivo micelial en medio líquido de las especies de *Ganoderma australe*. A) Inoculación en medio líquido. B) Cultivo en agitador orbital (Combi-Shaker, NB-101MT) (Fuente: Gladys Leal)





Figura 6. Obtención del cultivo líquido de *Ganoderma australe*. A) Filtración al vacío. B) Obtención de la fase líquida. (Fuente: Gladys Leal)

2.4 Extracción de metabolitos secundarios

2.4.1 Obtención del extracto total

A partir del medio de cultivo líquido se realizó una extracción líquido-líquido. El extracto total del medio de cultivo fue extraído con acetato de etilo en una proporción de 2:1 (Acetato de etilo: Medio de cultivo) obteniendo así distintas fases (una acuosa y una orgánica). La fase orgánica se recuperó y adicionó sulfato de sodio (Na_2SO_4) con el propósito de eliminar exceso de agua, luego se filtró con ayuda de un papel filtro y se llevó a sequedad mediante un rota vapor (Heidolph vv2000). Una vez obtenido el extracto

seco se obtuvo su rendimiento final (mg/mL). Finalmente, fue almacenado hasta su posterior uso a 4°C. (Aqueveque 2008) (Fig. 7)



Figura 7. Etapas para la obtención del extracto total. A) separación líquido y filtración de la fase orgánica, B) sequedad al rotavapor C) Extracto total

2.5 Análisis cromatográficos

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

Los extractos obtenidos del medio de cultivo fueron analizados por cromatografía de Gas-Espectrometría de Masas (GC-MS) (Agilent 7890, California, EE. UU.), equipado con un detector de masa Agilent 5975. Además, utiliza una columna capilar de sílice HP5-MS de 30 m x 0,25 mm de diámetro interno y una película de 0,25 μm de espesor bajo las siguientes condiciones: temperatura: 250 °C; detector (masa): 280 °C; horno: inicial de 100 °C durante 5 min, por lo que aumentó en 8 °C/min hasta 250 °C y se mantuvo durante 15 min. El detector establecido en el modo de exploración varió de 50

a 500 μm . El flujo de gas portador (grado electrónico de helio) fue de 1 mL/min. Por último, la caracterización del compuesto se realizó mediante la comparación con la base de datos NIST2017 (Torres 2017) (Fig. 8)



Figura 8: Equipo de cromatografía GC-MS. (Fuente: Gladys Leal)

2.6 Bioactividad

2.6.1 Preparación de los extractos

A partir de los extractos, una solución inicial de 400 mg/ml fue preparada en metanol (CH_3OH) y a partir de esta se realizó otra solución a una concentración de 200 mg/mL,

Ambas concentraciones fueron utilizadas en los ensayos antifúngicos, como se demuestra en el diseño experimental (Fig. 9).

2.7 Ensayo de susceptibilidad antifúngica

2.7.1 Obtención de cepas fúngicas de interés forestal

Las cepas fúngicas se obtuvieron de cepas aisladas previamente de *Diplodia seriata* y *Trichoderma sp.* Estas fueron obtenidas desde el laboratorio Silvotecnológico de la madera, perteneciente a la Facultad de Ciencias Forestales y fueron incubadas en medio MEA 2 % a 23 °C.

2.7.2 Método de difusión en agar

El ensayo se realizó utilizando la técnica de difusión en agar según lo propuesto por Aqueveque *et al.* (2008) con modificaciones. Para esto se impregnaron discos de papel estériles (Whatman AA DISCS) de diámetro 6mm con 20µL de las diferentes concentraciones de los extractos obtenidos (G1, G2, G3).

Discos impregnados con metanol fueron utilizados como control negativo para evidenciar que el solvente no ejerce inhibición en el crecimiento micelial del hongo de interés forestal.

Para el control positivo, los discos se impregnaron con 20µL de un antifúngico comercial denominado: Nipacide (Oxina de cobre (4%), Clorotalonil (0,5), Carbenzima (0,3%)).

Además, cultivos miceliales sin extractos fueron incluidos para comparar el crecimiento micelial con lo obtenido en los cultivos con extractos.

Posteriormente, se inocularon placas petri con los hongos *D. seriata* y *Trichoderma sp* y fueron incubadas a 23°C durante 6 días para *Diplodia seriata* y 4 días para *Trichoderma sp*. Tres repeticiones para cada tratamiento fueron realizadas (n=3).

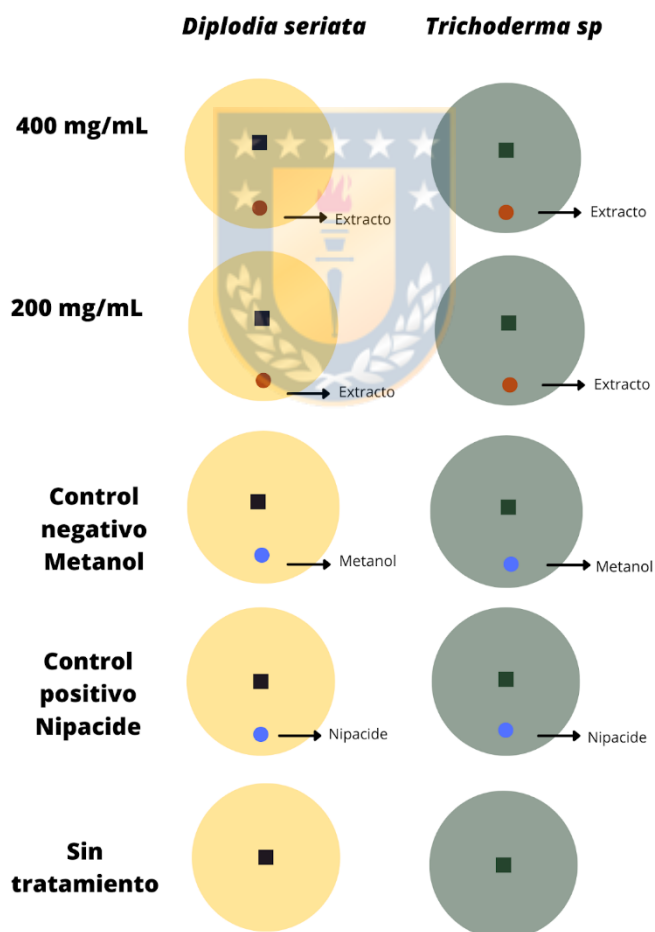


Figura 9: Diseño experimental de la prueba de susceptibilidad antifúngica con los diferentes tratamientos aplicados.

2.7.3 Ensayo de susceptibilidad antifúngica *in vitro*.

Para evidenciar la actividad antifúngica, se determinó el crecimiento micelial midiendo por el reverso de las placas mediante un pie de metro (López *et al.* 2013). De los datos de crecimiento obtenidos, se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (mm) para los tres diferentes extractos obtenidos de *G. australe*.

El diámetro de las colonias se midió en milímetros (mm) para calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento de los hongos utilizando la fórmula descrita por Becerra *et al.* (2014)

$$\% \text{ Inhibición} : \frac{\text{Crecimiento solo hongo} - \text{Crecimiento muestra}}{\text{Crecimiento solo hongo}} \times 100$$

2.7.4 Efecto fungicida o fungistático

Para determinar el efecto fungicida o fungistático de los extractos sobre los hongos de interés forestal, las placas petri que presentaron crecimiento micelial en presencia del extracto, evidenciaron efecto fungistático del extracto sobre la cepa, mientras que, en ausencia de crecimiento micelial el efecto de los extractos es fungicida (Fiallos 2019).

2.8 Análisis estadístico

A partir de los resultados de crecimiento obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento que fueron sometidos a un análisis de varianza bifactorial (ANOVA) de dos vías. Los supuestos distribucionales de normalidad de varianzas se verificaron a través de los test de Shapiro-Wilk y homocedasticidad. Se utilizó un nivel de significancia de 0,05. Los análisis fueron realizados en el programa estadístico Stata (<https://www.stata.com/>).

3 RESULTADOS

3.1 Recolección del material biológico

Los ejemplares de la especie *Ganoderma australe* fueron identificadas de acuerdo con sus observaciones macro y microscópicas. Las especies identificadas se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Registro de ejemplares fúngicos utilizados para estudios *in vitro*. (Fuente: Gladys Leal)

Especies	Código	Sitio de colecta	Coordenadas
<i>G. australe</i>	G1	Región del Maule.	36 °49'48''S 73 °01'12''O
<i>G. australe</i>	G2	Región del Biobío.	35 °43'17''S 72 °32'12''O
<i>G. australe</i>	G3	Región de Aysén.	46 °03'00''S, 72 °11'00''O

3.1.1 Características macroscópicas y microscópicas de *Ganoderma australe* G1

El cuerpo fructífero es de forma semicircular alargado, sésil, carente de pie, se encontró adherido a un árbol en descomposición del género *Quercus*, de 8 cm de ancho y 13 de longitud. Su superficie es dura y leñosa, agrietada, con líneas concéntricas, de tonalidades cafés (Fig. 10 A, B).

Presenta un himenio tubular, poroide, de superficie lisa, de color blanco a crema el que se oscurece al ser manipulado (Fig. 10 C). En cultivo *in vitro* el micelio es blanquecino, algodonoso de crecimiento radial (Fig. 10 D). Además, de las observaciones por microscopia óptica del ejemplar G1 y cultivo *in vitro*, se observaron esporas de dimensiones 10x7,3µm de forma ovoide y con ornamentaciones, ápice truncado y doble pared. Además de una coloración café (Fig. 10 E, F, G). El Sistema hifal presentó hifas generativas menores a 10µm y fíbulada (Fig. 10 E).

