



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ingeniería Agrícola
Programa de Magíster en Ingeniería Agrícola

Bioprospección de hongos endófitos asociados a especies chilenas de *Nothofagus* (*N. alpina*, *N. dombeyi* y *N. obliqua*) de la región de Ñuble para la búsqueda de productos naturales con actividad antimicrobiana

Tesis para optar al grado de Magíster en Ingeniería Agrícola

HÉCTOR ANDRÉS VALENZUELA BRAVO
CHILLÁN – CHILE
2025

Profesor Guía: Dr. Pedro Aqueveque Muñoz
Departamento de Agroindustrias
Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Agroindustrias de la Facultad de Ingeniería Agrícola, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr.
Pedro Miguel Aqueveque Muñoz
Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dra.
Karem Henríquez Aedo
Facultad de Química y Farmacia
Universidad del Bío Bío

M.S.,
Pedro Santiago Melín Marín
Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

Dr.
José Becerra Allende
Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

Director(s) de Programa

Dr.
Johannes de Bruijn
Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que contribuyeron a la realización de este trabajo.

En primer lugar, a mi familia, por su apoyo constante y comprensión durante todo este proceso. A mis padres y hermanos, por ser un pilar fundamental en mi formación personal y académica, y a mis perritas, por su compañía incondicional en cada etapa de este camino.

Agradezco sinceramente al profesor Dr. Pedro Aqueveque, por haberme introducido en el ámbito de la investigación científica, así como por su guía y confianza durante el desarrollo de este trabajo.

Extiendo mi gratitud a la Facultad de Ingeniería Agrícola de la Universidad de Concepción, institución que me acompañó desde mi formación de pregrado y que fue un espacio clave para mi desarrollo académico y profesional.

Asimismo, agradezco a la Pontificia Universidad Católica de Chile, y a la Universidad del Bío-Bío, en particular a la profesora Dra. Karem Henríquez, por su colaboración en el desarrollo experimental y el análisis de resultados que fortalecieron esta investigación.

Finalmente, agradecer a mi polola y mis amigos, por su apoyo y compañía, por los momentos compartidos que aportaron equilibrio y motivación este tiempo.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Pesticidas y resistencia	3
2.1.1 Bacterias	3
2.1.2 Hongos	5
2.2 Productos naturales	8
2.3 Metabolitos secundarios	10
2.3.1 Metabolitos secundarios en hongos	12
2.4 Hongos endófitos	14
2.4.1 Bioprospección de hongos endófitos	15
2.4.2 Hongos endófitos y metabolitos secundarios en Chile	18
2.5 Género <i>Nothofagus</i> en Chile	22
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo General	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4. METODOLOGÍA	25
4.1 Recolecta de muestras vegetales de especies <i>Nothofagus</i>	25
4.1.1 Desinfección del material vegetal	25
4.2 Aislamiento de hongos endófitos	26
4.3 Producción de extractos	26
4.3.1 Cultivos líquidos	26
4.3.2 Obtención de extractos	27
4.4 Evaluación de actividad antimicrobiana	27
4.4.1 Actividad antifúngica	28
4.4.2 Actividad antibacteriana	29
4.5 Optimización de medios de cultivo líquido	30

4.6 Escalamiento de cultivos líquidos	32
4.7 Identificación de hongos por secuenciación	33
4.7.1 Extracción de ADN	33
4.7.2 Reacción de PCR.....	33
L	33
4.7.3 Condiciones de PCR	33
4.7.4 Electroforesis y verificación de amplicón	34
4.7.5 Secuenciación	34
4.7.6 Análisis filogenético.....	34
4.8 Caracterización del compuesto bioactivo.....	35
4.8.1 Bioautografía TLC.....	35
4.8.2 Cromatografía HPTLC.....	36
4.8.3 Cromatografía HPLC	37
4.8.4 Purificación y caracterización estructural del metabolito secundario..	39
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
5.1 Recolección de muestras <i>N. alpina</i> , <i>N. dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>	41
5.1.1 Cepas fúngicas aisladas.....	42
5.2 Identificación de hongos mediante biología molecular	45
5.2.1 Filogenia.....	49
5.3 Evaluación de actividad antimicrobiana	57
5.3.1 Actividad antibacteriana.....	57
5.3.2 Actividad antifúngica.....	61
5.4. Optimización de medios	66
5.4.1 Optimización de medios cultivo cepa <i>Trichoderma sp. (Nd-5)</i>	66
5.4.2 Optimización de medios cultivo de la cepa <i>P. cinnamomea (Na-78)</i> ..	68
5.4.3 Optimización de medios cultivo cepa <i>F. tricinctum (Nd-250)</i>	69
5.4.4 Optimización de medios cultivo cepa <i>A. consortialis (Nd-258)</i>	71
5.5 Escalamiento de cultivos líquidos y evaluación del efecto de la temperatura	74
5.6 Análisis de metabolitos secundarios asociados a la actividad antimicrobiana	77

5.6.1 Bioautografía TLC de metabolitos secundarios asociados a la actividad antimicrobiana en la cepa <i>Trichoderma</i> sp. (Nd-5).....	78
5.6.2 Bioautografía TLC de metabolitos secundarios asociados a la actividad antimicrobiana en la cepa <i>P. cinnamomea</i> (Na-78).....	81
5.6.3 Análisis por HPTLC de metabolitos secundarios asociados a la actividad antimicrobiana en la cepa <i>F. tricinctum</i> (Nd-250)	84
5.6.4 Análisis por HPTLC de metabolitos secundarios asociados a la actividad antimicrobiana en la cepa <i>A. consortialis</i> (Nd-258)	86
5.6.5 Comparación de perfiles de metabolitos secundarios de <i>P. cinnamomea</i> en diferentes medios de cultivo mediante cromatografía HPLC	90
5.7 Purificación del metabolito bioactivo	93
5.8 Identificación estructural del metabolito secundario de <i>P. cinnamomea</i> (Na-78)	95
6. CONCLUSIONES.....	98
7. BIBLIOGRAFÍA	102
8. ANEXOS	125

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos en organismos test.....	28
Tabla 2. Bacterias utilizadas en los ensayos de sensibilidad y sus respectivos códigos ATCC.....	29
Tabla 3. Medios por utilizar en cultivos de fermentación líquida para optimización.	32
Tabla 4. Sectores donde se recolectaron las muestras vegetales a través de especies <i>Nothofagus</i> chilenas.	41
Tabla 5. Cepas obtenidas de las especies <i>Nothofagus</i> a estudiar, indicando su origen.	42
Tabla 6. Identificación de las cepas aisladas a través de BLAST y Genbank. ...	45
Tabla 7. Actividad antibacteriana de las cepas aisladas.	57
Tabla 8. Actividad antifúngica de las cepas aisladas.....	61
Tabla 9. Actividad antifúngica según sitio de recolección	64
Tabla 10. Relación entre medio de cultivo y diámetro de inhibición en <i>Trichoderma</i> sp. (Nd-5).....	67
Tabla 11. Relación entre medio de cultivo y diámetro de inhibición en <i>P. cinnamomea</i> (Na-78).....	68
Tabla 12. Relación entre medio de cultivo y diámetro de inhibición en <i>F. tricinctum</i> (Nd-250).....	70
Tabla 13. Relación entre medio de cultivo y diámetro de inhibición en <i>A. consortialis</i> (Nd-258).....	71
Tabla 14. Resultados comparativos del escalamiento de cultivos líquidos bajo diferentes condiciones de temperatura para las cepas seleccionadas.	74
Tabla 15. Resumen de la detección de metabolitos secundarios para el extracto <i>Trichoderma</i> sp. (Nd-5).....	79
Tabla 16. Resumen de la detección de metabolitos secundarios para el extracto <i>P. cinnamomea</i> (Na-78).....	82
Tabla 17. Resumen de la detección de metabolitos secundarios para el extracto <i>F. tricinctum</i> (Nd-250).	85
Tabla 18. Resumen de la detección de metabolitos secundarios para el extracto <i>A. consortialis</i> (Nd-258).....	88
Tabla 19. Principales picos cromatográficos detectados en los extractos de <i>P. cinnamomea</i> (Na-78) cultivada en medios “MM10” y “M5”.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Georreferenciación de los puntos de recolección de las muestras vegetales de <i>N. alpina</i> , <i>N. dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>	41
Figura 2. Aparición de micelio a partir de fragmentos de tallo y hoja de <i>N. alpina</i> en medio PDA.	44
Figura 3. Cultivo de cepa purificada endófito en medio PDA a partir de micelio aislado.	44
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% w/v teñido con un agente intercalante, de los amplicones obtenidos a partir del ADN de hongos, utilizando ITS.	48
Figura 5. Árbol filogenético utilizando Neighbor-Joining (500 bootstrap) género <i>Trichoderma</i> del gen ITS.	50
Figura 6. Árbol filogenético utilizando Neighbor-Joining (500 bootstrap) género <i>Pezizcula</i> del gen ITS incluyendo <i>Cryptosporiopsis</i> como externo.	52
Figura 7. Árbol filogenético utilizando Neighbor-Joining (500 bootstrap) del género <i>Fusarium</i> sect. <i>tricinctum</i> del gen ITS incluyendo <i>Botryosphaeria</i> como externo.	54
Figura 8. Árbol filogenético utilizando Neighbor-Joining (500 bootstrap) del género <i>Alternaria</i> sect. <i>Ulocladioides</i> y sect. <i>Alternata</i> del gen ITS incluyendo <i>Alternariaster helianthi</i> como externo.	55
Figura 9. Bioautografía TLC de extractos de <i>Trichoderma</i> sp. (Nd-5) en cultivo "M5". Visualización bajo luz UV a 366 nm (izquierda) y 254 nm (derecha).	79
Figura 10. Bioautografía TLC en placa del extracto de cepa <i>Trichoderma</i> sp. (Nd-5) frente a <i>B. cereus</i>	80
Figura 11. Bioautografía TLC extractos de <i>P. cinnamomea</i> (Na-78) en medio "M5". Visualización bajo luz UV a 366 nm (izquierda) y 254 nm (derecha)	82
Figura 12. Bioautografía TLC en placa del extracto de cepa <i>P. cinnamomea</i> (Na-78) frente a <i>S. epidermidis</i>	83
Figura 13. Cromatografía HPTLC de extracto de <i>F. tricinctum</i> (Nd-250) en medio "M4". Visualización bajo luz UV a 366 nm (izquierda) y 254 nm (derecha).	85
Figura 14. Cromatografía HPTLC de de extracto de <i>A. consortialis</i> (Nd-258) en medio "M6". Visualización bajo luz UV a 366 nm (izquierda) y 254 nm (derecha).	87
Figura 15. Perfiles cromatográficos por HPLC de metabolitos secundarios de <i>P. cinnamomea</i> (Na-78) cultivada en medios "MM10" (arriba) y "M5" (abajo).	91
Figura 16. Sistema de separación cromatográfica en columna abierta para purificación de compuesto antibacteriano de <i>P. cinnamomea</i>	94

Figura 17. Bioautografía de <i>B. subtilis</i> para las 18 fracciones recolectadas de <i>P. cinnamomea</i>	94
Figura 18. Estructura química de la piranocumarina (+)-Mycorrhizin A identificada como metabolito bioactivo en <i>P. cinnamomea</i> (Na-78).	97

RESUMEN

Los hongos endófitos son una fuente relevante de metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano. En este estudio se aislaron 37 cepas a partir de *N. alpina*, *N. dombeyi* y *N. obliqua*, identificadas mediante análisis molecular de la región ITS. Se registró una amplia diversidad taxonómica, incluyendo géneros como *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Pezizula*, *Fusarium* y *Alternaria*. Los ensayos antimicrobianos frente a bacterias y hongos fitopatógenos mostraron que el 42,8 % de los extractos presentó actividad antibacteriana y el 37,1 % actividad antifúngica. Destacaron las cepas *Trichoderma sp.* (5), *Pezizula cinnamomea* (78), *Fusarium lateritium* (250) y *Alternaria consortialis* (258), seleccionadas como las más prometedoras por su amplio espectro de inhibición. La optimización de medios de cultivo y el escalamiento confirmaron que la composición nutricional influye en la producción de metabolitos bioactivos, siendo “M1” y “M5” los más efectivos para *Trichoderma* y *Pezizula*, y “M4” para *Fusarium*. Los perfiles cromatográficos (TLC, HPTLC y HPLC) evidenciaron metabolitos diferenciados asociados a la bioactividad observada. En particular, para *P. cinnamomea* (78) se identificó un metabolito específico correspondiente a un mycorrhizina ($C_{14}H_{14}O_4$), consolidando su potencial como fuente de nuevas moléculas con aplicaciones biotecnológicas.

ABSTRACT

Endophytic fungi represent an important source of secondary metabolites with antimicrobial potential. In this study, 37 endophytic strains were isolated from *Nothofagus alpina*, *N. dombeyi*, and *N. obliqua*, and identified through molecular analysis of the ITS region. A broad taxonomic diversity was recorded, including genera such as *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Pezicula*, *Fusarium*, and *Alternaria*. Antimicrobial assays against bacterial and fungal phytopathogens showed that 42.8% of the extracts exhibited antibacterial activity, while 37.1% displayed antifungal activity. The strains *Trichoderma* sp. (5), *Pezicula cinnamomea* (78), *Fusarium lateritium* (250), and *Alternaria consortialis* (258) stood out as the most promising due to their broad inhibition spectrum.

Culture medium optimization and scale-up experiments confirmed that nutritional composition significantly influences the production of bioactive metabolites, with media “M1” and “M5” being the most effective for *Trichoderma* and *Pezicula*, respectively, and “M4” for *Fusarium*. Chromatographic profiles obtained by TLC, HPTLC, and HPLC revealed distinct metabolites associated with the observed bioactivity. Specifically, in *P. cinnamomea* (78), a characteristic compound corresponding to a mycorrhizin (C₁₄H₁₄O₄) was identified, reinforcing its potential as a source of novel molecules with biotechnological application.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un desafío significativo en la medicina actual. Desde el descubrimiento de la penicilina por Sir Alexander Fleming en 1928, los antibióticos han sido fundamentales para combatir infecciones y salvar vidas. Sin embargo, la resistencia bacteriana ha surgido como una amenaza creciente, donde las bacterias desarrollan la capacidad de sobrevivir a concentraciones de antibióticos que normalmente serían letales. Este fenómeno se ha observado en diversas bacterias, incluyendo aquellas clasificadas como ESKAPE, como *S. aureus* y *Enterococcus spp.*, que representan una seria amenaza para la salud pública debido a su alta resistencia a múltiples antibióticos (Camacho Silvas, 2023).

El impacto que ha generado la resistencia bacteriana a los antibióticos ha sido considerable, un estudio realizado por el Big Data Institute de la Universidad de Oxford en Reino Unido 2014, estimó que la resistencia a los antimicrobianos (RAM) llegaría a causar 10 millones de muertes anuales en 2050 (Murray, Christopher J L et al, 2022). La resistencia bacteriana a los antimicrobianos estuvo relacionada con aproximadamente 5 millones de muertes, incluyendo 1,27 millones de muertes directamente atribuidas a esta resistencia.

Para la protección fitosanitaria, las plantas y sus metabolitos secundarios tienen un gran potencial que se puede utilizar en diferentes estrategias. Estas estrategias incluyen el uso de plantas enteras, como la rotación de cultivos y los cultivos intercalados, residuos de cultivos y partes de plantas, como el abono verde, y el uso de productos químicos y plantas en forma integrada o ecológica. Los extractos de plantas controlan las plagas actuando directamente sobre las plagas objetivo o mejorando la resistencia inducida, tanto en entornos cerrados como en sistemas agrícolas convencionales. En la agricultura, los nichos de mercado más importantes para los pesticidas botánicos son las aplicaciones de producción orgánica, el control de plagas almacenadas, la horticultura y los tratamientos de semillas y postcosecha (Ramos, Katia; 2017). El uso de pesticidas químicos en la agricultura ha llevado a la aparición de plagas y enfermedades resistentes a los pesticidas, lo que ha aumentado la necesidad de encontrar alternativas más sostenibles y seguras para el medio ambiente y la salud humana. La gestión integrada de plagas es una estrategia que combina diferentes métodos de control de plagas, incluyendo el uso de pesticidas botánicos, para reducir el impacto de las plagas en los cultivos (Formación Agroalimentaria, 2015).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Pesticidas y resistencia

2.1.1 Bacterias

¿Qué bacterias han generado resistencia?