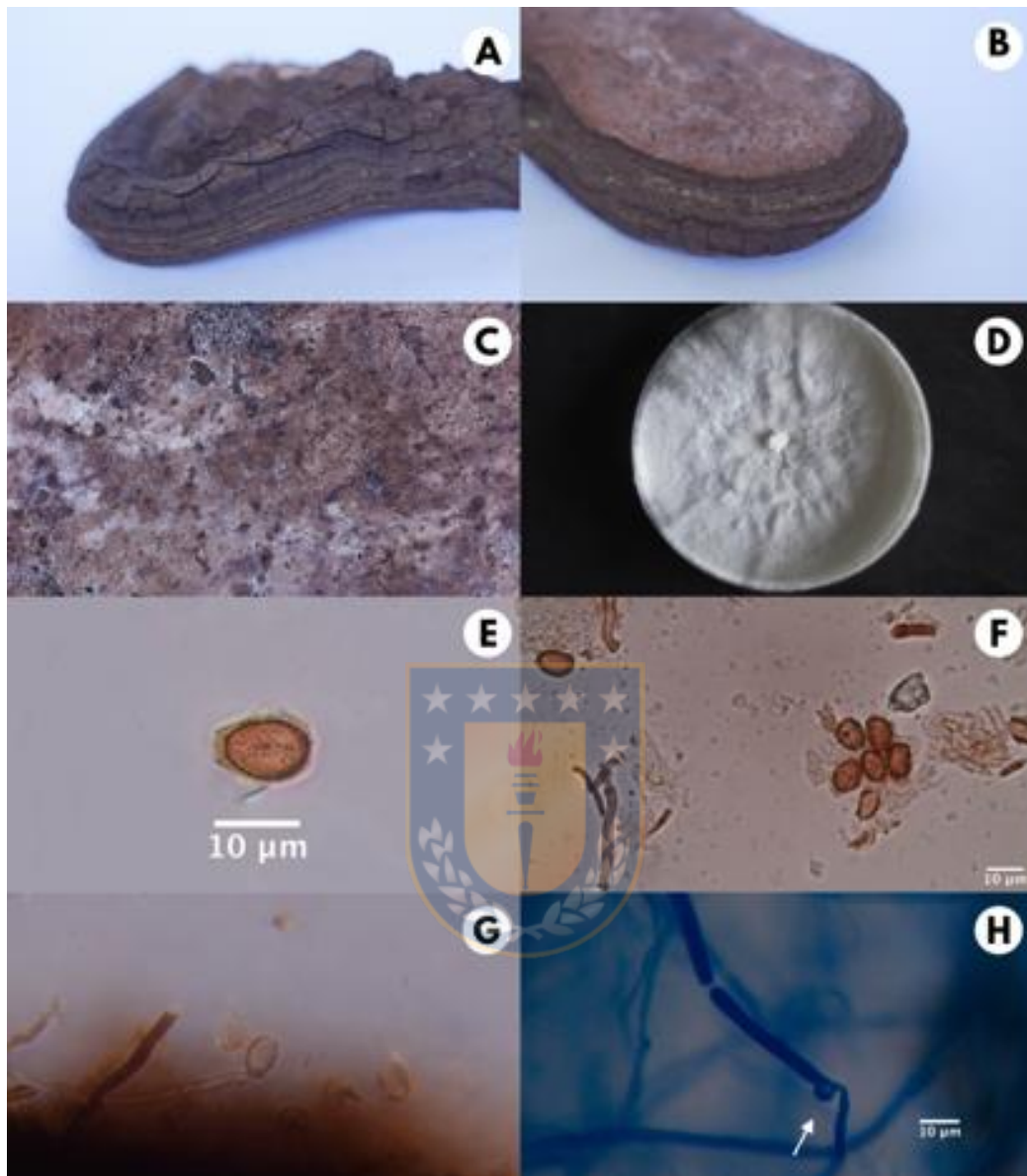
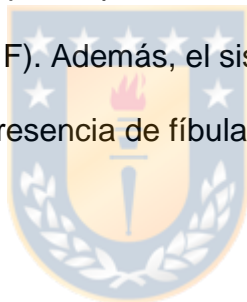


Figura 10: Macro y micromorfología de *G. australe* (G1). A, B) Basidiomas, C) Himenio, D) Cultivo *in vitro*, E, F, G) Esporas H) Hifa fíbulada (flecha de color blanca indica presencia de fíbula) (Fuente: Gladys Leal)

3.1.2 Características macroscópicas y microscópicas de *G. australe* G2

Cuerpo fructífero semicircular, sésil, carente de pie, de 18 cm de ancho y 20 de longitud. Presenta una superficie dura y leñosa, agrietada, con líneas concéntricas de tonalidades cafés. (Fig. 11 A, B). El himenio es tubular, poroide, circular de superficie lisa, de color blanco a crema (Fig. 11 C).

En cultivo *in vitro* el micelio es blanquecino, algodonoso, esponjoso y abundante de crecimiento radial con presencia de anillos concéntricos (Fig. 11D). De las observaciones por microscopia óptica del espécimen G2 y cultivo *in vitro*, se observaron basidiósporas de diámetro $10,4 \times 7,2 \mu\text{m}$, elipsoidales, u ovoides ornamentadas, con ápice truncado y doble pared. (Fig. 11 E, F). Además, el sistema hifal presentó hifas delgadas, menores a $5 \mu\text{m}$, ramificadas con presencia de fíbula (Fig. 11 G, H).



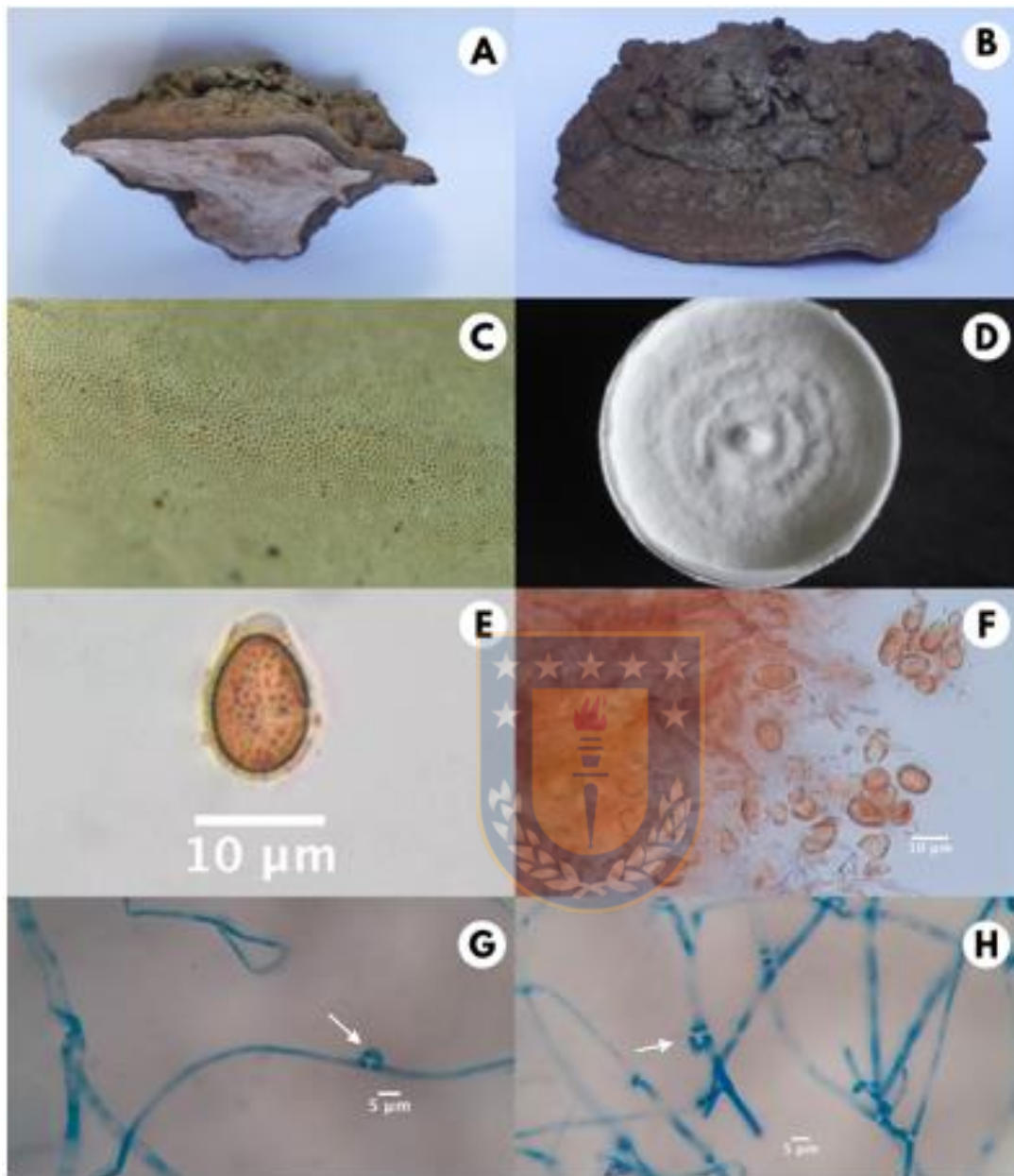


Figura 11: Macro y micromorfología de *G. australe* (G2). A, B) Basidiomas C) Himenio, D) Cultivo *in vitro*, E, F) Esporas, G, H) Hifa fíbulada (flecha de color blanca indica fíbula) . (Fuente: Gladys Leal)

3.1.3 Características macroscópicas y microscópicas de *G. australe* G3

En la figura 12 A, B se observa el basidioma con un himenio tubular, poroide y de superficie lisa y de color blanco a crema (Fig. 12 C). En cultivo *in vitro* el micelio es blanquecino, algodonoso de crecimiento radial (Fig. 12 D). Por otro lado, por microscopia óptica de G3 y cultivo *in vitro*, se observaron basidioesporas de 10,5 x 7µm, elipsoidales a oblongas, con ápice truncado, ornamentadas, con doble pared, de coloración café (Fig. 12, E). El sistema hifal presentó hifas generativas y delgadas (Fig. 12 G, H).



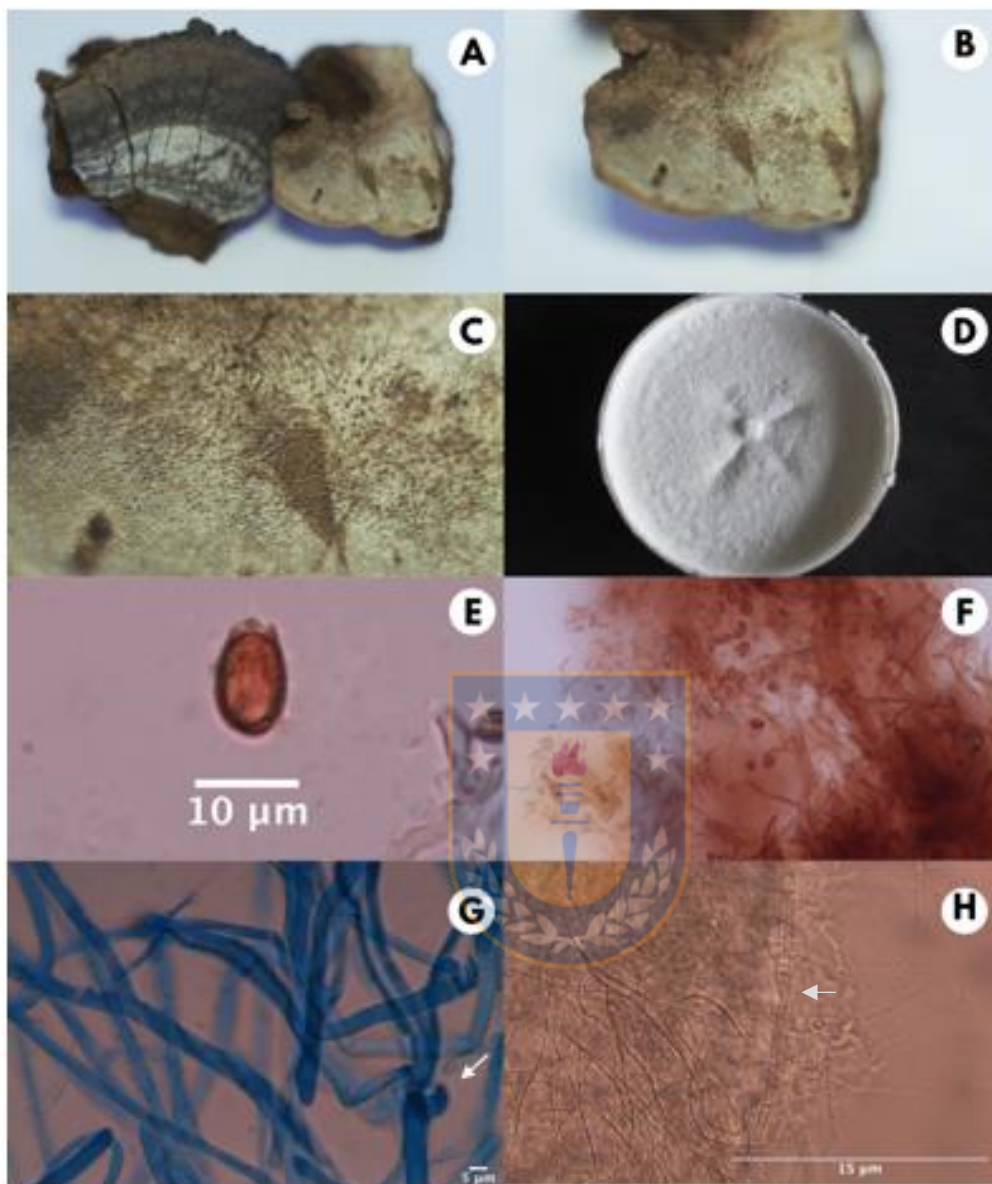


Figura 12: Macro y micromorfología de *G. australe* (G3). A, B) Basidiomas, B) Himenio, D) Cultivo *in vitro*, E, F) Esporas, G) Hifas fíbulada (flecha indica presencia de fíbula) H) Hifa septada (Flecha indica presencia de hifa septada) (Fuente: Gladys Leal)

3.2 Rendimiento del micelio

A partir de cultivos líquidos se recuperó la biomasa de *G. australe* y se obtuvo el rendimiento (mg/L)

El mayor rendimiento fue para la especie aislada de la región de Aysén mientras que la especie aislada de la región del Maule obtuvo el rendimiento más bajo. (Tabla 2)

Tabla 2: Rendimientos de micelio liofilizado (Fuente: Gladys Leal)

Código	Sitio de colecta	Rendimiento (g/L)
G1	Región del Maule	2,5
G2	Región del Bío-Bío.	3,5
G3	Región de Aysén.	5,4



3.3 Rendimiento del extracto

A partir de cultivos líquidos de *G. australe* se obtuvo el rendimiento (mg/L).