A lo largo del tiempo, varias bacterias han desarrollado resistencia a los antibióticos debido a la selección natural y la presión ejercida por el uso excesivo e incorrecto de estos medicamentos. Algunos ejemplos de bacterias que han desarrollado resistencia a múltiples antibióticos incluyen *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), la cual es resistente a varios antibióticos de la clase de las penicilinas, incluida la meticilina. Existe también la bacteria *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE), estas han desarrollado resistencia a la vancomicina, que es un antibiótico importante para tratar infecciones graves. Otro ejemplo es la *E. coli* resistente a carbapenémicos (CRE), estas han desarrollado resistencia a los carbapenémicos, que son antibióticos de último recurso para tratar infecciones graves causadas por bacterias resistentes a otros tipos de antibióticos. Por último, otro caso sería el *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente (TB-MDR), se produce cuando las cepas *M. tuberculosis*, el agente causante de la tuberculosis, se vuelven resistentes a varios de los medicamentos más potentes utilizados para tratar la enfermedad (World Health Organization, 2014).

Estas resistencias son un problema grave de salud pública que contribuye a un aumento en la mortalidad y morbilidad de las infecciones bacterianas. Según los datos recopilados, se estima que, en 2019, más de 1.2 millones de personas murieron directamente a causa de infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos (Lancet, 2022). Es por esto, que ha sido necesario tomar medidas para abordar la resistencia bacteriana a los antimicrobianos, a través de diversas estrategias, se destacan el uso preferente de antimicrobianos de espectro reducido siempre que sea posible, la interrupción de la transmisión horizontal de microorganismos mediante medidas higiénicas y sanitarias, la aplicación de normas de control de infecciones nosocomiales en entornos hospitalarios, a través de comisiones especializadas y el fomento de la vacunación como un mecanismo preventivo clave, la implementación de medidas para mejorar la prescripción y el uso adecuado de antibióticos, tanto en consultorios médicos como en salas de emergencia (Martin, G. 2003).

Pero no solo ha afectado al área de la medicina y la salud humana; el medio ambiente también ha sido uno de los principales afectados por este fenómeno, ya que la capacidad de las bacterias para resistir los antibióticos ha tenido un impacto significativo en él. Se ha identificado que el ambiente se ha convertido en una fuente de bacterias resistentes a los antibióticos y genes de resistencia. Este fenómeno representa una amenaza global para la salud pública, la salud animal y el medio ambiente (Barrantes, 2022). Las causas de esta resistencia incluyen el uso generalizado y poco regulado de antibióticos, terapias

antimicrobianas sin control profesional, automedicación, y su presencia en diversos campos como la agricultura, ganadería e industria alimentaria. La contaminación ambiental con residuos de antimicrobianos ha generado una presión selectiva que favorece la selección de bacterias resistentes a bajas concentraciones de antibióticos y otras sustancias químicas en el ambiente. Esta situación plantea un desafío importante para la gestión ambiental y la salud pública a nivel mundial, ya que las bacterias resistentes pueden persistir, amplificarse y diseminarse en el medio ambiente, representando un peligro tanto para la naturaleza como para la salud humana y animal (Fernández Rodríguez, 2020).

2.1.2 Hongos

¿Qué hongos han generado resistencia?

Los hongos, al igual que las bacterias, pueden desarrollar resistencia a los antimicóticos a través de diversos mecanismos. Uno de los más comunes es la sobreexpresión de bombas de eflujo, que les permite expulsar el fármaco antes de que pueda ejercer su efecto. Además, pueden presentar mutaciones en los genes diana de los antimicóticos, lo que reduce la eficacia del tratamiento. La plasticidad genética de los hongos les permite adaptarse rápidamente a los cambios ambientales y a la presión selectiva de estos compuestos, contribuyendo así a la aparición de cepas resistentes (Revie et al., 2018).

Los hongos que han generado resistencia a los antimicóticos incluyen la *Candida auris*, que ha sido identificada como resistente a los medicamentos antimicóticos disponibles, la *C. auris* es un hongo patógeno emergente que ha generado preocupación debido a su resistencia a múltiples clases de antimicóticos, lo que dificulta su tratamiento. La capacidad para desarrollar resistencia a los antifúngicos se debe a su habilidad para adquirir y expresar genes que le confieren esta resistencia, lo que ha llevado a la necesidad de estrategias de control y vigilancia más estrictas. Además, se menciona que los hongos en general, como parte de su mecanismo de resistencia, pueden expresar transportadores de membrana que les otorgan esta capacidad (CDC, 2019). Las pérdidas asociadas a la resistencia a los antifúngicos, especialmente en el caso de *C. auris*, incluyen un aumento en la morbilidad y mortalidad de los pacientes, una prolongación de la estancia hospitalaria (de 3 a 13 días adicionales), un mayor costo económico por paciente y la necesidad de utilizar antifúngicos más costosos como alternativa a los de primera y segunda línea. Además, la resistencia a los antifúngicos puede llevar a tratamientos ineficaces, lo que puede resultar en un mayor impacto en la salud de los pacientes y en los recursos sanitarios (Bilbao, N. 2018).

Dada la creciente amenaza de la resistencia antifúngica, es crucial invertir en investigación para comprender los mecanismos subyacentes y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. La vigilancia epidemiológica es fundamental para detectar tempranamente la resistencia emergente y tomar medidas

preventivas en entornos clínicos y comunitarios. Abordar la resistencia antifúngica de manera integral requiere una colaboración global entre investigadores, profesionales de la salud y autoridades sanitarias para garantizar un uso adecuado de los antifúngicos y prevenir la propagación de cepas resistentes.

Pero no solo ha afectado al área de la medicina y la salud humana, el medio ambiente también ha sido uno de los principales afectados por esta resistencia, la resistencia a los antifúngicos y los antimicrobianos en general tiene un impacto significativo en el medioambiente. Los productos farmacéuticos, incluidos los antifúngicos, se eliminan a menudo en vertederos y pueden contaminar el suministro de agua a través del agua subterránea. Esta contaminación puede facilitar la resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente, especialmente en las vías fluviales, donde se están detectando niveles crecientes de productos farmacéuticos debido al tratamiento inadecuado de la escorrentía de la agricultura intensiva y, a veces, a la eliminación irresponsable. La resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente puede afectar la calidad del agua, el suministro de agua potable, la vida acuática y también facilitar la resistencia a los antimicrobianos (Gómez BL, 2023).

Actualmente, los fungicidas están experimentando un aumento en su uso y valor en el mercado agrícola. En 2008, los fungicidas superaron a los insecticidas en términos de valor de mercado, lo que ha brindado a los productores nuevas

oportunidades (Bartlett, et al., 2022). Este aumento en el uso de fungicidas se ha observado especialmente en Europa debido a condiciones climáticas específicas. Los agricultores están adoptando fungicidas para mejorar la calidad y el rendimiento de sus cultivos, reconociendo el beneficio que estos productos pueden aportar a la producción agrícola. A pesar de que los fungicidas han estado algo marginados en el pasado, los agricultores están cada vez más conscientes de su importancia y están buscando utilizarlos de manera efectiva para proteger sus cultivos de enfermedades fúngicas y mejorar su productividad (Eurostat, 2020).

2.2 Productos naturales

Debido a los problemas que existen actualmente por la resistencia a estos pesticidas convencionales en el medioambiente y la salud humana, con el tiempo han nacido alternativas más sustentables y menos contaminantes. Es aquí donde entran los Productos Naturales, los cuales son compuestos químicos o mezclas que se encuentran en la naturaleza, generalmente producidos por organismos como plantas, hongos, bacterias o animales. Estos compuestos han sido utilizados históricamente por el ser humano en diversos ámbitos, especialmente en la medicina tradicional y moderna, como fuente de principios activos para el desarrollo de fármacos. Además, algunos extractos naturales también se emplean en la elaboración de productos alimenticios, cosméticos y de cuidado personal. A diferencia de los productos sintéticos, muchos productos naturales no

contienen aditivos artificiales, lo que ha impulsado su popularidad en contextos donde se valora lo "más natural" o mínimamente procesado. Sin embargo, es importante tener en cuenta que no todos los productos naturales son inocuos, y su seguridad y eficacia deben ser evaluadas científicamente. Estos productos también suelen estar hechos de ingredientes orgánicos, lo que significa que no se han sometido a procesos químicos ni han recibido pesticidas. (ONU, Programa para el medioambiente. 2022). Estos productos pueden venir tanto de hongos, como de plantas y algas. Los hongos descomponen la materia orgánica más resistente, reteniendo nutrientes en el suelo y liberando dióxido de carbono. Por otro lado, las plantas son una fuente rica de fibra, vitaminas y minerales, mientras que las algas son organismos marinos que también pueden ser fuentes de productos naturales. En resumen, estos productos naturales provienen directamente de organismos vivos y elementos naturales, sin intervención química o procesamiento artificial. Dentro de los productos naturales, encontramos los biocontroladores, los cuales incluyen organismos como bacterias y hongos beneficiosos que compiten con los patógenos por recursos y espacios, controlan las enfermedades de las plantas sin dañar el medio ambiente, pudiendo ser utilizados en combinación con otros hongos biocontroladores, fungicidas e insecticidas en los sistemas de cultivo. Otro ejemplo son los aceites esenciales, los cuales se extraen de plantas y contienen los compuestos aromáticos de las mismas, han demostrado tener efectos inhibidores sobre diversos hongos fitopatógenos que afectan a los cultivos de

frutas y hortalizas, debiendo utilizarse de manera adecuada y segura, siguiendo las recomendaciones de uso y dilución adecuadas (Dutta et al., 2022). Los extractos vegetales también son otro ejemplo, son obtenidos de diferentes partes de las plantas, como hojas, tallos, flores o raíces, y contienen compuestos naturales que pueden inhibir el crecimiento y desarrollo de hongos fitopatógenos, variando su eficacia dependiendo del tipo de planta utilizada, la concentración del extracto y las condiciones específicas del cultivo (Ebisa et al., 2023). Y, por último, están los productos de origen microbiano, los cuales incluyen microorganismos naturales o productos derivados de los mismos, un ejemplo de estos son los hongos entomopatógenos, levaduras y bacterias. Sin embargo, se requiere más investigación para optimizar su eficacia y determinar las mejores prácticas de uso (Freimoser, et al, 2019).

2.3 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son subproductos de los metabolitos primarios de las plantas como lo son los terpenos, fenoles, alcaloides, entre otros. Antiguamente no se consideraban esenciales, debido a que no intervenían directamente en la planta con beneficios notorios en comparación de los metabolitos primarios en donde sí hay una intervención directa. Dos investigadores llamados Miriam Rothschild y Jeffrey Harborne comenzaron a estudiar estos metabolitos secundarios descubriendo las posibles ventajas y

servicios que le otorgan a las plantas, determinando que eran esenciales para la supervivencia (Almaraz-Abarca et al., 2006).

Los metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos presentan una amplia variedad, y algunos de ellos tienen estructuras químicas únicas que no se encuentran en otras fuentes naturales (Sánchez-Fernández et al., 2013). Estos metabolitos derivados de hongos endófitos están siendo cada vez más empleados como componentes medicinales y aditivos en la alimentación con propósitos terapéuticos, aromáticos y culinarios. Diversos factores genéticos, ontogénicos, morfogenéticos y ambientales pueden influir en la creación y acumulación de estos metabolitos secundarios (Yang, L et al., 2018).

Los metabolitos secundarios de las plantas desempeñan un papel crucial en la medicina gracias a su actividad antioxidante y citotóxica, así como por su capacidad para interactuar con diversos sistemas biológicos (Alvarado, Britt. 2017). La diversidad de metabolitos secundarios en las plantas está relacionada con la diversidad vegetal, y se pueden inducir mediante el uso de reguladores del crecimiento y otros compuestos que regulan el metabolismo celular. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los metabolitos secundarios también pueden tener efectos tóxicos en los seres humanos y otros animales, especialmente cuando se consumen en dosis altas.

2.3.1 Metabolitos secundarios en hongos

El reino Fungi, también conocido como el reino de los hongos, está compuesto por más de 144.000 especies diferentes de hongos, incluyendo levaduras, mohos y setas. Los hongos son organismos eucariotas, es decir, sus células contienen un núcleo verdadero y otros orgánulos celulares. A diferencia de las plantas y animales, los hongos no son capaces de desplazarse por sí mismos y crecen en el suelo, en superficies o sobre troncos o materia orgánica en descomposición. Los hongos presentan una pared celular compuesta de quitina, un polisacárido que también forma parte del exoesqueleto de los insectos y crustáceos (Kendrick, B., 2001). Además, son heterótrofos, lo que significa que no pueden producir su propio alimento y dependen de otros organismos para obtener nutrientes. Estos pueden crecer en desiertos, ambientes de extrema salinidad, lechos de océanos, ambientes expuestos a radiación ionizante y en grandes bosques. La preferencia de los hongos superiores es por la materia orgánica de origen vegetal, lo que los lleva a proliferar en hábitats ricos en esta materia, especialmente en bosques. La mayoría de los hongos se reproducen por medio de esporas, que pueden ser producidas de forma asexual o sexual (Alexopoulos, C. J., 1996). Los hongos desempeñan una variedad de funciones importantes en la naturaleza, como la descomposición de la materia orgánica y la liberación de nutrientes al medio ambiente, la formación de asociaciones simbióticas con plantas y la producción de antibióticos y otros compuestos de interés médico. Sin embargo, también pueden ser causantes de enfermedades en plantas, animales y humanos, y

pueden atacar alimentos almacenados, causando pérdidas económicas (CCH, 2018). Los hongos se clasifican en diferentes grupos, como los Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes. Cada grupo tiene características distintivas en su morfología y ciclo de vida. Algunos ejemplos de hongos comestibles son los champiñones, la cuitlacoche y las setas, mientras que otros, como el hongo del pan y la cerveza, se utilizan en la industria alimentaria. Algunos hongos, como los del género *Penicillium*, se utilizan en la producción de medicamentos como la penicilina. Además, los hongos se encuentran en una gran diversidad de hábitats y pueden adaptarse a condiciones que no son aptas para la mayoría de los organismos (Tortora, G. J., et al., 2018). Los hongos también se clasifican según su forma, ya sea filamentosa, de levadura o según sus hifas. Dentro de estas clasificaciones encontramos los hongos filamentosos, levaduriformes y los que presentan ambas formas, o sea, difásicos. Los hongos filamentosos son pluricelulares y se caracterizan por estar constituidos por filamentos ramificados o hifas que se desarrollan y entrelazan formando el micelio. Este tipo de hongos puede ser saprófito, parásito o difásico, es decir, unas veces se comportan como hongos filamentosos y otras pueden comportarse como levaduras. Por otro lado, los hongos levaduriformes, también conocidos como levaduras, son unicelulares y tienen forma oval, inmóviles y se dividen por mecanismos diversos, especialmente por gemación. Las levaduras suelen crecer más rápidamente que los hongos filamentosos, pero con frecuencia junto a ellos (Mendoza, 2005). Algunos hongos pueden presentar ambas formas,

es decir, son difásicos, esto significa que unas veces se comportan como hongos filamentosos y otras pueden comportarse como levaduras, dependiendo de las condiciones ambientales y nutricionales en las que se encuentren.

2.4 Hongos endófitos

Existen hongos que pueden clasificarse tanto como filamentosos como levaduriformes, con una morfología unicelular, y entre ellos se encuentran los hongos endófitos. Estos hongos son microorganismos fúngicos que habitan los tejidos internos de las plantas sin causar síntomas visibles de enfermedad al menos durante una etapa de su ciclo de vida (Petrini, 1991). Esta asociación se considera simbiótica y puede variar desde mutualismo hasta comensalismo, dependiendo de factores como la especie involucrada, las condiciones ambientales y el estado fisiológico de la planta (Rodríguez et al., 2009). En muchos casos, los endófitos contribuyen al crecimiento y defensa de su huésped, mientras que la planta les ofrece nutrientes y un ambiente protegido para desarrollarse. La diversidad de hongos endófitos es enorme. Se estima que cada especie vegetal puede albergar decenas o cientos de especies endófitas diferentes, muchas de las cuales aún no han sido descritas científicamente (Arnold et al., 2000). Desde una perspectiva funcional, los hongos endófitos pueden mejorar la nutrición vegetal al facilitar la absorción de nutrientes, modular el crecimiento de la planta, aumentar su tolerancia a condiciones de estrés (como salinidad, sequía o metales pesados), y reducir la incidencia de enfermedades al

competir con patógenos o producir metabolitos antimicrobianos. Además, se ha demostrado que ciertos endófitos inducen mecanismos de defensa sistémica en las plantas, actuando como “vacunas biológicas” naturales.