El mayor rendimiento se obtuvo para la especie aislada de la región de Aysén y los valores más bajos fue para la especie proveniente de la región del Biobío (Tabla 3)

Tabla 3: Rendimientos del extracto obtenido de ejemplares de tres regiones (Fuente: Gladys Leal)

Código	Sitio de colecta	Rendimiento (mg/L)
G1	Región del Maule	100
G2	Región del Bío-Bío.	83
G3	Región de Aysén.	106

3.4 Análisis CG-MMS de los principales compuestos

Los perfiles cromatográficos de los tres ejemplares de *G. australe*, estos muestran dos compuestos similares, el alcohol de bencilo (G1: (15,1% y 7,113 Tr), G2: (13,84% y 7,254 Tr) y G3: (22,98% y 7,321 Tr) y el 4-quinolinacarboxaldehído. (G1: (0,9% y 9,316 Tr), G2: (3,54% y 9,325 Tr) y G3: (3,34% Y 9,363 Tr)). Sin embargo, existen algunos compuestos presentes en el ejemplar de G1 y G2 que no aparece en G3, como 2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiol diisobutirato(G1: 61,5% y 10,69 Tr). G2: (y una piperazina(G1: 3,52%, 14,4 min Tr, G2: 14,8%, 14,8Tr)respectivamente.

De los extractos obtenidos del medio de cultivo de G1, se detectó la presencia de siete compuestos mayoritarios. En la Tabla 4 se muestra el el nombre del compuesto, su fórmula molecular, su masa. (u.m.a) el tiempo de retención y su composición relativa. El compuesto más abundante del extracto proveniente del cultivo G1 con tiempo de retención 10,696 min y una composición relativa de 61,5% correspondió al compuesto 2,2,4-trimetil-Diisobutirato de 1,3-pentanodiol.

Tabla 4. Principales compuestos detectados en el medio de cultivo líquido de *G. australe* (G1)

N.º	Compuestos	Fórmula molecular	m/z (u.m.a)	Tr (min)	%
1	Alcohol de bencilo.	C ₇ H ₈ O	108	7,113	15.1
2	(Z)- 2,6-dimetil-2,7-Octadieno-1,6-diol -.	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	7,633	1.1
3	4-quinolinacarboxaldehído	C ₁₀ H ₇ NO	157	9.316	0.9

4	2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiol. Diisobutirato	$C_{16}H_{30}O_4$	286	10,696	61.5
5	2,4,6-cicloheptatrien-1-ona, 2-hidroxi-.	$C_7H_6O_2$	182	11,150	1.2
6	Ciclo(L-prolil-L-valina).	$C_{10}H_{16}N_2O_2$	210	14,251	0.41
7	Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona hexahidro-3-(2-metilpropil)-.	$C_{11}H_{18}N_2O_2$	210	14,440	3.52

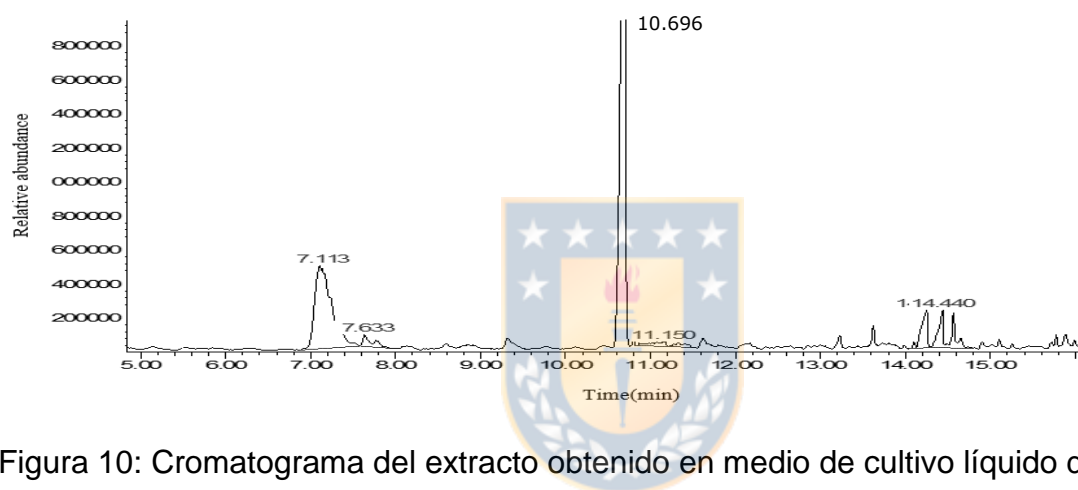


Figura 10: Cromatograma del extracto obtenido en medio de cultivo líquido de *G. australe* (G1) (Fuente: Gladys Leal).

De los extractos obtenidos del medio de cultivo de G2, se detectó la presencia de diez compuestos mayoritarios. En la Tabla 5 se muestra el nombre del compuesto, su fórmula molecular, su masa. (u.m.a) el tiempo de retención y su composición relativa. El compuesto más abundante del extracto proveniente del cultivo G2 con tiempo de retención 6,602 min y una composición relativa de 32,3% correspondió al compuesto Bencenometanol, 4-metoxi-.

Tabla 5: Principales compuestos detectados en el medio de cultivo líquido de *G. australe* (G2) (Fuente: Gladys Leal).

N.º	Compuestos	Fórmula molecular	m/z (u.m.a)	Tr (min)	%
1	2,2,2-tricloro-1-feniletanol.	C ₈ H ₇ Cl ₃ O	152	5,789	1,70
2	Benzaldehído, 4-metoxi-.	C ₈ H ₈ O ₂	279	6,139	2,26
3	Bencenometanol,4-metoxi-.	C ₈ H ₁₀ O ₂	138	6,602	32,37
4	Alcohol de bencilo.	C ₇ H ₈ O	108	7,254	13,84
5	Ácido benzoico, 4-metoxi-, éster metílico.	C ₉ H ₁₀ O ₃	300	7,803	2,74
6	Bencenoetanol, 4-hidroxi-.	C ₈ H ₁₀ O ₂	138	8,588	3,61
7	4-quinolinacarboxaldehído.	C ₁₀ H ₇ NO	157	9,325	3,54
8	Diisobutirato de 2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiol.	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	286	10,620	3,98
9	Ciclo(L-prolil-L-valina).	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	210	13,259	1,67
10	Pirrolo[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil)-.	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	210	14,488	14,89
11	9H-pirido[3,4-b]indol.	C ₁₁ H ₈ N ₂	168	14,913	2,30
12	Fenol, 3-metil-6-propil-.	C ₁₃ H ₂₀ O	181	16,710	1,33
13	Pirrolo[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil)-.	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	244	18,431	4,58
14	Ácido 1,4-bencenodicarboxílico, bis 2-etilhexil) éster.	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390	20,965	1,41
15	Ácido decanodioico, éster bis (2-etilhexílico).	C ₂₆ H ₅₀ O ₄	426	21,371	1,48

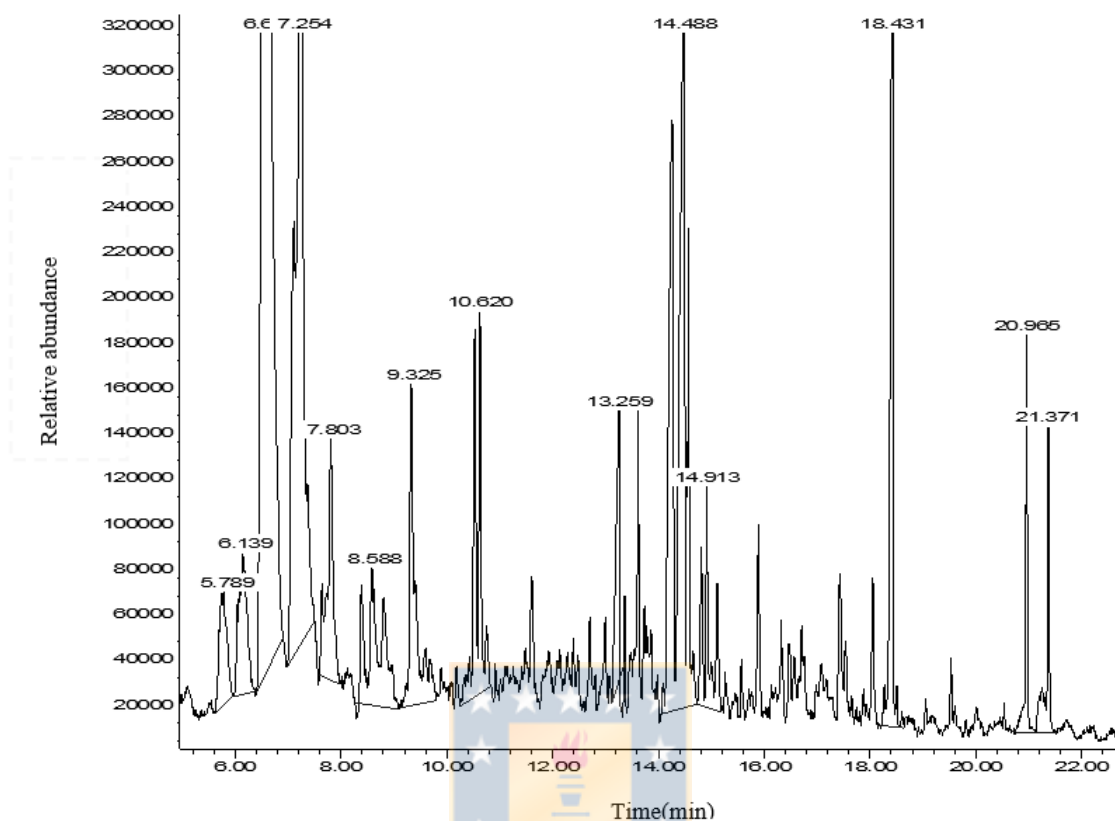


Figura 11: Cromatograma del extracto obtenido en medio de cultivo líquido de *G. australe* (G2) (Fuente: Gladys Leal).