Taxonómicamente, los hongos endófitos se clasifican comúnmente en dos grupos: los Clavicipitáceos, que infectan mayoritariamente gramíneas colonizando tejidos aéreos como tallos y hojas; y los no Clavicipitáceos, que son más diversos y colonizan una amplia gama de plantas vasculares y no vasculares, estableciéndose en órganos como raíces, hojas, rizomas, frutos o flores.

2.4.1 Bioprospección de hongos endófitos

Una bioprospección de hongos endófitos implicaría la investigación y evaluación de estos hongos presentes en plantas, con el objetivo de identificar compuestos bioactivos con potencial uso en diversas aplicaciones. Este proceso incluiría la recolección de muestras de plantas que albergan hongos endófitos, seguido de la extracción y análisis de los compuestos presentes en estos hongos. Posteriormente, se llevarían a cabo pruebas de actividad biológica para determinar sus propiedades, como su potencial antibacteriano, antifúngico u otras actividades bioactivas. Finalmente, se seleccionarían los compuestos más prometedores para su desarrollo como productos biotecnológicos, como bioplaguicidas o agentes de control biológico en la agricultura (Morales García, Denis. 2014).

La literatura nos ha demostrado que se han encontrado diversos hongos endófitos capaces de producir compuestos naturales con propiedades antimicrobianas. Uno de estos casos es el Taxol, una sustancia química con propiedades anticancerígenas. Se extrae originalmente de la corteza del árbol del Pacífico yew (*Taxus brevifolia*), pero también se ha encontrado en otras especies de árboles de tejo. El taxol actúa interfiriendo en la división celular, lo que lo hace efectivo contra varios tipos de cáncer, como el de mama, ovario, pulmón y otros (Strobel, G., 2003). En cuanto a su uso en la agricultura, si bien el taxol no se utiliza directamente como plaguicida, existen investigaciones sobre el potencial de hongos endófitos que producen taxol para su aplicación en el control biológico de plagas y enfermedades de plantas (Barrales-Cureño, Hebert. 2016). Algunos estudios han demostrado que ciertos hongos endófitos que habitan en plantas como el tejo pueden sintetizar taxol y otros compuestos bioactivos, los cuales podrían ser utilizados como bioplaguicidas o agentes de biocontrol en cultivos agrícolas (Strobel, G., 2003).

Otro ejemplo de una sustancia química con una relación interesante con los hongos endófitos es la ergotamina. La ergotamina es un alcaloide natural que se encuentra en el cornezuelo del centeno, un hongo parasitario que infecta los granos de este cereal. Históricamente, la ergotamina ha sido conocida por sus efectos vasoconstrictores y por su capacidad para inducir contracciones uterinas, lo que la convierte en un compuesto valioso en medicina, particularmente en el tratamiento de migrañas y como agente para inducir el parto (Petigrosso, 2019).

La ergotamina es solo una de las muchas sustancias bioactivas producidas por el cornezuelo del centeno. Sin embargo, lo interesante es que los hongos endófitos, que viven dentro de las plantas sin causarles daño aparente, también pueden producir ergotaminas y otros alcaloides similares. Estos hongos endófitos han sido objeto de investigación debido a su potencial para la producción sostenible de compuestos bioactivos, como la ergotamina, sin necesidad de depender exclusivamente de la infección de los cultivos de centeno (Clay, K., 2002).

Los metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos no solo poseen valor farmacológico o agrícola, sino que también cumplen funciones ecológicas clave en la relación simbiótica entre el hongo y la planta huésped. Estos compuestos pueden actuar como defensas químicas que protegen a la planta contra patógenos, insectos herbívoros o estrés ambiental, contribuyendo así a su supervivencia y adaptación (Rodríguez et al., 2009; Schulz & Boyle, 2005). A cambio, la planta proporciona al hongo un microambiente estable y nutrientes. Esta interacción mutualista es fundamental para comprender por qué ciertos metabolitos, como el taxol o la ergotamina, se sintetizan solo en condiciones específicas de coexistencia hongo-planta. En muchos casos, se ha observado que la capacidad del hongo para producir compuestos bioactivos depende directamente del tipo de planta huésped, su estado fisiológico o las condiciones ambientales, lo que sugiere una coevolución y regulación conjunta de rutas metabólicas especializadas (Gunatilaka, 2006; Kusari et al., 2012).

2.4.2 Hongos endófitos y metabolitos secundarios en Chile

Los hongos endófitos en Chile son organismos de gran importancia en la diversidad biológica del país, especialmente en las interacciones planta-suelo-microorganismo y en potenciales aplicaciones en agroecosistemas. Estos hongos, estudiados en Chile durante las últimas dos décadas, se destacan por su diversidad y distribución a lo largo de un amplio rango de condiciones ambientales, abarcando desde zonas áridas hasta regiones templadas y frías del país. La diversidad de hongos endófitos en Chile es alta y responde fuertemente a los gradientes ecológicos del país. Diversos estudios han demostrado que la composición de comunidades endófitas varía según el tipo de vegetación dominante, el microclima y las condiciones ambientales locales (U'Ren et al., 2012; Del Olmo-Ruiz & Arnold, 2014). En particular, investigaciones realizadas en bosques chilenos han reportado una alta diversidad de endófitos asociados a especies nativas, incluido el género *Nothofagus*, con variaciones importantes entre zonas áridas, mediterráneas y templadas (González-Teuber et al., 2019). Además, investigaciones han evaluado hongos endófitos aislados de las plantas vasculares antárticas *Colobanthus quitensis* y *Deschampsia antarctica*, los cuales presentan adaptaciones extremas a condiciones de frío, sequía y suelos pobres. Diversos géneros, incluyendo *Penicillium*, *Phoma*, *Cladosporium* y *Alternaria*, han sido probados experimentalmente en plántulas de árboles nativos chilenos, mostrando mejoras en sobrevivencia y crecimiento inicial tras incendios forestales (Raimilla et al., 2013). Existen estudios que sugieren que algunos

hongos endófitos podrían participar en las fases tempranas del proceso de biodegradación de la madera en especies arbóreas del bosque nativo de Chile (Oses, 2013). Sin embargo, la comprensión de los mecanismos específicos de esta participación, así como el alcance ecológico de su contribución en la degradación de madera, aún requiere mayor investigación. En 2014, Fardella y colaboradores (Fardella C., et al., 2014) llevaron a cabo un estudio sobre los efectos positivos de la inoculación con hongos endófitos obtenidos de plantas nativas de la Antártida, tales como *Colobanthus quitensis* y *Deschampsia antarctica*) en especies vegetales autóctonas de ecosistemas xerofíticos del norte de Chile, como *Flourensia thurifera*, *Senna cumingii* y *Puya berteroniana*. Estas tres plantas presentan adaptaciones al estrés hídrico y habitan zonas áridas. Según los resultados del estudio, el uso de estos hongos endófitos aislados de raíces antárticas aumentó el porcentaje de supervivencia y mejoró la eficiencia en el uso del agua en dichas plantas. Esto sugiere que estos microorganismos podrían ser una herramienta efectiva para programas de reintroducción vegetal en zonas afectadas por la escasez hídrica, como en el norte del país (Fardella C., et al., 2014).

La investigación de hongos endófitos de plantas endémicas y nativas de la Precordillera Central Andina de Chile, una zona con gran heterogeneidad geográfica y climática ofrece una oportunidad para encontrar hongos endófitos o sus metabolitos con potencial biotecnológico (Strobel & Daisy, 2003). Esto se debe a que las plantas perennes y caducas de origen endémico que habitan

ambientes con alta biodiversidad aumentan la probabilidad de albergar diversos hongos endófitos (Arnold & Lutzoni, 2007). Sin embargo, este campo de estudio está escasamente desarrollado en Chile y otras regiones similares (Oses et al., 2008). Por lo tanto, se han considerado diferentes criterios para encontrar hongos endófitos con actividad antifúngica en esta región, dadas sus condiciones ecológicas que han permitido el desarrollo de una amplia gama de especies de plantas endémicas y nativas.

En resumen, los hongos endófitos en Chile representan una valiosa fuente de investigación y aplicación en diversos ámbitos, desde la conservación de la biodiversidad hasta el control de plagas y la restauración de ecosistemas afectados.

2.4.2.1 Química de los hongos endófitos chilenos: potencial y diversidad de metabolitos

Los hongos endófitos presentes en la flora nativa de Chile constituyen una fuente rica y poco explorada de metabolitos secundarios con potencial biotecnológico. Diversas investigaciones recientes han demostrado que estos microorganismos, al establecerse de forma asintomática en los tejidos de sus hospederos vegetales, pueden sintetizar compuestos bioactivos de gran diversidad estructural y funcional, incluyendo alcaloides, quinolonas, isocromanonas, lactonas y derivados fenólicos.

En el caso de gimnospermas endémicas de Chile, tales como *Prumnopitys andina* (lleuque), *Austrocedrus chilensis* y *Pilgerodendron uviferum*, se han aislado hongos endófitos capaces de producir compuestos con actividad antimicrobiana y citotóxica. Por ejemplo, desde *P. andina* se ha identificado a *Penicillium janczewskii* como productor de peniprequinolona (un alcaloide nitrogenado tipo quinolona) y gliovictina (una piperazinediona sulfurada), ambos con actividad frente a bacterias Gram positivas como *B. subtilis* y *S. aureus* (Schmeda-Hirschmann et al., 2005).

Estos mismos autores, desde otras cepas cultivadas en medios líquidos identificaron otros compuestos tales como melleína, *p*-hidroxibenzaldehído y ácidos grasos de cadena media, con efectos antimicrobianos y potencial citotóxico frente a líneas celulares humanas (Schmeda-Hirschmann et al., 2005).

Estudios adicionales en *Embothrium coccineum* (notro) han demostrado que hongos endófitos pertenecientes a los géneros *Xylaria*, *Diaporthe*, *Penicillium* y *Mycosphaerella* producen metabolitos como isocumarinas y compuestos aromáticos oxigenados con actividad antifúngica y antioxidante (Vera et al., 2022). Del mismo modo, en especies como *Prumnopitys andina* se han aislado endófitos pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*, capaces de sintetizar peptaiboles y lactonas macrocíclicas con bioactividad selectiva (Velásquez & Piontelli, 2005)."

La riqueza química de los hongos endófitos chilenos se sustenta en la alta diversidad de endófitos asociados a plantas nativas que habitan ambientes geográficamente contrastantes y poco explorados. Estudios en especies como *Prumnopitys andina* y *Embothrium coccineum* han revelado metabolitos inusuales o poco reportados, lo que evidencia una plasticidad metabólica relevante para la generación de nuevas moléculas con potencial biotecnológico (González-Teuber, M. 2016).

Entre las especies vegetales de gran interés ecológico y biotecnológico en Chile se encuentran aquellas pertenecientes al género *Nothofagus*. Diversos estudios han planteado que los hongos endófitos pueden mejorar la tolerancia al estrés ambiental y promover el crecimiento vegetal, por lo que se postula que su asociación con especies de *Nothofagus* chilenas podría contribuir al desarrollo, adaptación y resistencia de estos árboles frente a condiciones ambientales desafiantes (Hormazábal, E., & Piontelli, E. ,2009).

2.5 Género *Nothofagus* en Chile

El género *Nothofagus*, perteneciente a la familia Nothofagaceae, incluye especies arbóreas de gran valor ecológico y evolutivo. Actualmente, se reconocen aproximadamente 35 especies distribuidas en Sudamérica, Australia, Nueva Zelanda y Nueva Guinea, reflejo de su antiguo origen en el supercontinente Gondwana. Se estima que este género surgió hace más de 80

millones de años y su actual distribución disyunta se debe a la fragmentación de dicho supercontinente (Romero & Dibbern, 1985; Veblen, Hill & Read, 1996).

En Chile, se han identificado diez especies nativas de *Nothofagus*, distribuidas desde la Región del Maule hasta Magallanes, conformando el núcleo de los bosques templados del país y aportando servicios ecosistémicos claves (Donoso, 1993; Veblen et al., 1996). En particular, *N. alpina*, *N. dombeyi* y *N. obliqua*, albergan comunidades diversas de hongos endófitos en hojas, corteza y raíces, entre los cuales destacan géneros como *Mycosphaerella*, *Xylaria*, *Diaporthe/Phomopsis*, *Cryptosporiopsis*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, y en tejidos leñosos *Trichoderma*, *Fusarium* y *Cylindrocarpon*. Asimismo, estudios experimentales han demostrado que plántulas de *Nothofagus* pueden beneficiarse de la inoculación de endófitos de origen antártico pertenecientes a *Penicillium*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Alternaria*, o *Pseudogymnoascus*, los cuales mejoran la tolerancia al estrés post-incendio (Raimilla et al., 2013). Estas especies fueron seleccionadas en este estudio debido a su abundancia en la zona de interés y a su potencial para albergar comunidades endofíticas con capacidad de producir metabolitos bioactivos. Su análisis detallado será desarrollado en la sección metodológica correspondiente.

HIPÓTESIS

Los hongos endófitos aislados de *N. alpina*, *N. dombeyi* y *N. obliqua* cultivados bajo condiciones de laboratorio producen compuestos con actividad antimicrobiana.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Identificar los compuestos antimicrobianos producidos por hongos endófitos cultivados *in vitro*.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar los hongos endófitos aislados de las tres especies de *Nothofagus*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos producidos los hongos endófitos cultivados *in vitro*.
- Identificar él o los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana detectada.

4. METODOLOGÍA

4.1 Recolecta de muestras vegetales de especies *Nothofagus*

Para la obtención de las muestras vegetales, se recolectaron principalmente tallos y hojas, como materiales representativos para el aislamiento de hongos endófitos. Todas las muestras fueron tomadas en distintos puntos de la Región de Ñuble, con el objetivo de incorporar diversidad geográfica. Se seleccionaron ejemplares de *N. alpina*, *N. dombeyi* y *N. obliqua* en tres sectores: Termas de Chillán, sector de Atacalco y San Fabián. Esta estrategia de muestreo buscó abarcar distintos ecosistemas y condiciones ambientales dentro de la región, durante la estación de verano del año 2023.

4.1.1 Desinfección del material vegetal

Una vez recolectadas, fueron puestas en bolsas ziploc almacenadas en cooler. Para después ser sometidas a un proceso de lavado y desinfección superficial con el objetivo de eliminar posibles microorganismos epífitos patógenos o parásitos y reducir el riesgo de contaminación durante el aislamiento de endófitos. Inicialmente, se lavaron con abundante agua potable y se dejaron secar al aire en una campana de flujo laminar. Luego, se aplicó el siguiente protocolo de desinfección: inmersión en etanol al 70% durante 1 minuto, seguida de hipoclorito de sodio al 2,8% durante 3 minutos, y nuevamente etanol al 70% durante 30 segundos, con agitación constante en cada etapa (Qing Miao et al., 2012). Posteriormente, las muestras se enjuagaron tres veces con agua destilada

estéril y se cortaron en pequeños fragmentos para su siembra en placas Petri con medio PDA con antibióticos.

4.2 Aislamiento de hongos endófitos

Una vez realizada la desinfección y distribución del material vegetal en placas Petri, estas se incubaron a 25-27°C y, después, de 3 a 5 días, se observó el crecimiento de los micelios de los hongos desde el material vegetal. En ese momento, se inició el proceso de purificación, que consistió en cortar una muestra del micelio en crecimiento con un bisturí estéril y trasladarlo a otra placa Petri con PDA. Este proceso se repitió hasta aislar cada cepa de hongo obtenido del material vegetal (Schulz et al., 1993).