De los extractos obtenidos del medio de cultivo de G3, se detectó la presencia de 14 compuestos mayoritarios. En la Tabla 6 se muestra el nombre del compuesto, su fórmula molecular, su masa. (u.m.a) el tiempo de retención y su composición relativa. El compuesto más abundante del extracto proveniente del cultivo G3 con tiempo de retención 7,32 min y una composición relativa de 22,96 % correspondió al compuesto Alcohol de bencilo.

Tabla 6: Principales compuestos detectados en el medio de cultivo líquido de *G. australe* (G3) (Fuente: Gladys Leal).

N.º	Compuestos	Fórmula molecular	m/z (u.m.a)	Tr (min)	%
1	(R)-(+)-1-Fenil-1-propanol.	C ₉ H ₁₂ O	136	5,751	1,92
2	Bencenometanol, 4-metoxi-.	C ₈ H ₁₀ O ₂	138	6,507	1,72
3	Alcohol de bencilo.	C ₇ H ₈ O	108	7,321	22,96
4	Biciclo [4.1.0] heptan-3-ona, 7,7-dimetil-4-metileno-, (1R)-.	C ₁₀ H ₁₄ O	150	8,918	19,34
5	4-quinolinacarboxaldehído.	C ₁₀ H ₇ NO	157	9,363	3,34
6	3-Tetradecen-5-yne, (Z)-.	C ₁₄ H ₂₄	152	9,741	2,12
7	1,3-ciclooctadieno, (Z, Z)-.	C ₈ H ₁₂	262	10,734	2,46
8	3-quinolinametanol	C ₁₀ H ₉ NO	185	11,642	1,41
9	Ciclohexeno,1-metil-3-viniloxi-.	C ₉ H ₁₄ O	168	12,162	3,09
10	Ciclo(L-prolil-L-valina).	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	210	13,287	1,29
11	N-acetiltiramina.	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	194	13,826	4,90
12	Ciclo(L-prolil-L-valina).	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	210	14,516	11,25
13	3-adamantan-1-il-butan-2-ona.	C ₁₄ H ₂₂ O	238	15,131	4,81
14	Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil)-.	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	244	18,449	3,25

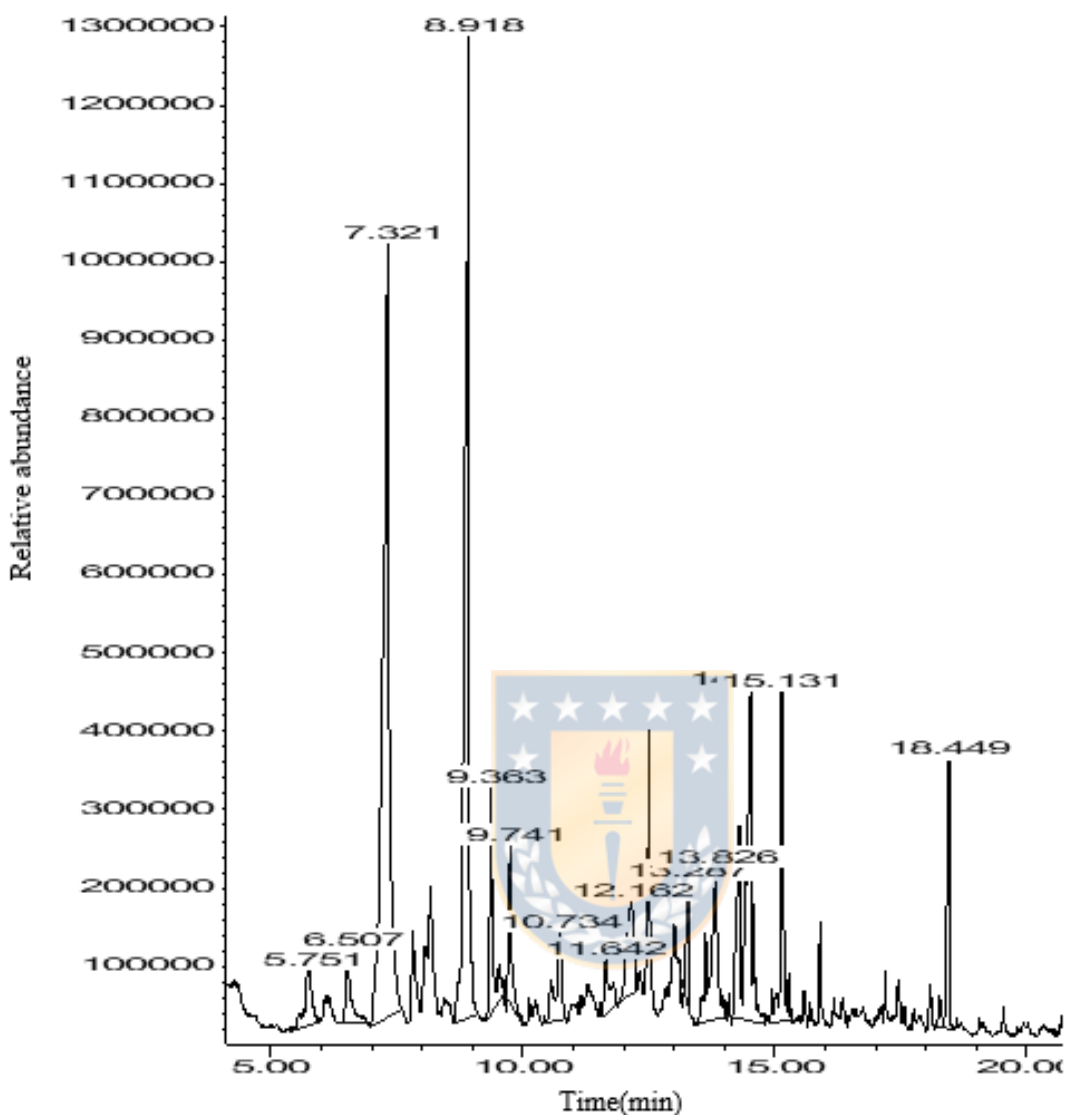


Figura 12: Cromatograma del extracto obtenido en medio de cultivo líquido de *G. australe* (G3) (Fuente: Gladys Leal).

De los extractos obtenidos del medio de cultivo, se detectó la presencia de siete compuestos. En la Tabla 7 se muestra el nombre del compuesto, su fórmula molecular, su masa. (u.m.a) el tiempo de retención y su composición relativa. El compuesto más abundante del extracto proveniente del cultivo G3 con tiempo de retención 15,064 min y

una composición relativa de 44,23% que correspondió al compuesto Ciclo(L-prolil-L-valina).

Tabla 7: Principales compuestos detectados en el medio de cultivo en ausencia de *G. australe* (Fuente: Gladys Leal).

N.º	Compuestos	Fórmula molecular	m/z (u.m.a)	Tr(min)	%
1	5-hidroximetilfurfural.	C ₆ H ₆ O ₃	126	6,205	13,17
2	Niacinamida.	C ₆ H ₆ N ₂ O	122	9,060	3,16
3	Ftalato de dietilo.	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222	10,677	1,15
4	Ciclo(L-prolil-L-valina).	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	210	13,570	5,31
5	Ciclo(L-prolil-L-valina).	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	210	15,064	44,23
6	2,5-Piperazindiona, 3-bencil-6-isopropil-.	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂	246	17,920	0,50
7	Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona hexahidro-3 (fenilmetil)-.	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	244	18,686	19,14

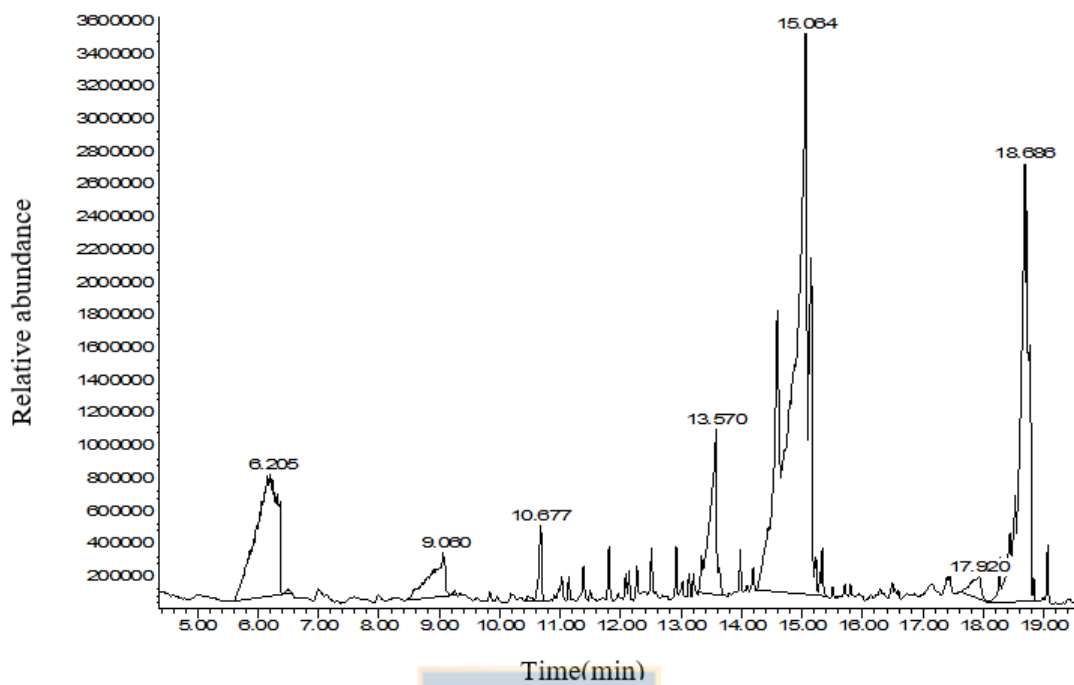


Figura 13: Cromatograma del extracto obtenido del medio de cultivo líquido en ausencia del micelio de *G. australe*.



3.5 Ensayo de susceptibilidad antifúngica

La figura 13 muestra la actividad biológica obtenida de los extractos totales de *Ganoderma australe* (G1, G2 y G3) a los 6 días de incubación para *Diplodia seriata*, en las concentraciones ensayadas de G1, G2 y G3 se observó inhibición en el crecimiento. Para el control positivo (+), el antifúngico comercial Nipacide, inhibió por completo a *D. seriata* y como control negativo (-) Metanol (MeOH) no presentó actividad (Fig. 14).

La figura 14 evidencia la actividad biológica obtenida de los extractos totales (G1, G2 y G3) a los 4 días de incubación para *Trichoderma sp.* Para G1, no presentó inhibición en el crecimiento por parte de los extractos. En G2, se presentó inhibición por parte de la concentración máxima de los extractos probados. Y para G3, se presentó inhibición solo por parte de la concentración máxima. Para el control positivo (+), el antifúngico comercial Nipacide, presento inhibición en el crecimiento de *Trichoderma sp* y como control negativo (-) Metanol (MeOH) el cual no presentó actividad (Fig. 15).

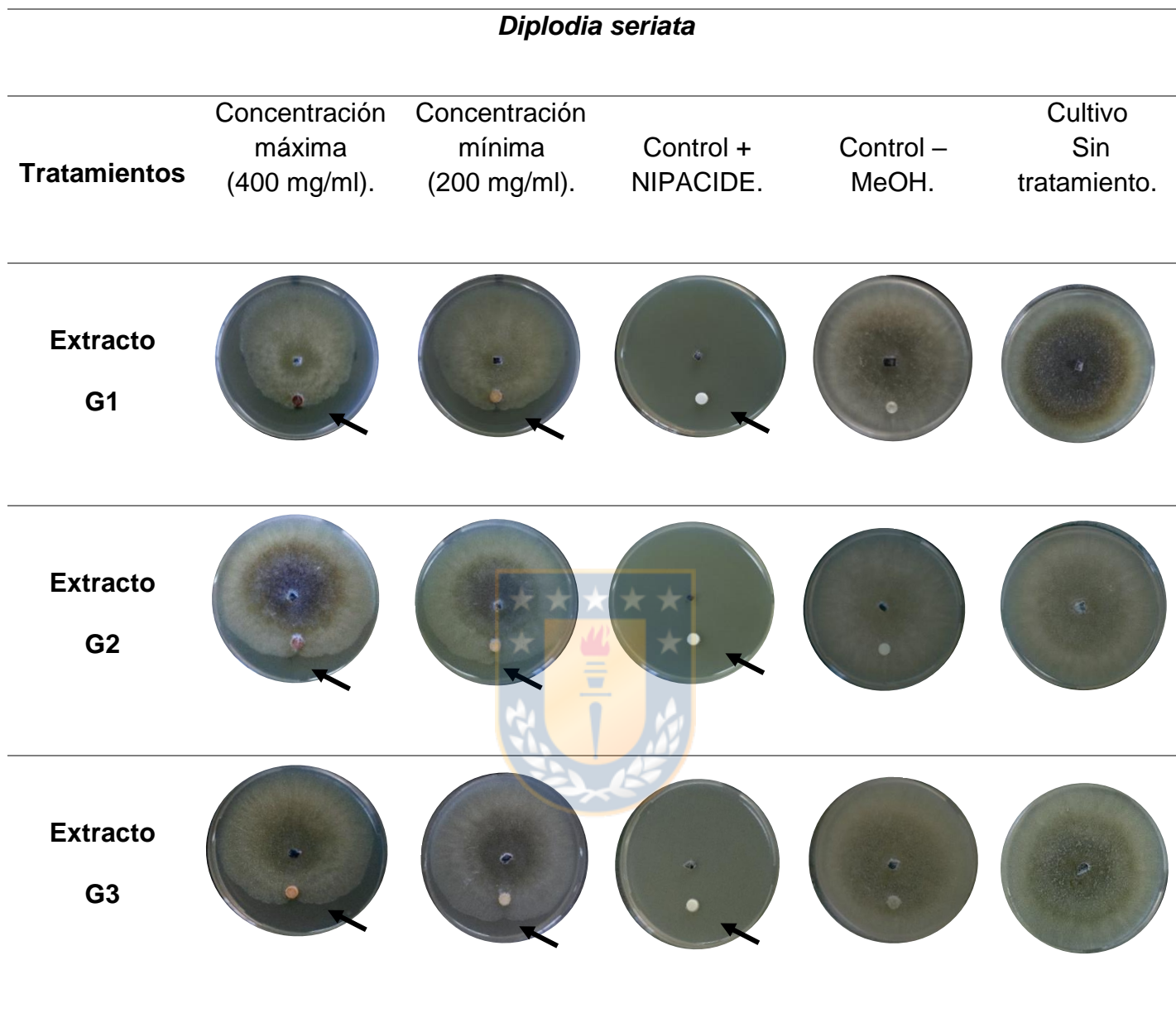


Figura 14. Crecimiento de *Diplodia seriata* frente a los distintos tratamientos utilizados. La flecha negra indica la inhibición del crecimiento micelial (Fuente: Gladys Leal).

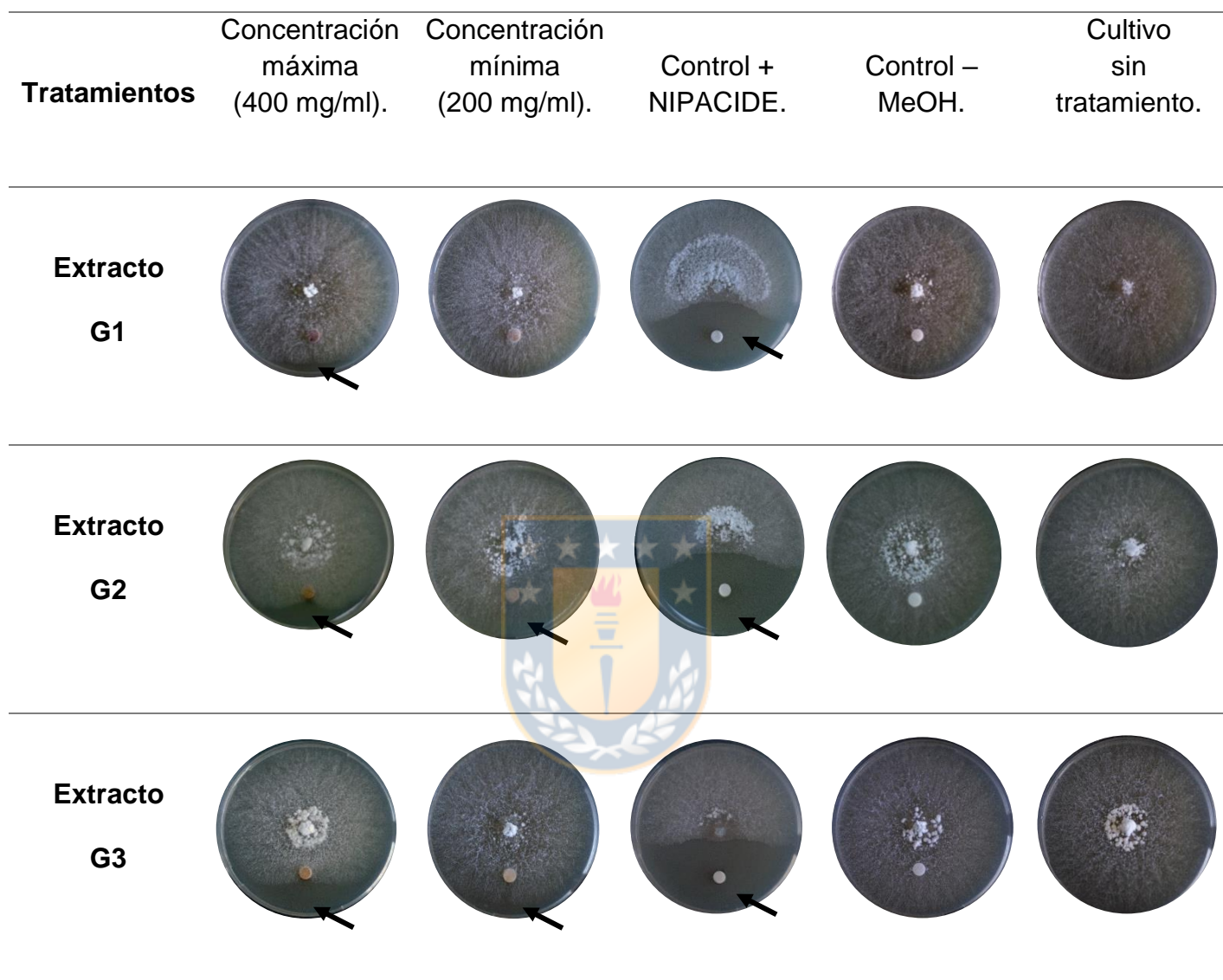
Trichoderma sp

Figura 15: Crecimiento de *Trichoderma sp* frente a los distintos tratamientos utilizados. La flecha negra indica la inhibición del crecimiento micelial (Fuente: Gladys Leal).

3.6 Porcentaje de inhibición de crecimiento de los hongos de interés forestal expuestos a dos concentraciones distintas de los ejemplares de *G. australe* (G1, G2 y G3)

El porcentaje de inhibición del crecimiento para la cepa *Diplodia seriata* a una concentración de 200 mg/mL, fue de un 18% para G1, mientras que G2 y G3 obtuvieron un 15%. Para la concentración de 400 mg/MI, la inhibición máxima fue de un 22% para G1 y la mínima fue de un 15% para G3.

Para la cepa *Trichoderma sp.* el porcentaje de inhibición a 200 mg/mL fue de un 4,7% para G3, mientras que para G1 y G2 no hubo inhibición. A 400 mg/mL el porcentaje de inhibición máxima fue de 16 % para G3 y la mínima fue de 10% para G1 (Tabla 8)

Los resultados obtenidos de inhibición señalan que, a mayor concentración, mayor es la inhibición del crecimiento por parte de las cepas; por lo tanto, se observó un efecto dependiente de la concentración.

Los extractos presentaron un efecto fungistático sobre el crecimiento micelial de los hongos de interés forestal.

Tabla 8: Porcentaje de inhibición de crecimiento para los hongos *Diplodia seriata* y *Trichoderma sp* expuestas a extractos G1, G2 y G3 de distinta concentración. Los datos representan la media de tres réplicas por tratamiento

Extracto	Cepas de interés forestal	Concentración (mg/mL)	% inhibición
G1	<i>Diplodia seriata.</i>	200	18
		400	22
	<i>Trichoderma sp.</i>	200	0
		400	10
G2	<i>Diplodia seriata.</i>	200	15
		400	17
	<i>Trichoderma sp.</i>	200	0
		400	12
G3	<i>Diplodia seriata.</i>	200	15
		400	20
	<i>Trichoderma sp.</i>	200	4,7
		400	16

3.7 Análisis estadísticos

3.7.1 Inhibición del crecimiento para *Diplodia seriata*

Tras la realización de los análisis estadísticos correspondientes, se pudo comprobar que existe un efecto significativo tanto del extracto ($p=0.012$) como la concentración ($p=0.008$) para la inhibición en el crecimiento (Anexo 3). El modelo cumple con los supuestos de normalidad ($p=0.3049$) y homocedasticidad ($p=0.0867$) (Anexo 4 y 5).

Se encontraron diferencias significativas entre los extractos G1 y G2 y entre las concentraciones (Tabla 9 y 10).

Tabla 9. Diferencias significativas entre extractos. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p<0,05$)

Extracto	Media \pm	EE	
G1	19.8 \pm	0.95	a
G2	15.5 \pm	0.92	b
G3	16.5 \pm	1.34	a,b

Tabla 10. Diferencias significativas entre concentraciones. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p<0,05$)


Concentración	Media \pm	EE	
200 mg/mL	15.7 \pm	0.78	a
400 mg/mL	18.9 \pm	1.03	b

3.7.2 Inhibición del crecimiento para *Trichoderma sp*

Tras la realización de los análisis estadísticos correspondientes, se pudo comprobar que existe un efecto significativo de la concentración ($p=0.000$), pero no del extracto ($p=0.1203$) en la inhibición del crecimiento (Anexo 6). El modelo cumple con los supuestos de normalidad ($p=0.0622$) y homocedasticidad ($p=0.0957$) (Anexo 7 y 8)

No encontraron diferencias significativas entre los extractos; sin embargo, si se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones (Tabla 11 y 12).

Tabla 11. Diferencias significativas entre extractos. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p<0,05$).