4.3 Producción de extractos

4.3.1 Cultivos líquidos

Para la obtención de un extracto, el método utilizado fue a través de cultivos miceliales líquidos. Para hacer el cultivo se utilizó el medio MM10 (glucosa, extracto de levadura y extracto de malta en la proporción de 4, 4, 10 g/L). Para el cultivo se depositaron trozos de micelio de los hongos endófitos aislados en matraces de 1L con 500ml de medio “MM10” estéril. Los matraces se llevaron a un agitador orbital a una velocidad de 120 rpm y temperatura ambiente. Este proceso se realizó para cada una de las cepas purificadas. Los matraces se

agitaron hasta que se observó abundante micelio y la glucosa tendió a marcar a cero (Zhang, et al., 2006).

4.3.2 Obtención de extractos

Una vez terminado el cultivo micelial líquido, estos fueron filtrados a través de un papel filtro para separar el micelio del líquido, donde el micelio fue descartado debido a no poseer actividad antimicrobiana relevante. La fase líquida se depositó en un embudo de decantación y se le agregó acetato de etilo en una proporción de 1:1. Una vez listo el proceso de decantación se procedió a separar el acetato de etilo de la fase líquida. El acetato de etilo se denomina “extracto de acetato de etilo”. Se llevó a un evaporador rotatorio a 40°C hasta sequedad. El extracto seco se depositó en un tubo de ensayo, se reconstituyó con metanol y se almacenó a 4°C hasta su uso (Strobel et al., 2003).

4.4 Evaluación de actividad antimicrobiana

Para analizar la actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica) los extractos se ajustaron a una concentración de 10 mg/ml. La Tabla 1 presenta la clasificación utilizada para definir la actividad antibacteriana y antifúngica, midiendo el diámetro de los halos en milímetros. Se consideró que los extractos eran activos cuando se formaron halos de inhibición alrededor de las perforaciones. Cuando los halos tuvieron un diámetro menor o igual a 10 mm, la actividad antimicrobiana se consideró leve (+). Cuando fue de 10 a 20 mm, fue moderado (++) . Y cuando tuvieron un diámetro mayor a 20 mm, fue intenso (+++).

Tabla 1. Clasificación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos en organismos test.

Presencia de halo de inhibición / Diámetro de halo	Positiva	Negativa	Difusa
Menor o igual a 10 mm	+	-	+ ^d
Entre 10 y 20 mm	++	-	++ ^d
Mayor a 20 mm	+++	-	+++ ^d

4.4.1 Actividad antifúngica

Para la actividad antifúngica los extractos obtenidos se evaluaron contra los hongos fitopatógenos *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium* sp., *Penicillium expansum* y *Rhizopus stolonifer*. Estos hongos se encontraban completamente cubiertos por micelio, a partir del cual se obtuvieron las esporas. Bajo campana de flujo laminar, se añadió agua peptonada estéril y, con la ayuda de un asa bacteriológica, se desprendieron las esporas del micelio. La suspensión obtenida se traspasó a tubos de ensayo estériles y se ajustó a una concentración aproximada de 1×10^6 esporas/mL, determinada mediante recuento en cámara de Neubauer. Posteriormente, se inocularon los cultivos en medio PDA en una proporción de 2 mL de suspensión de esporas por cada 100 mL de medio (Sanchis, 2016).

Después de inocular los cultivos en medio PDA mediante la incorporación de 2 mL de suspensión de esporas por cada 100 mL de medio, se prepararon las placas test para la evaluación antifúngica.

Una vez solidificado el PDA/YMG inoculado, en cada placa se realizaron perforaciones de 6 mm de diámetro utilizando un sacabocado estéril. En cada pocillo se depositaron 20 µL del extracto crudo, preparado a una concentración de 10 mg/mL, equivalente a 200 µg por pocillo.

Las placas fueron incubadas a 25 °C durante el tiempo necesario para el desarrollo del halo de inhibición, manteniéndose controles negativos (solvente) y positivos según correspondiera.

4.4.2 Actividad antibacteriana

En los ensayos de sensibilidad antibacteriana se utilizaron diversas cepas bacterianas, tanto Gram positivas como Gram negativas, incluyendo cepas estándares de referencia (ATCC) y cepas clínicas resistentes. La Tabla 2 presenta las especies utilizadas, sus abreviaciones y los respectivos códigos ATCC o designaciones internas cuando corresponde.

Tabla 2. Bacterias utilizadas en los ensayos de sensibilidad y sus respectivos códigos ATCC

Bacteria	Código
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	ATCC 19310
<i>Salmonella</i> spp.	ATCC 14028
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>S. aureus</i> MRSA	ATCC 43300

Las bacterias almacenadas en frío se activaron por traspaso a medio BHI (37 °C, 24 h). Luego se inocularon en medio Mueller-Hinton en una razón de 1 mL de suspensión bacteriana por cada 100 mL de medio, ajustando el inóculo final a 10^6 – 10^7 UFC/mL, para cultivarlas en placas y conservarlas bajo refrigeración hasta su análisis (CLSI, 2018; EUCAST, 2024).

Se realizaron pruebas con las doce bacterias patógenas mencionadas anteriormente. Para las pruebas se prepararon medio de cultivo Müller-Hinton. Al igual que en las pruebas antifúngicas, en cada placa con medio de cultivo PDA/YMG agarificado se realizaron perforaciones con un sacabocado y se depositaron 200 µg de extracto, luego de 24h de incubación a 37°C. Se observaron la presencia o ausencia de halos de inhibición alrededor de las perforaciones.

4.5 Optimización de medios de cultivo líquido

Las cepas cuyos extractos mostraron actividad preliminar frente a bacterias y hongos fueron seleccionadas para su cultivo en distintos medios líquidos, con el fin de identificar las condiciones que favorecieran una mayor producción de metabolitos bioactivos. La optimización consideró variaciones en la composición nutritiva de los medios y su efecto en el crecimiento fúngico, el tiempo de cultivo y el rendimiento de extractos. Adicionalmente, se evaluaron criterios de viabilidad

económica, como el costo de los componentes del medio y el costo por litro de cultivo, así como eficiencia en la obtención de extractos, determinada por el rendimiento de biomasa y la cantidad de extracto crudo obtenido por volumen de cultivo. Este enfoque permitió seleccionar medios que no solo promovieran una bioactividad consistente, sino que también resultaran prácticos y sostenibles para su uso repetido en laboratorio.

Los cultivos fueron incubados bajo dos condiciones de temperatura: temperatura ambiente en condiciones de laboratorio (18–20 °C) y temperatura controlada de 25 °C en incubadora. La comparación entre ambas temperaturas no buscó optimizar el crecimiento, sino evaluar si sus condiciones distintas modulan la biosíntesis de metabolitos, ya que esta no siempre coincide con la temperatura óptima de crecimiento fúngico. Esta aproximación permitió determinar si la temperatura influía en la expresión de metabolitos bioactivos, lo que es consistente con lo reportado por Sánchez-Fernández et al. (2016), quienes indican que factores ambientales como la temperatura, el tipo de medio y el tiempo de fermentación pueden modificar la producción de compuestos secundarios.

Para este caso, se emplearon nueve tipos de medios de cultivo para fermentación líquida, los cuales se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Medios por utilizar en cultivos de fermentación líquida para optimización.

Medio	Ingredientes (g/L)						
	Levadura	Malta en polvo	Malta líquida	Glucosa	Harina de trigo	Harina de maíz	Sacarosa
M1	4	10	-	4	-	-	-
M2	4	-	10	4	-	-	-
M3	-	20	-	-	-	-	-
M4	-	-	20	-	-	-	-
M5	4	4	-	4	-	-	-
M6	4	-	4	4	-	-	-
M7	-	-	-	-	20	-	-
M8	-	-	-	-	-	20	-
M9	-	-	-	-	-	-	20

4.6 Escalamiento de cultivos líquidos

Una vez seleccionado el medio y temperatura más eficaces, se procedió al escalamiento del cultivo líquido en dos etapas, utilizando volúmenes de 2 y 5 L, con el propósito de evaluar si la actividad antimicrobiana de los extractos se mantenía al incrementar la escala de producción.

Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 2 y 5 L de capacidad, conteniendo 1,5 y 3,5 L de medio líquido, respectivamente. Cada matraz fue inoculado con cultivo de semilla previamente incubado en condiciones estándar.

Las fermentaciones se llevaron a cabo bajo dos condiciones de temperatura: ambiente (20–22 °C) y controlada (25°C) en incubadora, manteniendo una agitación constante de 120 rpm en un agitador orbital, hasta observar una colonización completa del medio, siguiendo las recomendaciones para la ampliación de cultivos fúngicos descritas por Papagianni (2004).

4.7 Identificación de hongos por secuenciación

La identificación molecular de las cepas fúngicas se realizó mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS del operón de ARNr, utilizando los cebadores universales ITS1 e ITS4 (White et al., 1990; Schoch et al., 2012).

4.7.1 Extracción de ADN

El ADN genómico se obtuvo a partir de cultivos puros utilizando el kit E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega Bio-tek), siguiendo las instrucciones del fabricante, lo que permitió obtener ADN de alta calidad apto para análisis por PCR y secuenciación (Doyle & Doyle, 1990).

4.7.2 Reacción de PCR

La amplificación de la región ITS se realizó en un volumen final de 40 μ L, con el siguiente protocolo de reacción: ADN molde (1 μ L); Taq DNA polimerasa (0,2 U); Cebador ITS1: 2 μ M; Cebador ITS4: 2 μ M; dNTPs: 0,8 mM cada uno; Buffer de reacción 10X: 4 μ L; Cloruro de magnesio ($MgCl_2$): 1,2 μ L y Agua libre de nucleasas: completar hasta 40 μ L. Este esquema de reacción es una adaptación del protocolo descrito por White et al. (1990) y ha sido ampliamente utilizado en la identificación molecular de hongos endófitos (Arnold & Lutzoni, 2007).

4.7.3 Condiciones de PCR

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos compuestos por una desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, un

alineamiento a 55,5 °C por 30 segundos y una extensión a 72 °C durante 1 minuto. Posteriormente, se efectuó una extensión final a 72 °C durante 10 minutos, finalizando con la conservación de las muestras a 4 °C en espera, en caso de que el equipo permaneciera encendido (Gardes & Bruns, 1993).

4.7.4 Electroforesis y verificación de amplicón

Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (en solución TAE 1X), utilizando un marcador de peso molecular de 600 pb.

El buffer de carga se preparó con GelRed®, agua destilada y Blue Juice™, en una proporción de 1 µL de buffer por cada 5 µL de ADN de muestra. Tras la corrida electroforética, la visualización de las bandas se realizó con un transiluminador UV, confirmando la presencia y el tamaño esperado del amplicón (Sambrook & Russell, 2001).

4.7.5 Secuenciación

Los amplicones confirmados se enviaron a secuenciación hacia la Universidad Austral de Valdivia, y las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos GenBank (NCBI) para la identificación taxonómica.

4.7.6 Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas utilizando el algoritmo ClustalW incorporado en el programa MEGA versión 5.2. A partir de los

alineamientos, se construyeron árboles filogenéticos mediante el método Neighbor-Joining, con 500 réplicas de bootstrap para evaluar la robustez de las ramas. Las secuencias de referencia utilizadas para la comparación se descargaron de la base de datos GenBank (NCBI), seleccionando aquellas correspondientes a especies fúngicas filogenéticamente relacionadas con las cepas en estudio (Hall, 2013).

4.8 Caracterización del compuesto bioactivo

4.8.1 Bioautografía TLC

Para obtener un perfil preliminar de los metabolitos secundarios presentes en los extractos, se realizó cromatografía en capa fina (TLC) convencional.

Los extractos crudos fueron aplicados manualmente mediante un capilar de vidrio en placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (10 × 10 cm), depositando aproximadamente 1–2 µL de muestra por aplicación.

De acuerdo con la naturaleza de cada extracto, se emplearon dos sistemas de fase móvil: Cloroformo:metanol (95:5, v/v) y Acetato de etilo:metanol (1:1, v/v)

Las placas fueron desarrolladas en una cámara cerrada hasta alcanzar un frente de disolvente de 70–80 mm y posteriormente se secaron a temperatura ambiente. Posteriormente, se visualizaron bajo luz UV a 254 nm y 366 nm, registrándose los patrones fluorescentes obtenidos.

Para cada mancha visible se determinó el factor de retención (R_f), calculado como la relación entre la distancia recorrida por el compuesto y la distancia recorrida por el frente del disolvente.

La ecuación del factor de retención (R_f) se calcula de la siguiente forma:

$$R_f = \frac{\textit{distancia recorrida por el componente}}{\textit{distancia recorrida por el disolvente}}$$

4.8.2 Cromatografía HPTLC

Para la visualización preliminar de metabolitos secundarios, los extractos seleccionados fueron analizados mediante cromatografía HPTLC, utilizando placas de sílica gel 60 F₂₅₄ como fase estacionaria y un sistema automatizado de aplicación y desarrollo.

Los extractos crudos obtenidos para cada cepa fueron concentrados y posteriormente reconstituidos en una mezcla de metanol:agua (70:30, v/v) hasta una concentración final de 10 mg/mL. Este solvente correspondió únicamente al medio de disolución del extracto y no a la fase móvil utilizada. El análisis se realizó utilizando un sistema HPTLC. Las muestras fueron aplicadas mediante un aplicador automático Linomat 5 (CAMAG), empleando los siguientes parámetros: distancia al borde inferior 10 mm, longitud de banda 6–8 mm, separación entre pistas 10 mm, volumen 5–10 μ L y flujo 150–200 nL/s.

Para el desarrollo de las placas se empleó como fase móvil una mezcla de tolueno:acetato de etilo (3,15:1,85, v/v). El sistema de elución del equipo fue previamente saturado automáticamente durante 10 minutos con la misma fase móvil para asegurar condiciones homogéneas.

El desarrollo se realizó hasta alcanzar un frente de disolvente de 70–80 mm, controlado por el módulo automático del sistema HPTLC. Tras el desarrollo, las placas fueron secadas durante 10 minutos a 80 °C utilizando un TLC Plate Heater III (CAMAG) con el fin de eliminar trazas de solvente.

Finalmente, las placas fueron examinadas bajo luz UV a 254 nm y 366 nm, registrándose los patrones fluorescentes correspondientes. A partir de las bandas visibles se determinó el factor de retención (R_f) como la razón entre la distancia recorrida por cada compuesto y el frente del disolvente.

Este procedimiento se realizó siguiendo las recomendaciones de Wagner & Blatt (1996) y Harborne (1998) para la separación preliminar de metabolitos secundarios fúngicos.

4.8.3 Cromatografía HPLC

El análisis cromatográfico de los extractos activos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con el propósito de evaluar el perfil químico y determinar la presencia de metabolitos secundarios asociados a la actividad antimicrobiana observada.

El sistema utilizado correspondió a un HPLC Agilent 1260 Infinity, equipado con bomba cuaternaria, inyector automático y detector de arreglo de diodos (DAD). Se empleó una columna C18 ZORBAX Eclipse Plus (4,6 × 150 mm, 5 µm) mantenida a temperatura constante de 25 °C. La fase móvil estuvo compuesta por dos solventes: A (agua ultrapura con 0,1% de ácido fórmico) y B (acetonitrilo HPLC grado). El gradiente de elución se programó de la siguiente manera: 0–5 min (10% B), 5–20 min (10–90% B), 20–25 min (90% B), 25–30 min (90–10% B) y 30–35 min (10% B) para el reequilibrio de la columna. El flujo se mantuvo constante a 1,0 mL·min⁻¹, con un volumen de inyección de 20 µL por muestra.

Cada extracto fue filtrado previamente a través de una membrana PTFE de 0,22 µm antes de la inyección. La detección se realizó a longitudes de onda de 210, 254, 280 y 320 nm, abarcando el rango espectral característico de metabolitos fenólicos, terpenoides y compuestos aromáticos oxigenados.

Los datos cromatográficos fueron registrados y procesados mediante el software Agilent OpenLab ChemStation, y se analizaron los principales picos de absorción en función de su tiempo de retención y área relativa, generando un perfil representativo para cada extracto (Snyder, et al., 2011).