Extracto	Media	±	EE	
G1	4.83	±	2.26	a
G2	6	±	2.77	a
G3	7.5	±	3.47	a

Tabla 12. Diferencias significativas entre concentraciones. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Concentración	Media	±	EE	
200 mg/mL	0	±	0	a
400 mg/mL	12.2	±	1.14	b



4 DISCUSIÓN

4.1 Características macroscópicas y microscópicas de *Ganoderma australe*

La utilización indiscriminada de fungicidas ha generado problemas de contaminación ambiental y toxicidad, esto ha motivado la búsqueda de alternativas sustentables con el medio ambiente y no tóxicas para el control de organismos fitopatógenos que afectan plantaciones forestales de coníferas (García *et al.* 2006). Se han encontrado diversos compuestos con actividad antibacteriana, antifúngica, nematocida, insecticida, entre otros. Aislados a partir del crecimiento micelial *in vitro* de hongos en cultivo de medio líquido, al producir compuestos y difundirlos hacia los medios líquidos produciendo un alto interés en la búsqueda de productos bioactivos y fuentes de nuevas estructuras químicas y sustancias bioactivas (Aqueveque *et al.* 2010 y Liermann *et al.* 2012)

En este estudio se evaluó la actividad biológica *in vitro* de los extractos totales provenientes del medio de cultivo líquido de *G. australe* aislado de la región del Maule(G1), Biobío(G2) y de Aysén(G3)

De acuerdo con los datos obtenidos, todos los ejemplares recolectados y descritos pertenecen a la especie *Ganoderma australe* dada las características morfológicas del cuerpo fructífero las que coinciden con las reportadas en Buchanan (2001), Martínez *et al.* (1990) y Urcelay (2012). Las especies se encontraron adheridas a tocones de árboles caídos o en descomposición con basidiomas de forma semicircular y un himenio compuesto por poros de color blanco.

Los caracteres microscópicos coinciden con los reportados por Urcelay (2012) al

presentar esporas truncadas con doble pared y encontrarse dentro del rango de tamaño, además de presentar un himenio con hifas generativas con fíbulas. El crecimiento del micelio de los aislados proveniente de los cuerpos fructíferos se produjo de forma uniforme y radial en el agar corroborando lo descrito en Oliveira (2001) que menciona que el micelio está constituido por hifas que se ramifican en múltiples direcciones extendiéndose en el sustrato que utiliza como alimento. Además, hace referencia al aspecto del micelio, el que describe de aspecto algodonoso y de coloración blanca, lo que concuerda con lo observado en esta investigación para *Ganoderma australe*.



4.2 Rendimientos

Con respecto al rendimiento de la biomasa del micelio obtenida para los tres ejemplares, estos presentaron distintos valores, lo que puede ser explicado según lo mencionado en Aqueveque (2008) que el origen geográfico, hábitat y sustrato influye directamente en la fisiología fúngica y el perfil de los compuestos secundarios producidos. Un estudio realizado por Rodríguez (2010) menciona que en la obtención de biomasa para *G. lucidum* en un medio estandarizado se obtienen aproximadamente 10.000 mg/L bajo temperatura controlada a 28°C, en agitación por 10 días obteniendo mayor biomasa en menor tiempo.

Las diferencias obtenidas en los rendimientos pueden ser debidas a que durante la fase de crecimiento las enzimas involucradas en la degradación de polímeros son liberadas al medio facilitando la movilización de nutrientes hacia el interior del micelio en crecimiento. La liberación de las enzimas al exterior de la célula es de importancia, dado que, debido al alto peso molecular de los polímeros de los cuales obtiene los nutrientes no pueden ingresar a la célula tal cual, solo serán incorporados cuando sean degradados por las enzimas degradativas extracelulares, además los metabolitos secundarios son producidos al final de la fase de crecimiento o cuando el crecimiento es limitado por el sustrato (Sivori 1999; Cepero de García 2012).

4.3 Análisis cromatográficos

El análisis detallado de los perfiles cromatográfico en general, no mostraron un patrón similar en cuanto a la abundancia relativa de los compuestos. Sin embargo, los extractos G1, G2 y G3 mostraron que los extractos de los ejemplares aislados de la costa de las regiones pertenecientes a la zona mediterránea (G1, G2) presentaron compuestos en común que no se encontraron en el ejemplar aislado cercano a la cordillera en la zona austral (G3). Un estudio realizado por Aqueveque 2008, menciona que la composición química de cepas de *Ganoderma australe* aisladas de la zona mediterránea no variaron considerablemente sus perfiles cromatográficos, independientemente del sustrato o lugar de recolección.

Dentro de los compuestos hallados en los extractos se encontraron dicetopiperazinas. Estos compuestos corresponden a dipéptidos cíclicos formados por dos aminoácidos unidos por un enlace peptídico, se encuentran presentes en una gran cantidad de organismos, y en general es difícil determinar si son productos de la degradación de proteínas y péptidos o si son sintetizadas de *novo* por el ejemplar en cuestión (Anke y Weber 2009; Borthwick 2012)

Es por esto que se realizó el análisis de los perfiles cromatográficos presente solo en el medio de cultivo (cultivo sin micelio) para determinar si los compuestos y dicetopiperazinas presentes en el extracto de cultivo donde se emplea extracto de levadura son producto de la degradación de las proteínas del mismo medio o si son realmente sintetizadas de *novo* por las especies en estudio (Wang *et al.* 2010)

Se encontraron dicetopiperazinas en el medio de cultivo entre el tiempo de retención 13-18,6 min, de igual forma esta se encontraban en G1 en el min 14,2 y G2 en el min 13,2 y 18,4 y G3 a los minutos 13,2, 14,5, 18,4. No obstante, se identificó una dicetopiperazina que se encontraba solo en G1 y G2 a los 14,4 minutos, la Pirrolo[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil)-.

En cuanto a la producción de metabolitos secundarios, se destaca la presencia de compuestos orgánicos volátiles. Los hongos emiten COVs que incluyen alcoholes, benzenoides, aldehidos, alcanos, ácidos, ésteres, terpenoides y cetonas, entre otros. Algunos estudios han señalado el papel de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) como efectivos agentes de biocontrol, al presentar un efecto antifúngico, por ejemplo, *Trichoderma* inhibe el crecimiento de *Rhizoctonia solani* y en experimentos *in vivo* e *in vitro* el 5-pentil-2-furaldehído de *Oxysporus latemarginatus*, detiene el crecimiento de *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, y especies de *Alternaria*, *Colletotrichum* y de *Fusarium* (Mendoza *et al.* 2017).

En los tres extractos se identificó la presencia del Alcohol de bencilo, un alcohol aromático. En un estudio realizado por (Sinuco 2017) se encontró que COVs liberados por *Trichoderma viride* como: γ butirolactona, 6-pentil-2H-piran-2-ona, alcohol bencílico, alcohol 2-feniletílico, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol y benzaldehído son posibles responsables de la actividad antifúngica, afectando el crecimiento de los hongos fitopatógenos evaluados.

Además, se encontró la presencia del compuesto 4-quinolinacarboxaldehído en los tres extractos. Según lo mencionado en Rassoli *et al* (2006), los aldehídos son los principales

causantes de la inhibición fúngica debido a la alta reactividad (oxidación, reducción, hidratación, acetilación, etc.) y pueden participar en varias rutas bioquímicas produciendo transformaciones de variados compuestos orgánicos, los cuales pueden inducir a la inhibición del crecimiento de microorganismos.

En este estudio a pesar de encontrar compuestos en común de los extractos aislados de tres regiones, se observan diferencias por lo que se confirma la influencia del hábitat y ubicación geográfica en la producción de metabolitos secundarios (Aqueveque 2008).

4.4 Ensayo de susceptibilidad antifúngica

En la actualidad los estudios están enfocados en la extracción, análisis e identificación de múltiples compuestos aislados de origen natural. Sin embargo, no basta con identificar un gran número de metabolitos, sino también de establecer la actividad biológica que presentan dichos compuestos (Sinuco *et al.* 2017).

De acuerdo a los datos obtenidos las concentraciones de 200 mg/mL y 400 mg/mL evaluados, tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Diplodia seriata*. Sin embargo, *Trichoderma sp* presentó un comportamiento distinto al solo inhibir el crecimiento en bajo porcentaje a la concentración más alta. *Diplodia seriata* fue el hongo más susceptible a la acción antifúngica de los extractos. Los resultados hallados por Fiallos (2019) reporta que a las concentraciones al 20% (6,8 mg/mL), 15% (5,1 mg/mL), 10% (3,4 mg/mL), 5 % (1,7 mg/mL), 1% (0,34 mg/mL), 0,5 % (0,17 mg/mL) se generó una inhibición dependiente de la concentración.

No se han observado estudios en los que se emplee el extracto desde el medio de cultivo líquido de *Ganoderma australe* como inhibidores del crecimiento *in vitro* de los hongos *Diplodia seriata* y *Trichoderma sp.*

Palacios *et al* (2011), evaluó la actividad del extracto de *Ganoderma sp.* para el control de los hongos *Curvularia clavata* y *Phytophthora nicotinae* generando una inhibición de 48% y 53,3% respectivamente. A pesar de que es bajo en contraste a los porcentajes registrados para otras cepas, es similar a los resultados obtenidos con el uso del tratamiento convencional con tebuconazol el cual inhibe un 57,4% (Fiallos 2019).

De manera similar Smania *et al.* (2003) evidenció la inhibición del crecimiento de *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum cannis* relacionados con cuadros micóticos en humanos al utilizar una concentración del extracto de 0,5 a 1 mg/mL, respectivamente. Fiallos (2019) evaluó la actividad de extractos etanólicos a partir del carpóforo de *Ganoderma australe* para inhibir el crecimiento de *Aspergillus terreus* y *Scopulariopsis breviacaulis*. a concentraciones de 5,1 mg/mL y 6,8 mg/mL, respectivamente.

Cabe destacar que la concentración requerida para inhibir patógenos difiere de acuerdo al mecanismo de acción del antifúngico y a su vez esto depende del lugar en el que actúen (sobre la membrana celular del hongo, pared celular o núcleo de la célula fúngica), lo cual está relacionado con la estructura química del antifúngico (Gregorí 2005; Walsh *et al.* 2008).

En cuanto a la actividad fungicida y fungistática; las concentraciones de 200 y 400 mg/mL mostraron tener un efecto fungistático sobre la cepa fúngica de *Diplodia seriata*, mientras que sólo a una alta concentración (400 mg/ml) se observó un efecto fungistático en

Trichoderma sp. El uso de estas concentraciones afectó a los procesos relacionados con el crecimiento, desarrollo y germinación de esporas (Veloz-García *et al.* 2010).

Es de importancia considerar que la producción de un metabolito está ligada a una serie de factores tales como PH, temperatura, salinidad. (Salgado 2013) pudiendo ser estos factores considerados en un próximo estudio para la obtención de metabolitos de variada naturaleza estructural.

5 CONCLUSIONES

Los ejemplares aislados de diferente distribución geográfica fueron caracterizados tanto macro como microscópicamente y de acuerdo con sus caracteres taxonómicos la especie en estudio fue identificada como *Ganoderma australe*.

En todos los extractos obtenidos se encontraron compuestos con actividad inhibitoria, presentando en común compuestos como 4-quinolinacarboxaldehído y de naturaleza aromática como el alcohol de bencilo.

Para los tres extractos ensayados se observó una actividad diferenciada frente a los hongos de interés forestal, siendo G1 el extracto de mayor acción antifúngica contra *D. seriata* y G3 el extracto en la concentración de 400 mg/mL presentó la mayor actividad para *Trichoderma sp.*

Los extractos obtenidos de *G. australe* presentaron un efecto fungistático en hongos de interés forestal siendo *Diplodia seriata* la cepa más sensible a la acción de estos extractos.

Se acepta la hipótesis planteada en este estudio sobre el efecto inhibitorio en el crecimiento de hongos de interés forestal de los extractos provenientes de *G. australe*. Los resultados de la investigación revelan que durante el desarrollo del micelio de *Ganoderma australe* en cultivos *in vitro*, metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas son liberados al medio de cultivo por lo que es un proceso biológico efectivo para la obtención de metabolitos bioactivos a partir de una fuente de origen natural.



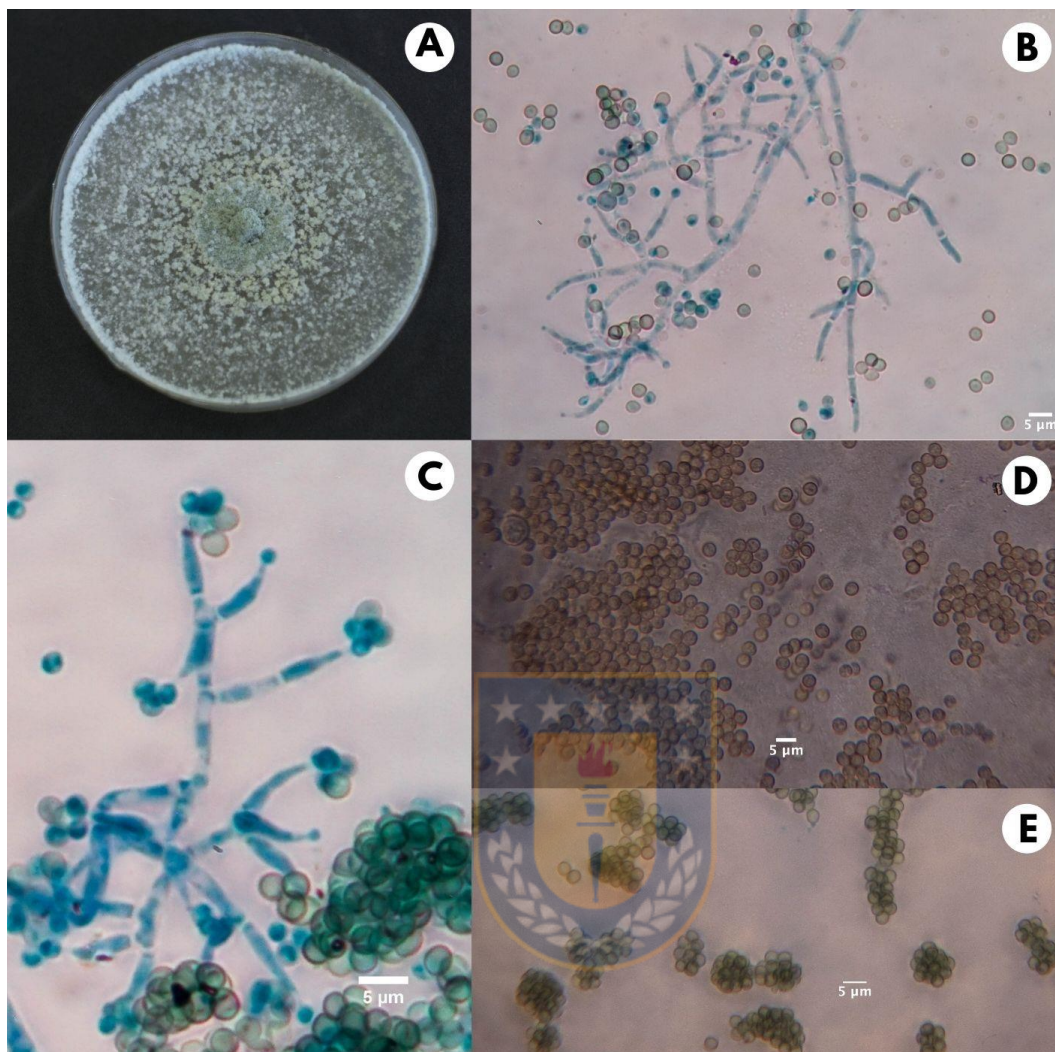
6 ANEXOS

6.1.1 Hongos causantes de la alteración estética de la madera de coníferas

6.1.2 Características macroscópicas y microscópicas de *Trichoderma sp*

Del cultivo *in vitro* de *Trichoderma sp* se observó un crecimiento micelial blanquecino con una pigmentación conidial de tonalidades de verde claro a verde oscuro (Anexo 1, A). De la observación microscópica presentaron un sistema hifal septado (Anexo 1, B) con conidióforos ramificados, que terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios (Anexo 1, C). Asimismo, las conidioesporas presentan una forma circular de 3,09 μm (Anexo 1, D, E).

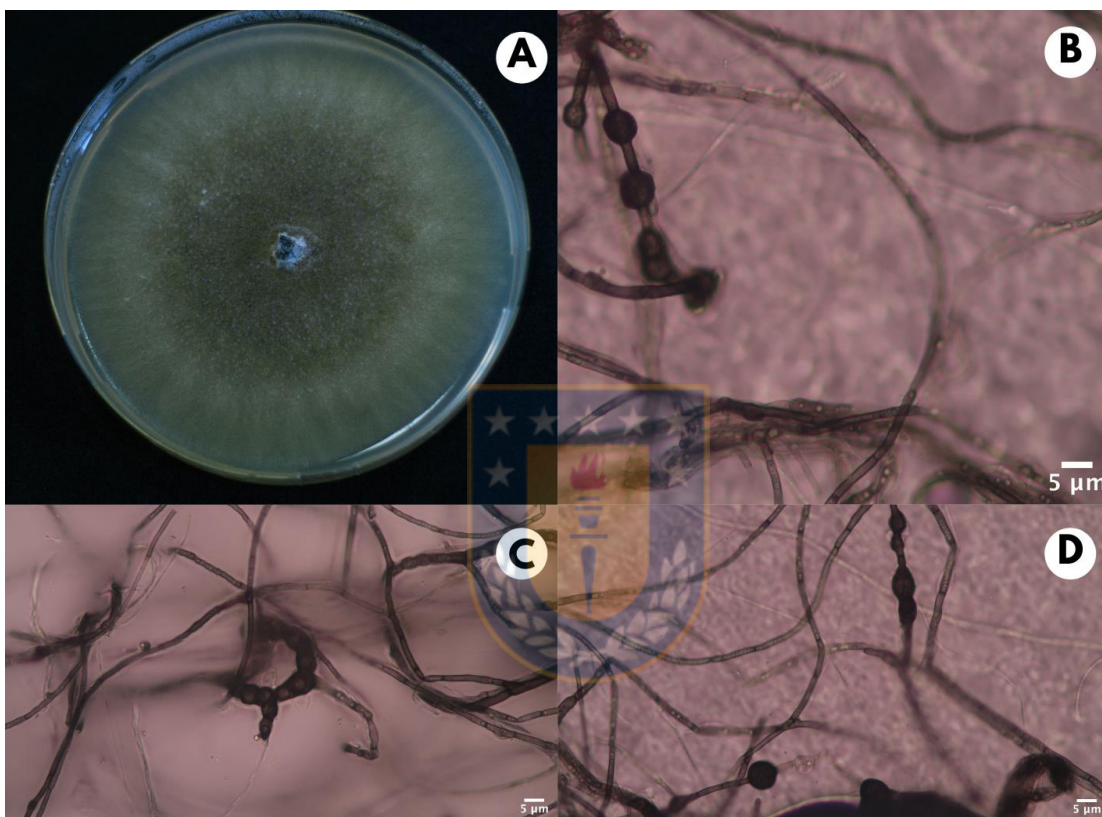




Anexo 1: Macro y micromorfología de *Trichoderma* sp. A) Cultivo *in vitro* B) Sistema hifal septado, C) Conidioforo (flecha blanca indica conidióforo, flecha negra indica fiálide) D, E) Conidiosporas (Fuente: Gladys Leal).

6.1.3 Características macroscópicas y microscópicas de *Diplodia seriata*

Del cultivo *in vitro* de *Diplodia seriata* se observó una pigmentación conidial dematiácea debido a la presencia de melanina (Anexo 2).



Anexo 2: Macro y micromorfología de *Diplodia seriata*. A) Cultivo *in vitro*, aspecto algodonoso B, C, D) micelio ramificado con hifas dematiáceas (Fuente: Gladys Leal)

6.1.4 Análisis estadístico.

6.1.5 Inhibición en el crecimiento de *Diplodia seriata*

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob>F
Model	110.27778	5	22.055556	4.62	0.0140
concentra~n	46.722222	1	46.722222	9.78	0.0087
iextracto	61.777778	2	30.888889	6.47	0.0124
concentra~n#iextracto	1.777778	2	.8888889	0.19	0.8326
Residual	57.333333	12	4.7777778		
Total	167.61111	17	9.8594771		

Anexo 3: Análisis de la varianza



Verificación de supuestos:

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
resid	18	0.94130	1.290	0.510	0.30492

Anexo 4: Test de Normalidad. Shapiro-wilk

White's test for Ho: homoskedasticity
against Ha: unrestricted heteroskedasticity

chi2(5) = 9.62
Prob > chi2 = 0.0867

Anexo 5: Homocedasticidad.

6.1.6 Inhibición en el crecimiento de *Trichoderma sp.*

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob>F
Model	715.11111	5	143.02222	33.87	0.0000
concentra~n	672.22222	1	672.22222	159.21	0.0000
iextracto	21.444444	2	10.722222	2.54	0.1203
concentra~n#iextracto	21.444444	2	10.722222	2.54	0.1203
Residual	50.666667	12	4.2222222		
Total	765.77778	17	45.045752		

Number of obs = 18 R-squared = 0.9338
Root MSE = 2.0548 Adj R-squared = 0.9063

Anexo 6: Análisis de la varianza

Verificación de supuestos:

```
swilk resid
```

```
Shapiro-Wilk W test for normal data
```

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
resid	18	0.90198	2.155	1.536	0.06222

Anexo 7: Test de Normalidad. Shapiro-wilk

```
White's test for Ho: homoskedasticity
against Ha: unrestricted heteroskedasticity
```

```
chi2(5)      =      9.36
Prob > chi2  =      0.0957
```



7 REFERENCIAS

Anke, T., & Weber, D. (2009). *The Mycota XV Physiology and Genetics*. Springer-Verlag

Berlin Heidelberg.

Anke, T., Oberwinkler, F., Steglich, W., & Schramm, G. (1977). The strobilurins: new antifungal antibiotics del basidiomiceto *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.) Sing. *Journal of Antibiotics*, 30, 806-810. 10.7164/antibiotics.30.806.

Aqueveque, P. (2008). *Metabolitos secundarios aislados de Basidiomicetes asociados a bosques de la región del Bio-Bio*. Universidad de Concepción: http://repositorio.udec.cl/xmlui/bitstream/handle/11594/5428/Tesis%20Aqueveque_m_p.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Aqueveque, P., Anke, T., & Sáez, K. (2010). Antimicrobial activity of submerged cultures of Chilean basidiomycetes. *J. Antibiótico*, 76(15), 806–810. 10.1055/s-0030-1249853.

Arispe, J., Sánchez, A., & Galindo, M. (2021). Microbiota Fúngica en Quesos Artesanales en Saltillo, Coahuila, México. *Revista ION*, 34(1), 7-13. <https://doi.org/10.18273/revion.v34n1-2021001>.

Barreiro, S., & Hirsch, T. (2011). *Protección de la madera [Tesina de grado]*. Universidad de la República: <https://hdl.handle.net/20.500.12008/4703>

Becerra, J., Silva, M., & Becerra, J. (2014). Efecto de la radicación UVB en el crecimiento y Actividad Biológica de Hongos Saprófitos subantárticos de Chile. *Revista latinoamericana de Química*, 42, 77-81.