4.8.3.1 Cálculo de Intensidad Relativa en HPLC

La intensidad relativa de cada pico fue calculada a partir de la altura máxima registrada en el cromatograma para cada extracto. Para ello, se midió la altura

individual de cada señal (H_i) desde la línea base hasta el punto máximo del pico, y posteriormente se comparó con la altura del pico de mayor intensidad dentro del mismo cromatograma (H_{max}), el cual se definió como el 100% de intensidad (Harris, D.C., 2015). La intensidad relativa se expresó como un porcentaje según la siguiente fórmula:

$$\text{Intensidad relativa (\%)} = \left(\frac{H_i}{H_{m\acute{a}x}} \right) \times 100$$

Este procedimiento permitió estandarizar la comparación entre picos dentro de cada medio de cultivo, proporcionando una estimación proporcional de la abundancia relativa de los compuestos detectados. Debido a que los datos fueron obtenidos a partir de cromatogramas exportados como imagen, la medición se realizó sobre la altura visual de los picos, lo que constituye un método válido para análisis comparativos cuando no se dispone de integración automatizada de áreas.

4.8.4 Purificación y caracterización estructural del metabolito secundario

El extracto crudo obtenido a partir del cultivo líquido de la cepa seleccionada fue sometido a un proceso de purificación mediante cromatografía en columna abierta, utilizando sílica gel como fase estacionaria. La columna fue empacada con 80 g de sílica gel y acondicionada con una mezcla de tolueno:acetato de etilo (3:2, v/v) como fase móvil, seleccionada en base a los perfiles obtenidos previamente mediante cromatografía en capa fina (TLC). El extracto fue cargado

en la parte superior de la columna y eluido por gravedad, utilizando un volumen total aproximado de 400 mL de fase móvil, recolectándose 18 fracciones de 10 mL cada una en tubos previamente rotulados. Posteriormente, las fracciones obtenidas fueron concentradas mediante rotaevaporación, reconstituidas en metanol y analizadas mediante TLC y ensayos de bioautografía, con el fin de identificar aquellas que contenían el compuesto con actividad antibacteriana. Finalmente, las fracciones seleccionadas fueron reunidas y llevadas a sequedad para su posterior análisis y caracterización.

Las fracciones fueron evaluadas mediante TLC utilizando placas de sílica gel y el mismo sistema de elución empleado en la cromatografía en columna. Adicionalmente, se realizó TLC-bioautografía para detectar compuestos con actividad antibacteriana, aplicando las fracciones sobre placas TLC y exponiéndolas a cultivos de *Bacillus subtilis* mediante el método descrito en la sección 4.4.

Las fracciones activas, seleccionadas según su perfil cromatográfico y actividad, fueron posteriormente purificadas mediante HPLC preparativo utilizando una columna C18 y un gradiente de agua (0,1% ácido fórmico) y acetonitrilo. El material purificado fue analizado finalmente mediante espectrometría de masas (UPLC-DAD-HRMS) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN ^1H , ^{13}C y experimentos 2D), lo que permitió la elucidación estructural del compuesto purificado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Recolección de muestras *N. alpina*, *N. dombeyi* y *N. obliqua*

Las muestras de *N. obliqua* fueron recolectadas tanto en los sectores de Termas de Chillán como en San Fabián, durante la estación de verano el año 2023, específicamente en los detalles que presenta la Tabla 4.

Tabla 4. Sectores donde se recolectaron las muestras vegetales a través de especies *Nothofagus* chilenas.

Lugar	Latitud	Longitud	Especie recolectada
Termas de Chillán	-36.9179	-71.4243	<i>N. alpina</i> , <i>N. dombeyi</i>
San Fabián	-36.5198	-71.5843	<i>N. obliqua</i>
Atacalco	-36.8273	-71.7824	<i>N. obliqua</i> , <i>N. dombeyi</i>

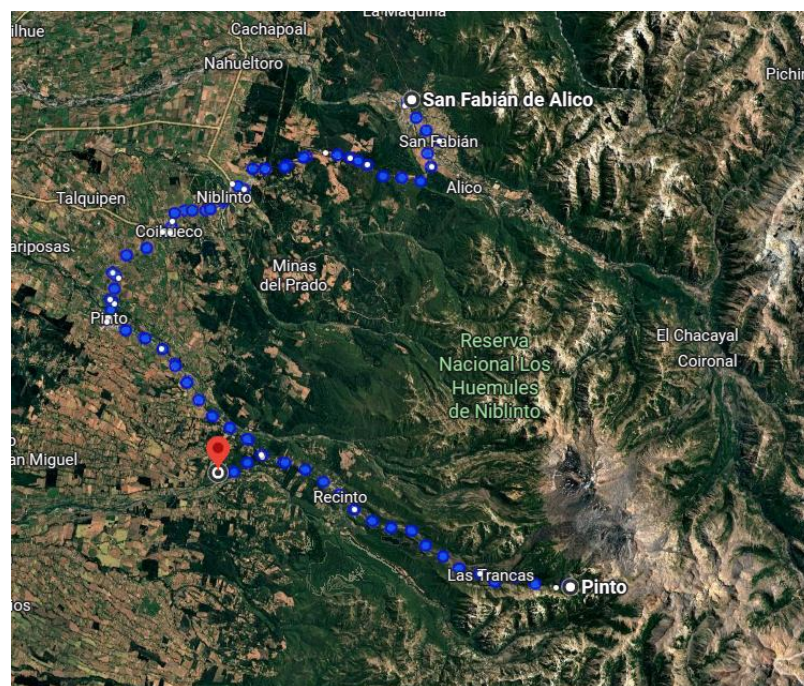


Figura 1. Georreferenciación de los puntos de recolección de las muestras vegetales de *N. alpina*, *N. dombeyi* y *N. obliqua*.

5.1.1 Cepas fúngicas aisladas

En la Tabla 5 se indican los hongos endófitos aislados obtenidos a partir de las muestras vegetales recolectadas. Además, se indica el órgano vegetal de origen. En total, se aislaron 37 cepas, de las cuales el 81,1% provinieron de tallo y el 18,9% de hoja.

La mayor cantidad de aislamientos se registró en *N. dombeyi* (62,2% del total), con 17 cepas de tallo (73,9% de sus aislamientos) y 6 de hoja (26,1%). En *N. obliqua* se obtuvieron 10 cepas (27,0% del total), mayoritariamente de tallo (90,0%), mientras que en *N. alpina* se recuperaron 4 cepas (10,8%), todas procedentes de tallo.

Tabla 5. Cepas obtenidas de las especies *Nothofagus* a estudiar, indicando su origen.

Especie arbórea	Tallos	Hojas	Lugar
<i>N. dombeyi</i>	5, 9, 34, 106, 150, 151, 152, 153, 155, 250, 251, 258, 261, 266, 267, 273, 274, 275, 276	257, 259, 261, 269, 278, 279	5, 9, 34 → At; 106 → TCh; 150–276 →SF
<i>N. obliqua</i>	33, 101, 129, 137, 142, 146	145	33 → At; 101 → TCh; 129–146 →SF
<i>N. alpina</i>	70, 71, 72, 78	—	70–78 → TCh

At: Atacalco. SF: San Fabián: TCh: Termas de Chillán.

En conjunto, estos resultados indican que el tallo fue el tejido con mayor número de aislamientos en las tres especies, patrón que podría relacionarse con su mayor estabilidad micro ambiental y su menor exposición a fluctuaciones externas, lo que favorece la colonización y persistencia de hongos endófitos (Arnold & Lutzoni, 2007; Saikkonen et al., 1998).

Por otro lado, la mayor abundancia registrada en *N. dombeyi* podría vincularse a características anatómicas y químicas propias de la especie, así como a condiciones ambientales locales que modulan la diversidad endofítica (Petrini, 1991). Este patrón ha sido observado previamente en comunidades de *Nothofagus* chilenas, donde la composición del microbioma endofítico varía en función del tejido hospedero, la altitud y la exposición ambiental (Urcelay et al. (2011).

En conjunto, los resultados muestran que la diversidad y abundancia de cepas endofíticas varían según la especie arbórea y el lugar de muestreo. *N. dombeyi* presentó la mayor cantidad y variabilidad de aislamientos, mientras que *N. alpina* mostró la menor diversidad y una distribución restringida. *N. obliqua* ocupó una posición intermedia. A nivel espacial, San Fabián concentró la mayor riqueza de cepas, seguido por Atacalco y Termas de Chillán. Estos patrones sugieren que tanto las características del hospedero como las condiciones ambientales locales influyen en la composición endofítica observada.

Durante el cultivo de las placas, se mostró la aparición de colonias fúngicas a partir del tejido vegetal, lo que evidencia la presencia de hongos endófitos asociados a las especies de *Nothofagus* (Figura 2). Una vez obtenidas las cepas endófitas, se transfirieron fragmentos de micelio a medio PDA fresco para su purificación (Figura 3). Este paso permitió obtener cultivos puros, los cuales fueron utilizados en las siguientes etapas del estudio, incluyendo la identificación morfológica, molecular y los ensayos de actividad antimicrobiana.

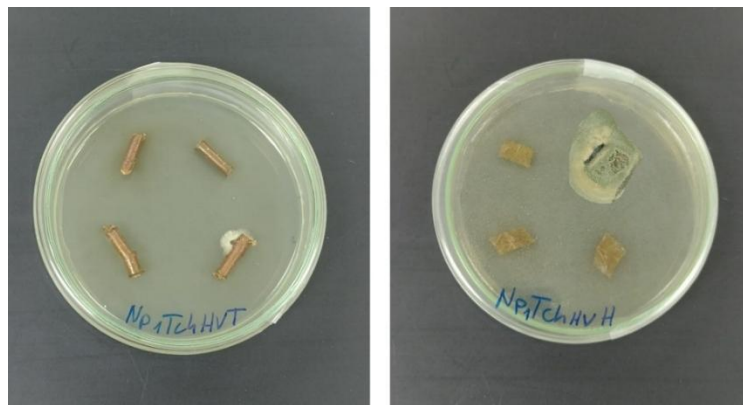


Figura 2. Aparición de micelio a partir de fragmentos de tallo y hoja de *N. alpina* en medio PDA.



Figura 3. Cultivo de cepa purificada endófitas en medio PDA a partir de micelio aislado.

5.2 Identificación de hongos mediante biología molecular

En la Tabla 6 se presentan las cepas identificadas mediante análisis BLAST y comparación con la base de datos GenBank, lo que permitió su caracterización taxonómica a nivel de género y especie. Los resultados evidenciaron una diversidad de taxones pertenecientes a nueve órdenes: Hypocreales (20,0%), Diaporthales (25,7%), Pleosporales (14,3%), Eurotiales (14,3%), Helotiales (11,4%), Botryosphaeriales (8,6%), Polyporales (2,9%), Sordariales (2,9%) y Magnaporthales (2,9%).

Tabla 6. Identificación de las cepas aisladas a través de BLAST y Genbank.

Cepa	Orden	Especies	Similitud %	Número de acceso	Lugar/órgano
Na-70	Hypocreales	<i>Fusarium petroliphilum</i>	100	JN235238.1	Na/tallo
Na-71	Helotiales	<i>Pezicula sp.</i>	100	JN198438.1	Na/tallo
Na-72	Diaporthales	<i>Pseudovalsa modonia</i>	92.24	MH863718.1	Na/tallo
Na-78	Helotiales	<i>P. cinnamomea</i>	100	MH857079.1	Na/tallo
Nd-5*	Hypocreales	<i>Trichoderma sp.</i>	100	MK871186.1	Nd/tallo
Nd- 9	Hypocreales	<i>T. longibrachiatum</i>	99.44	MW756930.1	Nd/tallo
Nd-34	Hypocreales	<i>Clonostachys rosea</i>	100	OQ891611.1	Nd/tallo
Nd-106	Eurotiales	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	MF925705.1	Nd/tallo
Nd-150	Diaporthales	<i>D. rudis</i>	99	MT256131.1	Nd/tallo
Nd -151	Pleosporales	<i>A. Alternata</i>	99	MF061753.1	Nd/tallo
Nd-152	Helotiales	<i>P.neocinnamomea</i>	100	KR859218.1	Nd/tallo
Nd -153	Pleosporales	<i>A. arborescens</i>	100	DQ242505.1	Nd/tallo
Nd-155	Diaporthales	<i>D. patagonica</i>	99	KT323149.1	Nd/hoja
Nd-250*	Hypocreales	<i>F. tricinctum</i>	100	MN833915.1	Nd/tallo
Nd-251	Pleosporales	<i>Paraconiothyrium archidendri</i>	100	OQ835627.1	Nd/tallo
Nd-257	Botryosphaeriales	<i>N. nonquaesitum</i>	100	MT587498.1	Nd/tallo
Nd-258*	Pleosporales	<i>A. consortialis</i>	100	KU726973.1	Nd/tallo
Nd-259	Eurotiales	<i>P. crustosum</i>	100	MT582770.1	Nd/hoja
Nd-261	Eurotiales	<i>P. expansum</i>	100	MT582774.1	Nd/tallo
Nd-266	Eurotiales	<i>P. commune</i>	100	MT299598.1	Nd/tallo
Nd-267	Diaporthales	<i>C. ilicis</i>	92.77	NR_171088.1	Nd/tallo
Nd-269	Diaporthales	<i>D. raucanorum</i>	100	MN509710.1	Nd/tallo
Nd-273	Magnaporthales	<i>Pyricularia caricis</i>	99.38	MK432729.1	Nd/tallo
Nd-274	Diaporthales	<i>D. araucanorum</i>	99.55	MN509710.1	Nd/tallo

Nd-275	Diaporthales	<i>C. modonium</i>	94.37	MH674331.1	Nd/tallo
Nd-276	Eurotiales	<i>P. crustosum</i>	100	MT582770.1	Nd/tallo
Nd-278	Polyporales	<i>Phanerodontia magnoliae</i>	100	MK607594.1	Nd/hoja
Nd-279	Helotiales	<i>Hymenotorrendiella sp.</i>	96.59	OR565296.1	Nd/hoja
No-33	Diaporthales	<i>Diaporthe cynaroidis</i>	100	ON193770.1	No/tallo
No-101	Hypocreales	<i>C. rosea</i>	100	KP269006.1	No/tallo
No-129	Pleosporales	<i>Tallophylium globuliferum</i>	99	OQ148588.1	No/tallo
No-137	Diaporthales	<i>Coryneum umbonatum</i>	92.59	MH859114.1	No/tallo
No-142	Botryosphaerales	<i>Neofusicoccum nonquaesitum</i>	100	MH864187.1	No/tallo
No-145	Sordariales	<i>Chaetomium rectangulare</i>	99.82	OQ108372.1	No/hoja
No-146	Botryosphaerales	<i>Neofusicoccum arbuti</i>	100	MN166004.1	No/tallo

Esta distribución confirma la coexistencia de endófitos con estrategias ecológicas diversas dentro de las especies de *Nothofagus*, lo cual coincide con estudios previos realizados en *Nothofagus* de Patagonia y otras regiones templadas del hemisferio sur, donde se ha descrito una alta diversidad de hongos endófitos asociados a raíces y tejidos leñosos (Godeas et al., 2013; Vohník et al., 2013).

Entre los hongos identificados se encontraron géneros de importancia agrícola y biotecnológica, tales como *Clonostachys rosea*, *Trichoderma sp.* y *Alternaria arborescens*, conocidos por su capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad antifúngica y promotora del crecimiento vegetal, actuando como agentes de biocontrol frente a fitopatógenos (Harman et al., 2004; Roberti, 2006; Ruano-Rosa et al., 2016).

Asimismo, se identificaron especies pertenecientes al género *Penicillium* (*P. crustosum*, *P. chrysogenum*, *P. expansum* y *P. commune*), las cuales presentan relevancia tanto en la producción de antibióticos, como la penicilina derivada de

P. chrysogenum, como en la síntesis de micotoxinas, por ejemplo, patulina y citrinina en *P. expansum*, con implicancias en inocuidad alimentaria y farmacología (Frisvad & Samson, 2004; Avnish, 2018).

Por otra parte, se detectaron especies fitopatógenas relevantes como *F. tricinctum* y *F. petroliphilum*, ambas asociadas a enfermedades vasculares y necrosis en cultivos agrícolas, además de miembros de la familia *Botryosphaeriaceae* (*Neofusicoccum nonquaesitum*, *N. arbuti*), causantes de muerte regresiva en árboles leñosos (Burgess et al., 2006; Udayanga et al., 2011). También se registraron especies del género *Diaporthe* (*D. cynaroidis*, *D. rudis*, *D. patagonica*, *D. araucanorum*), las cuales han sido reportadas tanto como endófitos mutualistas como patógenos latentes, dependiendo de las condiciones del hospedero y del ambiente (Crous et al., 2021).