Bermeo, Y. (2018). *Biodegradación de recursos procedentes de una línea de producción de laminados empleando Trichoderma sp.* Universidad Politécnica Salesiana: <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15742>

- Boh, B., Berovic, M., Zhang, J., & Lin, Z. (2007). *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology Annual Review*, 13, 265-301. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(07\)13010-6](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(07)13010-6).
- Borthwick, A. (2012). 2, 5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. *Chemical Reviews*, 112(7), 3641-3716. <https://doi.org/10.1021/cr200398y>.
- Bruinsma, J. (2003). *World agriculture: towards 2015/2030. An FAO perspective*. Earthscan.
- Buchanan, P. (2001). *A taxonomic overview of the genus Ganoderma with special reference to species of medicinal and nutraceutical importance*. Proc. Int. Symposium *Ganoderma Sci.*
- Carrillo, L. (2018). *Metabolitos secundarios de hongos endófitos y fitopatógenos*. Universidad Nacional de Jujuy.
- Cepero De García, M., Restrepo, S., Franco, A., Cárdenas, M., & Vargas, N. (2012). *Biología de Hongos*. Ediciones Uniandes.
- CIEFAP. (2013). *Cronograma de cosecha para lograr trozas libres de manchas de albura*. *Boletín informativo*. <https://docplayer.es/31413364-Cronogramas-de-cosecha-para-lograr-trozas-libres-de-manchas-de-albura.html>
- Crous, P., Slippers, B., Wingfield, M., Rheeder, J., Marasas, W., Philips, A., . . . Groenewald, J. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55, 235–253. 10.3114/sim.55.1.235.
- Durán, A., Gryzenhout, M., Slippers, B., Ahumada, R., Rotella, A., Flores, F., . . .

- Wingfield, M. (2008). *Phytophthora pinifolia* sp. nov. associated with a serious needle disease of *Pinus radiata* in Chile. *Plant Pathology*, 57(4), 715-727. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01893.x>.
- Fiallos, K. (2019). *Extractos etanólicos de Ganoderma australe y Pycnoporus sanguineus como inhibidores de crecimiento in vitro de Scopulariopsis brevicaulis y Aspergillus terreus causales de micosis en humanos*. Universidad Central del Ecuador: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/19940>
- Gamarra, J. (2015). *Biocontrol de hongos manchadores en la madera de Brosimum alicastrum (Congona)*. Universidad Nacional Agraria La Molina: <https://hdl.handle.net/20.500.12996/2225>
- García, R., Riera, R., Zambrano, C., & Gutiérrez, L. (2006). Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. *Revista Científica Latinoamericana*, 10 (2), 115-121. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209116102005>.
- Ghorashi, S., Bucke, C., & Keshavarz, T. (2003). *Isolation of Biologically Active Compounds from Ganoderma sp.* . d International Conference on Medical Mushroom and The International Conference on Biodiversity and Bioactive Compounds.
- Gregorí, B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2), http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=.
- Hongos Chile. (2012). *Fungi austral*. https://issuu.com/hongos.cl/docs/lib_hongos_baja/132

- Howell, C. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87(1), 4-10. <https://doi.org/10.1094/pdis.2003.87.1>.
- Instituto Forestal de Chile [INFOR]. (2020). *El sector forestal chileno 2020*. INFOR.
- Lehmkuhl, A. (2000). *Esteróis e triterpenos de Ganoderma australe (fr.) Pat. Com perspectivas de uso medicinal*. Universidade Federal de Santa Catarina: <http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/78905>
- Leyva Mir, S., Mariscal, L., Villaseñor Mir, H., & Huerta, J. (2011). *Diplodia sp.*, Causante de la Pudrición de Grano de Avena (*Avena sativa*) en Nanacamilpa, Tlaxcala, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29, 81- 83. scielo.org.mx/pdf/rmfi/v29n1/v29n1a11.pdf.
- Liermann, J., Thines, E., Opatz, T., & Anke, A. (2012). Dri mane sesquiterpenoids from *Marasmius sp.* inhibiting the conidial germination of plant-pathogenic fungi. *J Nat Prod*; 75, 1983–6. [10.1021/np300337w](https://doi.org/10.1021/np300337w).
- Liu, X., Dong, X, Chen, M., Jiang, X., & Liv, J. (2008). Antimicactivity of an endophytic *Xylaria sp.* YX-28 and identification antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. *EE. UU. Appl. MicrBiotechnol*, 78 (2), 241-247. 2008.
- López, S., Greslebin, A., González, S., & Pildain, M. (2013). Efecto del potencial agua y de la defensa primaria del hospedante sobre el crecimiento de *Amylostereum areolatum* y *A. chailletii*, simbiontes fúngicos de los sirícidos, y estudio de la microbiota . *Bosque*, 34, 161-171. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002013000200005>.

- Martínez, B., Infante, D., & Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30, 11-22. <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/view/617>.
- Martínez, T., Barrasa, J., Almendros, G., & González, A. (1990). *Fungal transformation of lignocellulosics as revealed by chemical and ultrastructural analyses*. https://www.researchgate.net/publication/291799090_Fungal_transformation_of_lignocellulosics_as_revealed_by_chemical_and_ultrastructural_analysesrecent_advances_on_fungal_treatment_of_lignocellulosic_materials
- Mendoza, M., Martínez, M., López, J., & Beltrán, E. (2017). Funciones biológicas de los compuestos orgánicos volátiles de hongos. *Biológicas*, 19(1), 14–21. <https://biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=268&path%5B%5D=444506>.
- Mondragón, A., Rodríguez, G., Gómez, N., Guerra, J., & Fernández, S. (2021). Botryosphaeriaceae: una familia de hongos, compleja, diversa y cosmopolita. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(4), 643-654. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i4.2620>.
- Nieto, I., & Valencia, M. (2002). Esteroles, ácidos grasos e hidrocarburos de los cuerpos fructíferos de *Ganoderma australe*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 47(4), 511-516. <http://dx.doi.org/10.4067/S0366-16442002000400023>.
- Oliveira, E. (2001). *Influencia do ph e concentração inicial de glicose na produção de biomassa do fungo Ganoderma australe (Fr.) Pat.* Universidad Federal De Santa Catarina.

Osmose. (s.f.). *Madera tratada con CCA*. <http://www.osmose.cl/cca/>

Palacios, J., Romeu, C., Ramírez, R., Leliebre, V., & Ortiz, J. (2011). Actividad antifúngica in vitro de extractos de *Navisporus floccosus* y *Ganoderma sp.* contra hongos fitopatógenos. *Fitosanidad*, 15(2), 123-128. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209122297008>.

Phillips, A., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M., Groenewald, J., & Crous, P. (2013). The Botryosphaeriaceae: géneros y especies conocidos por cultivo. *Estudios en Micología*, 76, 51-167. 10.3114/sim0021.

Rassoli, R., & Allamend, A. (2006). Ultraestructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essentials oils on listeria monocytogenes. *Int. J. Infect Dis.*, 10(3), 236-241. 10.1016/j.ijid.2005.05.006.

Rodríguez, M. (2010). *Evaluación de metabolitos de Ganoderma lucidum con actividad antifúngica frente a aislamientos humanos y animales de Aspergillus spp. Y dermatófitos*. Pontificia Universidad Javeriana. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8469/tesis433.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Salgado, F. (2013). *Obtención de metabolitos secundarios a partir de especies de mycena (Basidiomycota, Agaricales) para el control de hongos fitopatógenos*. <http://repositorio.udec.cl/xmlui/bitstream/handle/11594/5422/Resumen.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Sánchez, G., Vargas, A., & Jiménez, P. (2015). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de dos morfotipos de *Raphanus raphanistrum* L. sobre tres

- hongos fitopatógenos. *Bioagro*, 27(1), 2-10.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612015000100001.
- Schirp, A., Farrell, R., Kreber, B., & Singh, A. (2003). Advances in understanding the ability of sapstaining fungi to produce cell wall degrading enzymes. *Wood and Fiber Science: Journal of the Society of Wood Science and Technology*, 35(3), 434-444. <https://wfs.swst.org/index.php/wfs/article/download/687/687>.
- Schmidt, O. (2006). *Wood and tree fungi: biology, damage, protection, and use*. Springer.
- Seifert, K. (1993). Sapstain of commercial lumber of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. En M. Wingfield, K. Seifert, & J. Webber., *Ceratocystis and Ophiostoma: taxonomy, ecology, and pathogenicity* (págs. 141-151). American Phytopathological Society, St Paul.
- Servicio Agrícola y Ganadero [SAG]. (s.f.). *¿Por qué no se pueden ingresar algunos productos de origen animal y vegetal a Chile?*. <https://bit.ly/3uRQeWw>
- Sharma, C., Bhardwaj, N., Sharma, A., Tuli, H., Batra, P., Beniwal, V., . . . Sharma, A. (2019). Bioactive metabolites of *Ganoderma lucidum*: factors, mechanism and broad spectrum therapeutic potential. *Journal of Herbal Medicine*, 17, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100268>.
- Sinuco, D., Pérez, A., & Moreno, N. (2017). Evaluación de la actividad fungicida e identificación de compuestos orgánicos volátiles liberados por *Trichoderma viride*. *Rev. Colomb. Biotecnol*, (1), 63–70. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.659>.

- Sivori, S. (1999). *Estudio identificación de enzimas extracelulares en Ascobolus gamundii*. Universidad de Buenos Aires: https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n3211_Sivori.pdf
- Slippers, B., & Wingfield, M. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and their impact. *Fungal Biology Reviews*, 21(2-3), 90-106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>.
- Slippers, B., Crous, P., F, J., Groenewald, J., & Wingfield, M. (2017). Diversity in the botryosphaeriales: lookingback, looking forward. *Fungal Biology*, 121(4), 307-321. [10.1016/j.funbio.2017.02.002](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.02.002).
- Smania, A., Monache, F., Smania, A., Yunes, A., & Cuneo, S. (2003). Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. *Fitoterapia*, 74(4), 375-377. [10.1016/s0367-326x\(03\)00064-9](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(03)00064-9).
- Soliman, K., & Badeaa, R. (2002). Effect of soil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40(11), 1669-1675. [10.1016/s0278-6915\(02\)00120-5](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(02)00120-5).
- Urcelay, C., Robledo, G., Heredia, F., Morera, G., & García, F. (2012). *Hongos de la madera en el arbolado urbano de Córdoba*. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal.
- Veloz, R., Marín, R., Veloz, R., Rodríguez, R., Torres, M., Anaya, J., . . . Guevara, R. (2010). Antimicrobial activities of cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics-containing extract against fungus. *Colletotrichum lindemuthianum*. *Industrial Crops and Products*, 31(1), 134-138. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.09.013>.

- Villacide, J., & Corley, J. (2011). *Hongos patógenos de pinos en la Patagonia y su asociación con plagas entomológicas. Serie Técnica: Manejo Integrado de Plagas Forestales*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Viñuela, E., & Jacas, J. (1993). *Los enemigos naturales de las plagas y los plaguicidas*. Ministerio de Agricultura.
- Walsh, J., Anaissie, J., Denning, W., Herbrecht, R., Kontoyiannis, P., Marr, A., & Van Burik, A. (2008). Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*, 46(3), 327-360. 10.1086/525258.
- Wang, J., Quan, C., QI, X., LI, X., & Fan, S. (2010). Determination of diketopiperazines of *Burkholderia cepacia* CF-66 by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(5), 1773-1779. 10.1007/s00216-009-3379-3.
- Zabel, R., & Morrell, J. (2020). *Wood microbiology*. Academic Press.
- Zähner, H., Anke, H., & Anke, T. (1983). *In secondary metabolites and differentiation in fungi*. s/e.
- Zuluaga, J., Pérez, C., Angulo, A., Torres, O., & Santafé, G. (2007). Química y actividades antioxidante y bactericida del extracto etanólico del hongo *Ganoderma lucidum*. *Scientia Et Technica*, 13(33), 329-332. <https://doi.org/10.22517/23447214.6095> .