En términos de composición, los géneros más representativos fueron *Diaporthe* y *Penicillium* (con cuatro especies cada uno), seguidos de *Alternaria* (tres especies) y *Pezizula* (dos especies). Este nivel de riqueza específica sugiere una alta diversidad de hongos endófitos asociados a *Nothofagus*, comparable con la descrita en otros estudios que señalan entre 15 y 35 taxones por árbol hospedero en ecosistemas templados (Arnold & Lutzoni, 2007; Vohník et al., 2013).

En conjunto, estos resultados muestran que las comunidades fúngicas aisladas integran géneros con un amplio espectro funcional, que incluye endófitos con

potencial biotecnológico y agrícola (*Trichoderma*, *Clonostachys*, *Pezizula*), fitopatógenos facultativos (*Fusarium*, *Diaporthe*, *Neofusicoccum*) y especies con aplicaciones industriales (*Penicillium*), confirmando la relevancia ecológica y aplicada de los endófitos asociados a especies de *Nothofagus* (Strobel et al., 2004; Kusari et al., 2012).

La amplificación de las regiones objetivo de ADN de las cepas seleccionadas se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa, observándose bandas nítidas y de intensidad homogénea en la mayoría de las muestras, lo que confirma la obtención de productos de PCR de calidad suficiente para su posterior secuenciación (Figura 4).

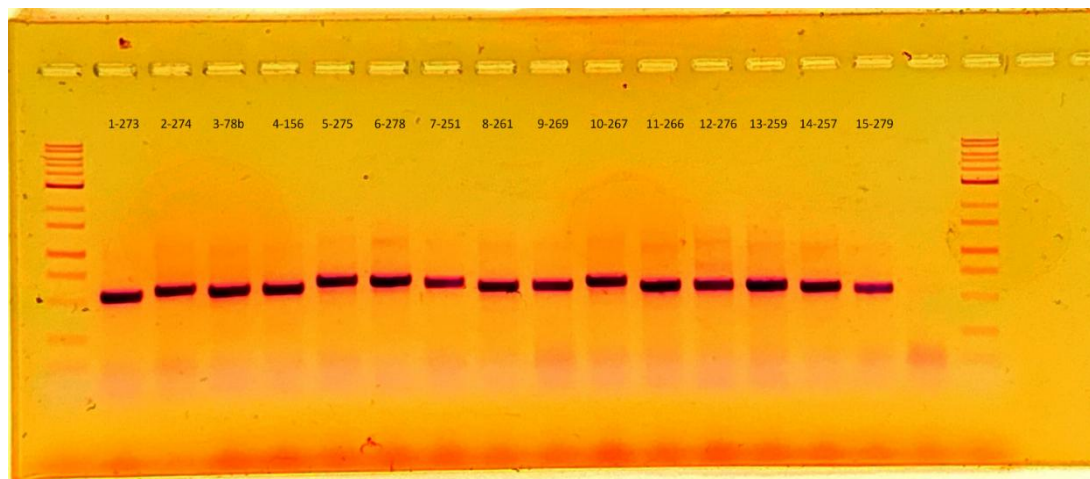


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% w/v teñido con un agente intercalante, de los amplicones obtenidos a partir del ADN de hongos, utilizando ITS.

Este resultado confirma que las muestras contenían ADN de calidad y que la amplificación de la región ITS se realizó de manera precisa, lo que permitió su uso posterior en análisis de secuenciación.

5.2.1 Filogenia

El análisis filogenético permitió visualizar la relación evolutiva entre las cepas aisladas y las especies de referencia depositadas en la base de datos GenBank. En general, las cepas se agruparon de acuerdo con su identidad molecular previamente determinada por análisis BLAST, confirmando la consistencia taxonómica de la identificación

5.2.1.1 Árbol filogenético de cepa Nd-5.

A continuación, en la Figura 5 se puede apreciar un árbol filogenético utilizando Neighbor-Joining (500 bootstrap) para el género *Trichoderma*, incluyendo las cepas 5 y 9, previamente identificadas.

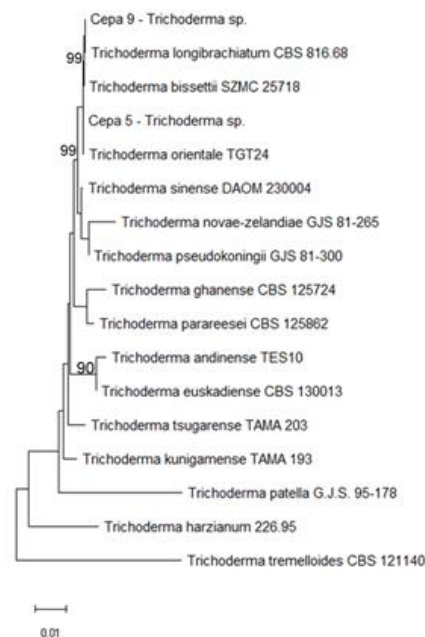


Figura 5. Árbol filogenético utilizando Neighbor-Joining (500 bootstrap) género *Trichoderma* del gen ITS.

El análisis muestra que las cepas identificadas preliminarmente como *Trichoderma sp.* se agrupan en clados distintos, lo que sugiere que corresponden a especies diferentes dentro del género. La cepa Nd-9 presenta una relación filogenética estrecha con *T. longibrachiatum* (CBS 816.68) y *T. bissettii* (SZMC 25718), con valores de soporte bootstrap de 99%, lo que respalda su identificación como *T. longibrachiatum*. Este patrón filogenético es consistente con lo reportado por Chaverri et al. (2015) y Jaklitsch & Voglmayr (2015), quienes destacan la amplia variabilidad intraespecífica y la existencia de linajes crípticos dentro del género *Trichoderma*, especialmente en complejos taxonómicos como *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*

Por su parte, la cepa Nd-5 se agrupa cercanamente con *T. orientale* (TGT24), también con un soporte bootstrap de 99%, aunque forma una rama separada dentro del clado, lo que indica una afinidad genética alta, pero sin coincidencia completa con ninguna especie de referencia disponible en GenBank. Esto sugiere que Nd-5 podría corresponder a una variante genética poco representada o potencialmente a una especie endófito local no descrita previamente.

La presencia de otros clados con soportes elevados (por ejemplo, 90% para *T. andinense* y *T. euskadiense*) evidencia la diversidad genética del género *Trichoderma* y la robustez de las agrupaciones obtenidas. La interpretación de estos patrones filogenéticos es relevante para este estudio, ya que permite confirmar la validez taxonómica de las cepas aisladas y aporta información sobre las posibles relaciones evolutivas y adaptativas entre cepas endófitas y especies de referencia.

Dado que la cepa Nd-5 no mostró coincidencia plena con ninguna especie depositada en GenBank y solo presentó cercanía con *T. orientale*, se mantuvo su clasificación como *Trichoderma* sp.. Esta decisión evita una asignación taxonómica errónea y deja abierta la posibilidad de realizar estudios complementarios con marcadores multilocus (como *tef1- α* o *rpb2*), que podrían confirmar su identidad específica y aportar evidencia sobre su potencial biotecnológico como endófito productor de metabolitos antimicrobianos (Chaverri et al., 2015; Schmoll et al., 2016).

5.2.1.2 Árbol filogenético de cepa Na-78

A continuación, en la Figura 6 se puede apreciar un árbol filogenético utilizando Neighbor-Joining (500 bootstrap) para el género *Pezizula*.

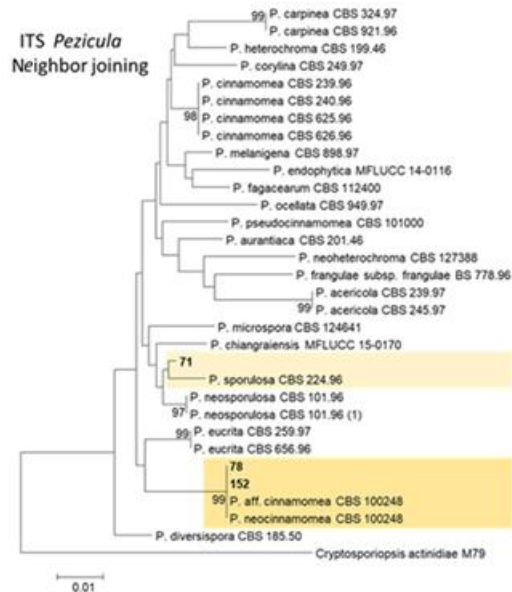


Figura 6. Árbol filogenético utilizando Neighbor-Joining (500 bootstrap) género *Pezizula* del gen ITS incluyendo *Cryptosporiopsis* como externo.

El análisis filogenético basado en secuencias ITS permitió ubicar a las cepas endófitas aisladas dentro de distintos clados del género *Pezizula*. En la Figura 6 se observa que la cepa Na-71 se agrupa con *P. sporulosa* (bootstrap = 71 %), lo que indica una relación cercana, pero con soporte moderado. En cambio, las cepas Na-78 y Na-152 forman un clado bien definido junto a *P. aff. cinnamomea* y *P. neocinnamomea*, con altos valores de soporte (bootstrap = 99 %), lo que evidencia una relación genética estrecha con este complejo de especies. Adicionalmente, se observan otros grupos del género con soportes de 97 % y 99

%, lo que respalda la consistencia general del árbol y la validez de las agrupaciones obtenidas.

La separación clara de estos linajes dentro del árbol sugiere que los endófitos asociados a *Nothofagus* representan varios grupos filogenéticos dentro de *Pezicula*, posiblemente con especialización ecológica. La cepa Na-78, además de su posición filogenética robusta, mostró una actividad antimicrobiana sobresaliente, lo que refuerza el potencial biotecnológico de los linajes relacionados con *P. cinnamomea*. Estos resultados son coherentes con estudios previos que reportan especies de *Pezicula* como productoras de metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas y antifúngicas (Bills et al., 2012; Hashimoto et al., 2015).

No obstante, la resolución filogenética obtenida con el marcador ITS presenta limitaciones para discriminar especies cercanas dentro del género *Pezicula*. Por ello, se recomienda complementar estos resultados con análisis multilocus (ej. *tef1- α* , *rpb2*, *β -tubulina*), que permitirían confirmar la identidad específica de los aislamientos y esclarecer su posición evolutiva (Tanney & Seifert, 2020).

5.2.1.3 Árbol filogenético de cepa Nd-250

En la Figura 7 se presenta el árbol filogenético obtenido mediante el método Neighbor-Joining (500 réplicas de bootstrap) para el género *Fusarium*, sección *Tricinatum*, incluyendo la cepa Nd-250 previamente identificada.

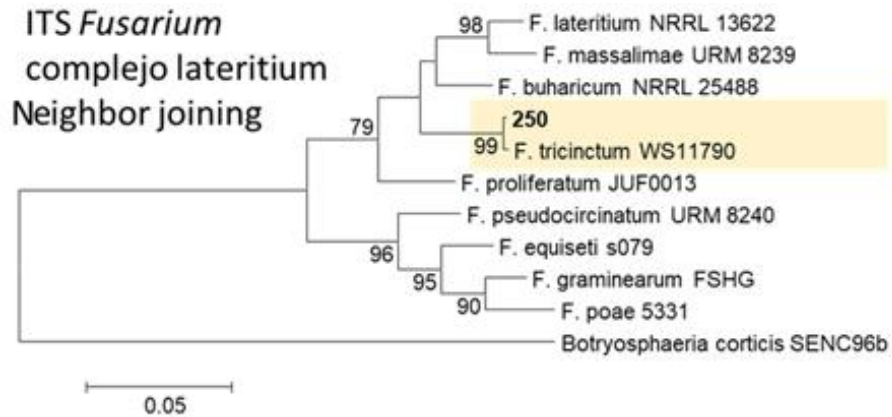


Figura 7. Árbol filogenético utilizando Neighbor-Joining (500 bootstrap) del género *Fusarium* sect. *tricinctum* del gen ITS incluyendo *Botryosphaeria* como externo.

El árbol filogenético basado en ITS, como muestra la Figura 7, ubica al aislado 250 en un clado bien soportado con *F. tricinctum* (bootstrap = 99%), lo que indica una alta afinidad con este complejo. Este resultado contrasta con la identificación preliminar por BLAST, que también lo asignó al mismo grupo, y pone de relieve una limitación conocida del marcador ITS en *Fusarium*, ya que no siempre discrimina con precisión entre complejos cercanos (O'Donnell et al., 2013; Geiser et al., 2021). Por ello, la identidad específica del aislado 250 debiera confirmarse mediante un enfoque multilocus, utilizando marcadores como *TEF1- α* , *RPB2*, *TUB2* y, de ser posible, *CAL*, lo que permitiría una resolución filogenética más confiable (Kulik et al., 2017), junto con la evaluación de rasgos morfológicos en cultivo.

5.2.1.4 Árbol filogenético de cepa Nd-258

En la Figura 8 se presenta el árbol filogenético obtenido para el género *Alternaria*, donde el aislado ND-258 se ubica firmemente dentro de la sección *Ulocladioides*, agrupándose con especies de referencia como *A. atra*, *A. consortialis*, *A. multiformis* y *A. subcucurbitae*, con un alto soporte de bootstrap (96%).

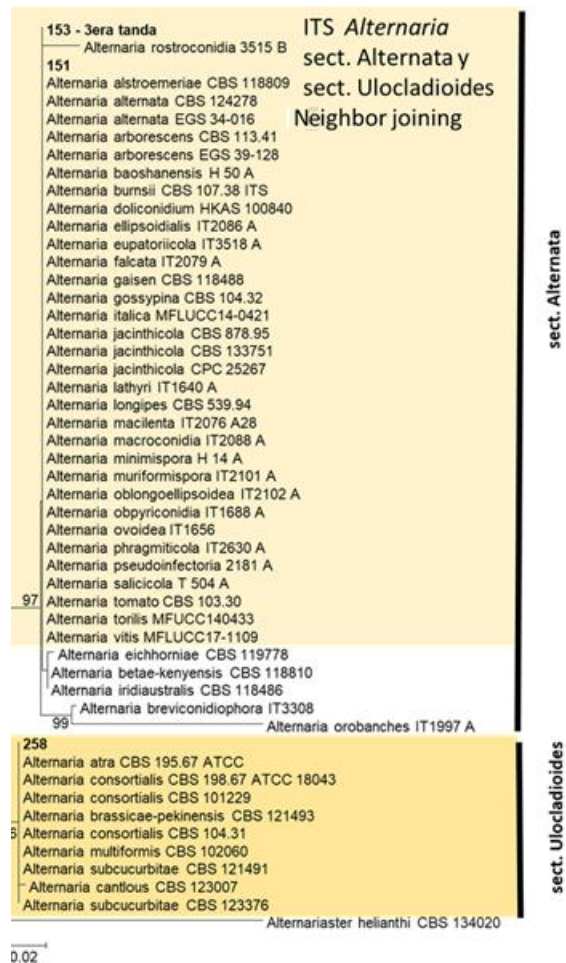


Figura 8. Árbol filogenético utilizando Neighbor-Joining (500 bootstrap) del género *Alternaria* sect. *Ulocladioides* y sect. *Alternata* del gen ITS incluyendo *Alternariaster helianthi* como externo.

Esta asociación filogenética difiere de lo observado para los aislados Nd-151 y Nd-153, que se integraron en la sección *Alternata*, lo que indica que el aislado Nd-258 pertenece a un linaje diferente dentro del género. La estrecha relación con *A. consortialis* es particularmente relevante, ya que diversas especies de esta sección han sido reportadas como productoras de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y antibacteriana (Andersen et al., 2015), lo que podría explicar el perfil bioactivo observado para este aislado en los ensayos realizados.

Por otra parte, la complejidad taxonómica del género *Alternaria*, junto con la existencia de especies crípticas y polifiléticas dentro de las secciones *Alternata* y *Ulocladioides*, ha sido ampliamente documentada, por lo que se recomienda complementar el análisis ITS con un enfoque multilocus que incluya genes como *gapdh*, *tef1- α* y *Alt a1* para lograr una delimitación más precisa y robusta (Lawrence et al., 2013).

El análisis filogenético general de los aislados evaluados permitió establecer su pertenencia a distintos géneros y secciones, reflejando así una diversidad taxonómica considerable dentro del conjunto de hongos endófitos obtenidos. Esta caracterización molecular no solo permitió conocer con mayor precisión las relaciones evolutivas entre los aislamientos, sino también establecer un marco interpretativo para comprender sus posibles capacidades biosintéticas y su potencial biotecnológico.

5.3 Evaluación de actividad antimicrobiana

A continuación, se presentan los resultados de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos obtenidos de las cepas aisladas. Con los resultados de las actividades antibacterianas y antifúngicas, se escogieron aquellos extractos con mayor actividad.

5.3.1 Actividad antibacteriana

La Tabla 7 muestra los resultados del ensayo antibacteriano frente a las 13 bacterias patógenas evaluadas. Se observa que los extractos de *Trichoderma sp.* (Nd-5), *F. tricinctum* (Nd-250) y *A. consortialis* (Nd-258) destacaron por presentar la mayor actividad inhibitoria. Entre ellas, *F. tricinctum* exhibió la respuesta más intensa, mientras que *P. cinnamomea* (Na-78) y *A. consortialis* mostraron una actividad moderada. En contraste, *Trichoderma sp.* (Nd-5) se caracterizó por una mayor amplitud de espectro, ya que presentó inhibición frente al mayor número de bacterias en comparación con las demás cepas activas.

Tabla 7. Actividad antibacteriana de las cepas aisladas.

Cepa	Bc	Bs	Ea	Ec	Ef	Kn	Lm	PSA	Sal	Sa	Se	Sa MRSA
Na-70	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+ ^d	+++	-
Na-71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na-72	++	+++	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
Na-78	++	++	-	+ ^d	-	+ ^d	++	+ ^d	+ ^d	++	++	++
Nd-5	++	++	++	-	-	-	++	++	-	++	-	+ ^d
Nd- 9	++	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	-

Nd-34	++	++	++	-	-	-	-	-	-	++	++	-
Nd-106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nd-150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nd - 151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nd-152	-	-	-	-	-	+ ^d	-	-	-	-	-	-
Nd - 153	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nd-155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nd-250	++	-	+++	-	-	-	+++	+++	++	++	-	-
Nd-251	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nd-257	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nd-258	++	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-
Nd-259	-	-	+ ^d	-	-	-	+ ^d	-	-	-	-	-
Nd-261	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nd-266	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nd-267	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nd-269	-	+ ^d	-	-	-	++	-	-	-	+ ^d	-	-
Nd-273	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nd-274	-	-	-	+ ^d	-	-	-	-	+ ^d	-	-	-
Nd-275	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nd-276	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nd-278	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nd-279	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No-33	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No-101	++	++	-	+ ^d	-	-	-	++	+ ^d	+ ^d	-	-
No-129	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+++	++	++
No-137	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No-142	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No-145	-	+ ^d	-	-	-	-	-	-	+ ^d	-	-	-
No-146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Bc, *B. cereus*; Bs, *B. subtilis*; Ea, *E. aerogenes*; Ef, *E. faecalis*; Ec, *E. coli*; Kp, *K. pneumoniae*; Lm, *L. monocytogenes*; Sal, *Salmonella* spp.; Sa, *S. aureus*; Se, *S. epidermidis*; Sa MRSA, *S. aureus* resistente a meticilina. (+): Baja actividad (Halo de inhibición < 10 mm), (++): Actividad media (Halo de inhibición entre 10 – 20 mm), (+++): Alta actividad (Halo de inhibición > 20 mm), (-): Sin actividad, (+^d): Actividad difusa.

De acuerdo con la Tabla 7, que presenta la actividad antibacteriana de 35 extractos de hongos endófitos frente a un panel de bacterias Gram positivas y Gram negativas, se consideró como activo aquel extracto que presentó inhibición contra al menos una bacteria de alguno de los dos grupos (Gram+ o Gram-). Dentro del grupo de bacterias Gram positivas, compuesto por *B. cereus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), 15 de los 35 extractos evaluados (42,9%) mostraron algún grado de inhibición.

En el grupo de bacterias Gram negativas, integrado por *E. aerogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Salmonella* sp., 11 extractos (31,4%) fueron activos. Estos resultados indican que los extractos fueron más activos frente a bacterias Gram positivas (42,9%) que frente a Gram negativas (31,4%), lo cual concuerda con la mayor resistencia estructural de las bacterias Gram negativas debido a la presencia de lipopolisacáridos en su membrana externa, que actúan como barrera frente a compuestos antimicrobianos (Nikaido, 2003; Li & Nikaido, 2009).

Al analizar la sensibilidad bacteriana, se observó que *B. cereus* fue la especie más susceptible, siendo inhibida por el 54% de los extractos activos, seguida por

B. subtilis (46%), *S. aureus* (37%) y *L. monocytogenes* (29%). En cambio, las Gram negativas mostraron menor sensibilidad global, con *E. aerogenes* y *K. pneumoniae* inhibidas solo por un 17% y un 11% de los extractos respectivamente.

En cuanto a la intensidad de la respuesta, 7 de las 35 cepas (20%) presentaron una inhibición alta, destacando *F. tricinctum* (Nd-250), *Trichoderma sp.* (Nd-5), *T. longibrachiatum* (Nd-9), *F. petroliphilum* (Na-70), *P. cinnamomea* (Na-78), *P. modonia* (Na-72) y *T. globuliferum* (No-129). Entre ellas, *F. tricinctum* (Nd-250) y *P. cinnamomea* (Na-78) presentaron el espectro de inhibición más amplio, actuando contra bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, incluyendo patógenos clínicamente relevantes como *S. aureus* MRSA y *E. coli*.

En términos taxonómicos, las especies más activas se concentraron principalmente en los órdenes Hypocreales (*Fusarium*, *Trichoderma*, *Clonostachys*) y Helotiales (*Pezizula*), lo que coincide con reportes previos que señalan a estos linajes como productores frecuentes de metabolitos secundarios antibacterianos y antifúngicos (Arnold & Lutzoni, 2007; Schulz et al., 2002; Gao et al., 2017). Este patrón sugiere que la pertenencia a determinados linajes fúngicos podría estar asociada a una mayor capacidad biosintética para generar compuestos bioactivos de interés farmacológico y agrícola.

5.3.2 Actividad antifúngica

La Tabla 8 muestra los resultados del ensayo antifúngico frente a las siete cepas de hongos fitopatógenos evaluadas. Al igual que en los ensayos antibacterianos, las cepas *Trichoderma sp.* (Nd-5), *F. tricinctum* (Nd-250) y *A. consortialis* (Nd-258) presentaron actividad inhibitoria, aunque en este caso destacó principalmente *P. cinnamomea* (Na-78), que exhibió halos de inhibición amplios y consistentes frente a la mayoría de los fitopatógenos ensayados.

Tabla 8. Actividad antifúngica de las cepas aisladas.

Cepa	Aa	An	Bo	Cc	Fu	Pe	Rs
Na-70	+	-	-	-	-	++	-
Na-71	-	-	-	-	-	-	++
Na-72	++	+++	-	-	-	-	++
Na-78	-	+++	+++	-	+++	+++	+++
Nd-5	++	-	-	-	-	-	-
Nd- 9	-	-	-	-	-	-	-
Nd-34	-	-	-	-	-	-	-
Nd-106	-	-	-	-	-	-	-
Nd-150	-	-	-	-	-	-	-
Nd -151	-	-	-	-	-	-	-
Nd-152	-	-	-	-	-	-	-
Nd -153	-	-	-	-	-	-	-
Nd-155	-	-	-	-	-	-	-
Nd-250	-	++	-	-	-	+	++
Nd-251	-	-	-	-	-	-	-
Nd-257	-	-	++	-	-	-	-

Nd-258	-	+++	-	+++	-	-	-
Nd-259	-	-	-	-	++	-	-
Nd-261	-	-	-	-	-	-	-
Nd-266	-	-	-	-	-	-	-
Nd-267	-	-	++	-	-	-	-
Nd-269	-	-	-	-	-	++	-
Nd-273	-	-	-	++	-	-	-
Nd-274	-	-	-	-	-	-	-
Nd-275	-	-	-	-	-	++	-
Nd-276	-	-	-	-	-	++	-
Nd-278	-	-	-	-	-	-	-
Nd-279	-	-	-	-	-	-	-
No-33	-	-	-	-	-	-	-
No-101	++	+	-	++ ^d	+	++ ^d	++
No-129	-	-	-	-	-	-	-
No-137	-	-	-	-	-	-	-
No-142	-	++	-	-	-	++	-
No-145	-	-	-	-	-	-	-
No-146	-	-	++	-	++	-	-

An, *A. niger*; *Aa*, *A. Alternata*; *Bo*, *B. Cinerea*; *Cc*, *C. cladosporioides*; *Fus* *Fusarium sp*; *Pen*, *P. expansum*; *Rs*, *R. stolonifer*. (+): Baja actividad (Halo de inhibición < 10 mm), (++) : Actividad media (Halo de inhibición entre 10 – 20 mm), (+++) : Alta actividad (Halo de inhibición > 20 mm), (-): Sin actividad, (+^d): Difuso.

De los 35 extractos analizados, 5 cepas (14,3%) presentaron halos de inhibición de máxima intensidad, frente a al menos un hongo patógeno, las cuales fueron *P. cinnamomea* (Na-78), *A. consortialis* (Nd-258), *P. modonia* (Na-72), *C. rosea* (No-101) y *F. tricinctum* (Nd-250). Sin embargo, el patrón de inhibición fue variable. Mientras, *P. cinnamomea* (Na-78) mostró inhibición frente a la mayoría de los fitopatógenos evaluados (5 de 7), y los halos obtenidos correspondieron a intensidades moderadas a altas (++/+++), por lo que se consideró una inhibición amplia y de alta intensidad. *A. consortialis* (Nd-258) presentó halos de inhibición de alta intensidad (+++) frente a *A. niger* y *C. cladosporioides*.

En términos taxonómicos, los mayores niveles de actividad se concentraron en los órdenes Helotiales (*Pezicula*), Nectriaceae (*Fusarium*), y Hypocreaceae (*Trichoderma*), todos ampliamente reconocidos como productores de metabolitos antifúngicos y antibacterianos con estructuras químicas diversas (Strobel, 2018). En particular, *Pezicula* sp. ha sido reportado como un género capaz de sintetizar piranocumarinas, sesquiterpenos y compuestos fenólicos con acción inhibitoria frente a hongos fitopatógenos como *Botrytis* y *Alternaria* (Aly et al., 2011), lo cual coincide con la elevada potencia observada para la cepa *P. cinnamomea* (Na-78).

En cuanto a la comparación por sitios de recolección, los aislamientos provenientes de Termas de Chillán (*P. cinnamomea* (Na-78), *P. modonia*) mostraron las actividades más altas y consistentes, seguidos por los de *N.*

dombeyi de San Fabián (*A. consortialis* (Nd-258) y *F. tricinatum* (Nd-250)), mientras que los aislados de Atacalco presentaron un menor porcentaje de extractos activos, tal como muestra la Tabla 9. Esta tendencia podría estar asociada a diferencias microambientales entre los sitios, particularmente a la altitud y humedad, factores que influyen en la expresión de metabolitos secundarios en hongos endófitos (Porras-Alfaro & Bayman, 2011).

Tabla 9. Actividad antifúngica según sitio de recolección

Sitio de recolección	Cepa	Especie	Fitopatógenos inhibidos	Intensidad
Termas de Chillán (TCh)	Na-78	<i>P. cinnamomea</i>	<i>Aa, An, Bo, Fu, Pe, Rs</i>	+++ (alta)
San Fabián (SF)	Nd-258	<i>A. consortialis</i>	<i>An, Cc</i>	+++ (alta)
	Nd-250	<i>F. tricinatum</i>	<i>An, Rs</i>	++ (moderada)
Atacalco (At)	Nd-5	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Aa</i>	++ (moderada)
	Resto de aislados	—	No hubo inhibición significativa	—

An, A. niger; Aa, A. alternata; Bo, B. cinerea; Cc, C. cladosporioides; Fus, Fusarium sp; Pen, P. expansum; Rs, R. stolonifer.

En cuanto a los fitopatógenos, *A. niger* fue el microorganismo más susceptible, mostrando alta inhibición en el 28,6% de los extractos activos, seguido de *C. cladosporioides* y *R. stolonifer* (14,3%). Esto sugiere que los metabolitos producidos por ciertos endófitos poseen mecanismos de acción más efectivos frente a hongos filamentosos de crecimiento rápido, posiblemente por interferencia en la biosíntesis de quitina o permeabilidad de la pared celular (Zhao et al., 2018).

Finalmente, considerando los resultados combinados de los ensayos antibacterianos y antifúngicos, se seleccionaron cuatro cepas como las más promisorias para estudios posteriores, las cuales son *Trichoderma sp.* (Nd-5), que resultó activa frente a múltiples bacterias Gram positivas y con inhibición puntual frente a hongos fitopatógenos. *F. tricinctum* (Nd-250) mostró actividad tanto antibacteriana como antifúngica, con inhibición notable frente a *A. niger* y *R. stolonifer*, sugiriendo una producción estable de compuestos bioactivos. *A. consortialis* (Nd-258) presentó una inhibición de alta intensidad (+++) pero selectiva frente a *A. niger* y *C. cladosporioides*, lo que sugiere un potencial especializado en el control de ciertos fitopatógenos. Y, por último, *P. cinnamomea* (Na-78) que es la cepa con el perfil bioactivo más diverso, mostrando halos intensos y consistentes tanto frente a bacterias como hongos fitopatógenos, lo que la posiciona como un candidato prioritario para estudios de purificación y caracterización de metabolitos secundarios.

En conjunto, los resultados confirman que los hongos endófitos asociados a *Nothofagus* constituyen una fuente promisoriosa de metabolitos antifúngicos y antibacterianos, reforzando el potencial biotecnológico de la comunidad fúngica endófito chilena para el desarrollo de agentes naturales de control fitopatológico.

5.4. Optimización de medios

Con el fin de maximizar la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, se llevó a cabo un proceso de optimización de medios de cultivo, evaluando los efectos combinados de dos factores principales: la composición del medio y la temperatura de fermentación.

Para ello, se seleccionaron las cepas que mostraron las actividades más destacadas en los ensayos antimicrobianos previos: *Trichoderma* sp. (Nd-5), *P. cinnamomea* (Na-78), *F. tricinctum* (Ns-250) y *A. consortialis* (Nd-258).

En las siguientes subsecciones, se presentan los resultados y análisis correspondientes a cada cepa en particular, incluyendo la comparación entre medios, el efecto de la temperatura y la estabilidad de la actividad antimicrobiana observada.

5.4.1 Optimización de medios cultivo cepa *Trichoderma* sp. (Nd-5)

A partir de la cepa *Trichoderma* sp. (Nd-5) elegida para optimización de medio, debido a su considerable actividad antibacteriana, se realizaron los correspondientes ensayos contra las bacterias patógenas testeadas anteriormente, solo que ahora cultivado en distintos medios (Tabla 3). La Tabla 10 muestra los resultados de la cepa con su respectiva optimización de medios y el tamaño de los halos de inhibición.

Tabla 10. Relación entre medio de cultivo y diámetro de inhibición en *Trichoderma* sp. (Nd-5)

Medio	Bc	Bs	Ea	Lm	Sa	Se	Aa	An	Bo	Cc	Pen	Rs
M1	++	++	+ ^d	+ ^d	++	++	+ ^d	-	-	+ ^d	++	++
M2	++	++	+ ^d	+ ^d	-	-	-	-	-	-	-	-
M3	++	++	+ ^d	+ ^d	++	-	-	-	-	-	-	-
M4	++	++	+ ^d	+ ^d	-	-	-	-	-	-	-	-
M5	++	++	+ ^d	+ ^d	++	++	+ ^d	-	-	+ ^d	+ ^d	+ ^d
M6	++	++	+ ^d	+ ^d	-	-	-	-	-	-	-	-
M7	++	++	+ ^d	+ ^d	-	-	-	-	-	-	-	-
M8	++	++	+ ^d	+ ^d	-	-	-	-	-	-	-	-
M9	++	++	+ ^d	+ ^d	++	-	-	-	-	-	-	-

Bc, *B. cereus*; Bs, *B. subtilis*; Ea, *E. aerogenes*; Lm, *L. monocytogenes*; Sa, *S. aureus*; Se, *S. epidermidis*; An, *A. niger*; Aa, *A. Alternata*; Bo, *B. Cinerea*; Cc, *C. cladosporioides*. Pen, *P. expansum*; Rs, *Rhizopus stolonifer*. (+): Baja actividad (Halo de inhibición < 10 mm), (++): Actividad media (Halo de inhibición entre 10 – 20 mm), (+++): Alta actividad (Halo de inhibición > 20 mm), (-): Sin actividad, (+^d): Difuso.

Los resultados de optimización mostraron que *Trichoderma* sp. (Nd-5) mantuvo una actividad antibacteriana moderada y selectiva, principalmente frente a bacterias Gram positivas (*B. cereus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*). Aunque los halos fueron consistentes entre los medios (M1–M9), su intensidad fue menor que la observada en *P. cinnamomea* (Na-78) y *F. tricinctum* (Nd-250), lo que sugiere una producción más específica o en menor concentración de metabolitos activos. Los medios “M1” y “M5” mostraron el mejor rendimiento, generando halos definidos frente a bacterias y, en menor grado, frente a *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *P. expansum* y *R. Stolonifer*. La fermentación fue rápida (2 días) y eficiente, aunque la bioactividad se manifestó mediante halos difusos, posiblemente por baja difusibilidad o estabilidad química de los compuestos (Balouiri et al., 2016). En conjunto, *Trichoderma* sp. (Nd-5) presentó

un perfil bioactivo más acotado, acorde con lo descrito para el género, productor de peptaiboles y gliotoxinas con acción preferencial frente a bacterias sensibles y hongos competidores (Mukherjee et al., 2012; Vinale et al., 2008). Aunque su potencia fue menor que la de *P. cinnamomea* (Na-78), su rápida fermentación y efecto selectivo justifican su inclusión como cepa de interés secundario, siendo “M1” el medio más adecuado para su cultivo.

5.4.2 Optimización de medios cultivo de la cepa *P. cinnamomea* (Na-78)

La Tabla 11 muestra los resultados de la cepa *P. cinnamomea* (Na-78) con su respectiva optimización de medios y el tamaño de los halos de inhibición que se generaron en los ensayos antibacterianos y antifúngicos.

Tabla 11. Relación entre medio de cultivo y diámetro de inhibición en *P. cinnamomea* (Na-78)

Medios	Bc	Bs	Ea	Ec	Ef	Kp	Lm	PSA	Se	Sa	Sa MRSA	Aa	An	Bo	Cc	Pen	Rs
M1	++	++	++	-	-	-	-	-	-	++	-	+	++	++	++	++	+
M2	++	-	++	-	-	++	-	++	-	-	-	+	++	++	++	-	-
M3	++	++	++	++	-	++	-	-	-	-	-	+	-	++	++	-	-
M4	++	++	-	-	-	-	++	++	++	-	-	+	-	-	-	++	++
M5	++	++	++	-	-	-	++	++	++	++	++	+	+++	++	++	++	++
M6	++	++	-	-	-	-	-	++	++	-	-	+	-	-	-	-	-
M7	-	-	-	++	-	-	++	++	++	-	-	+	-	++	-	-	-
M8	+++	+++	-	-	-	-	++	++	++	-	-	+	-	++	++	-	-
M9	++	++	-	++	-	++	-	++	++	-	-	+	-	++	-	-	-

Bc, *B. cereus*; Bs, *B. subtilis*; Ea, *E. aerogenes*; Ec, *Escherichia coli*; Ef, *E. faecalis*; Kp, *K. pneumoniae*; Lm, *Listeria monocytogenes*; PSA, *Pseudomonas syringae*; Sa, *S. aureus*; Sa MRSA, *S. aureus* multirresistente; Se, *S. epidermidis*; An, *A. niger*; Bo, *B. Cinerea*; Cc, *C. cladosporioides*; Pen, *P. expansum*. Rs, *R. stolonifer*. (+): Baja actividad (Halo de inhibición < 10 mm), (++) : Actividad media (Halo de inhibición entre 10 – 20 mm), (+++) : Alta actividad (Halo de inhibición > 20 mm), (-): Sin actividad, (+d): Difuso.

Los resultados de la optimización mostraron que *P. cinnamomea* (Na-78) exhibió una actividad antimicrobiana amplia e intensa en varios de los medios evaluados, particularmente en M1, M2, M3, M5, M8 y M9, lo que confirma su capacidad de producir metabolitos con un espectro de acción relativamente amplio. Entre los medios probados, el “M5” destacó claramente, generando halos bien definidos frente a bacterias Gram positivas (*B. cereus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*) y frente a *S. aureus* MRSA, lo que resalta su potencial frente a patógenos resistentes (Hidalgo, 2023; Ibrahim et al., 2020). En los ensayos antifúngicos, M5 mantuvo el mejor rendimiento, produciendo halos intensos frente a *A. niger* y moderados frente a *B. cinerea* y *P. expansum*. Esto sugiere la presencia de metabolitos estables con acción tanto antibacteriana como antifúngica, concordantes con los compuestos fenólicos o piranocumarínicos previamente descritos para especies del género *Pezicula* (Mousa & Raizada, 2013; Klemke et al., 2009). El tiempo de fermentación reducido (2 días) junto con la potencia y estabilidad de la actividad observada consolidan a M5 como el medio óptimo para la producción de metabolitos bioactivos. En consecuencia, *P. cinnamomea* (Na-78) se posiciona como la cepa más prometedora del estudio, seleccionada para el escalamiento de cultivo y la posterior identificación y caracterización del metabolito responsable de su actividad antimicrobiana.

5.4.3 Optimización de medios cultivo cepa *F. tricinctum* (Nd-250)

La cepa *F. tricinctum* fue elegida como otra de las cuatro cepas para optimización de medio, debido a su considerable actividad antibacteriana y antifúngica, pero

en menor medida en comparación a la cepa *P. cinnamomea* (Na-78). A partir de estos datos, se realizaron los respectivos ensayos contra hongos y bacterias patógenas testeadas anteriormente, solo que ahora cultivado en distintos medios como indica la Tabla 3. La Tabla 12 muestra los resultados de la cepa con su respectiva optimización de medios y el tamaño de los halos de inhibición.

Tabla 12. Relación entre medio de cultivo y diámetro de inhibición en *F. tricinctum* (Nd-250)

Medios	Bc	Ea	Lm	Sa	Sa MRSA	Se	Aa	An	Bo	Cc	Pen	Rhiz
M1	++	-	++	++	++	-	++	-	++	-	++	+
M2	++	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
M3	++	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
M4	++	-	+++	+++	++	-	++	-	++	++	-	-
M5	++	-	++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
M6	++	-	++	++	++	-	-	-	-	++	++	++
M7	++	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
M8	++	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
M9	++	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-

Bc, *Bacillus cereus*; *Bs*, *Bacillus subtilis*; *Ea*, *Enterobacter aerogenes*; *Lm*, *Listeria monocytogenes*; *Sa*, *Staphylococcus aureus*; *Sa MRSA*, *Staphylococcus aureus* multirresistente; *Se*, *Staphylococcus epidermidis*; *Aa*, *Alternaria alternata*; *An*, *Aspergillus niger*; *Bo*, *Botrytis Cinerea*; *Cc*, *Cladosporium cladosporioides*; *Pen*, *Penicillium expansum*; *Rs*, *Rhizopus stolonifer*. (+): Baja actividad (Halo de inhibición < 10 mm), (++) : Actividad media (Halo de inhibición entre 10 – 20 mm), (+++) : Alta actividad (Halo de inhibición > 20 mm), (-):

Los resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, donde *F. tricinctum* (Nd-250) se reconoce como productor de metabolitos secundarios con acción antimicrobiana, aunque de menor potencia y estabilidad que los generados por otros endófitos como *Pezizula* o *Trichoderma* (Desjardins, 2006; Logrieco et al., 2018). Su espectro antibacteriano relativamente amplio podría atribuirse a la síntesis de tricotecenos, enniatinas y fusaricidinas, cuya producción depende

fuertemente del equilibrio carbono/nitrógeno y del medio de cultivo (Pusztahelyi et al., 2015; Masiello et al., 2022). Entre los medios evaluados, “M4” presentó el rendimiento más equilibrado, combinando un tiempo de fermentación corto (2 días) con halos definidos frente a *L. monocytogenes* y *S. aureus*, aunque con una intensidad moderada. En contraste, la cepa *P. cinnamomea* (Na-78) demostró una actividad significativamente más fuerte y estable bajo condiciones similares. Si bien *F. tricinctum* (Nd-250) mantiene un perfil bioactivo de interés, sus resultados fueron menos consistentes y potentes, sin embargo, “M4” se consolida como el medio más adecuado para su cultivo y futuras pruebas de escalamiento.

5.4.4 Optimización de medios cultivo cepa *A. consortialis* (Nd-258)

La cepa *A. consortialis* (Nd-258) fue la última elegida dentro de las cuatro cepas para optimización de medio, debido a su considerable actividad antifúngica, al igual que la cepa *F. tricinctum* (Nd-250). A partir de estos datos se realizaron los respectivos ensayos contra los hongos y bacterias patógenas testeadas anteriormente, solo que ahora cultivado en distintos medios como indica la Tabla 3. La Tabla 13 muestra los resultados de la cepa con su respectiva optimización de medios.

Tabla 13. Relación entre medio de cultivo y diámetro de inhibición en *A. consortialis* (Nd-258)

Medios	Bc	Bs	Ea	Ef	PSA	Sa	Aa	Bo	Cc	Pen	Rs
M1	+ ^d	-	-	-	-	++	-	-	-	++	-
M2	+ ^d	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
M3	+ ^d	-	-	-	-	++	-	-	+++	-	-

M4	+ ^d	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-
M5	+ ^d	+ ^d	+ ^d	-	+ ^d	+++	-	-	-	-	-
M6	+ ^d	+ ^d	+ ^d	-	+ ^d	+++	-	-	-	-	-
M7	+ ^d	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
M8	+ ^d	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
M9	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d	-	-	-	++	-	-

Bc, *Bacillus cereus*; *Bs*, *Bacillus subtilis*; *Ea*, *Enterobacter aerogenes*; *Ef*, *Enterococcus faecalis*; *PSA*, *Pseudomonas syringae*; *Sa*, *Staphylococcus aureus*; *Sa MRSA*, *Staphylococcus aureus multirresistente*; *Aa*, *Alternaria alternata*; *Bo*, *Botrytis Cinerea*; *Cc*, *Cladosporium cladosporioides*, *Pen*, *Penicillium expansum*; *Rs*, *Rhizopus stolonifer*. (+): Baja actividad (Halo de inhibición < 10 mm), (++) : Actividad media (Halo de inhibición entre 10 – 20 mm), (+++) : Alta actividad (Halo de inhibición > 20 mm), (-): Sin actividad, (+^d): Difuso.

Los resultados de optimización mostraron que *A. consortialis* (Nd-258) presentó una actividad antimicrobiana selectiva y dependiente del medio de cultivo, con mejor desempeño en “M5”, “M6” y “M9”. En estos se detectaron halos difusos frente a bacterias Gram positivas (*B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*) y, en menor grado, frente a Gram negativas (*E. aerogenes*, *Salmonella* sp.), lo que sugiere la producción de metabolitos activos en bajas concentraciones o de limitada difusión (Balouiri et al., 2016). En el ensayo antifúngico, los medios “M3”, “M4” y “M9” promovieron inhibición frente a *C. cladosporioides* y *P. expansum*, aunque con intensidad moderada y tiempos de fermentación prolongados.

Si bien todos los cultivos completaron el consumo de glucosa, los tiempos de fermentación extensos en algunos medios (hasta 23 días) reducen su eficiencia productiva. En contraste, el medio “M6” combinó una actividad antibacteriana representativa con un tiempo de cultivo más corto (6 días), lo que lo posiciona como la formulación más eficiente para esta cepa.

En conjunto, *A. consortialis* (Nd-258) mantiene un perfil bioactivo restringido pero específico, con tiempos de producción más prolongados y actividad menos intensa que las cepas más activas. Aunque presenta interés por su capacidad antifúngica puntual, su rendimiento global fue claramente inferior al de *P. cinnamomea* (Na-78), consolidándose esta última como la cepa más eficiente y prometedora para la identificación y caracterización del metabolito responsable.

5.5 Escalamiento de cultivos líquidos y evaluación del efecto de la temperatura

En la Tabla 14 se resumen los resultados del escalamiento de los cultivos líquidos, evidenciando el comportamiento de la actividad antimicrobiana al aumentar el volumen de fermentación y variando las temperaturas.

Tabla 14. Resultados comparativos del escalamiento de cultivos líquidos bajo diferentes condiciones de temperatura para las cepas seleccionadas.

Cepa	Medio elegido	Volumen escalado	T°	Tiempo de fermentación (días)	Observaciones de crecimiento	Actividad antimicrobiana observada	Comentario general
Trichoderma sp. (Nd-5)	M5	2 y 5 L	Ambiente (20 °C)	2	Crecimiento rápido, micelio abundante	Halos difusos frente a <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>L. monocytogenes</i>	Menor potencia antimicrobiana; Producción más eficiente en matraz de 2L
	M5	2 y 5 L	Controlada (25 °C)	2	Crecimiento rápido, micelio abundante	Ligero aumento en halos frente a <i>S. aureus</i> y <i>C. cladosporioides</i>	No hubo incremento significativo de actividad.
P. cinnamomea (Na-78)	M4	2 y 5 L	Ambiente (20 °C)	2	Crecimiento rápido, micelio abundante	Alta actividad frente a <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> MRSA y <i>A. niger</i>	Leve reducción de tamaño de halos respecto a temperatura controlada.

	M4	2 y 5 L	Controlada (25 °C)	2	Crecimiento rápido, micelio abundante	Halos intensos frente a la mayoría de las bacterias y hongos	No hubo incremento significativo de actividad.
F. tricinatum (Nd-250)	M4	2 y 5 L	Ambiente (20 °C)	2	Crecimiento moderado, consumo rápido de glucosa	Halos moderados frente a <i>B. cereus</i> y <i>S. aureus</i>	Actividad estable pero menos intensa que a temperatura controlada
	M4	2 y 5 L	Controlada (25 °C)	2	Crecimiento moderado, consumo rápido de glucosa	Leve aumento en actividad frente a <i>S. aureus</i> MRSA	Aumento leve de actividad; en ambos volúmenes
A. consortialis (Nd-258)	M6	2 y 5 L	Ambiente (20–22 °C)	6	Crecimiento moderado, consumo rápido de glucosa	Actividad débil y difusa frente a <i>B. subtilis</i> y <i>C. cladosporioides</i>	Actividad antimicrobiana más limitada .
	M6	2 y 5L	Controlada (25 °C)	6	Crecimiento moderado, consumo rápido de glucosa	Halos más definidos frente a <i>B. cereus</i> y <i>Cladosporium</i>	Mejora leve en la expresión de metabolitos, pero aún inferior a <i>P. cinnamomea</i> .

El proceso de escalamiento de cultivos líquidos permitió evaluar la consistencia en la producción de metabolitos bioactivos bajo distintas condiciones de temperatura y volumen. En general, los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas entre los volúmenes de 2 y 5 litros, ya que las cepas mantuvieron un crecimiento y una actividad antimicrobiana similares, lo que indica una adecuada estabilidad metabólica en el paso a mayor escala. De igual forma, las diferencias entre las condiciones de temperatura ambiente (20 °C) y controlada (25 °C) fueron

mínimas en la mayoría de los casos, sugiriendo que la producción de metabolitos secundarios fue relativamente constante frente a pequeñas variaciones de temperatura, lo que concuerda con estudios que señalan que leves cambios ambientales no alteran de forma drástica la expresión de rutas biosintéticas reguladas por complejos globales como LaeA/VeA (Brakhage, 2013).

Entre las cepas analizadas, *P. cinnamomea* (Na-78) destacó por presentar una actividad antimicrobiana sostenida y reproducible en ambas condiciones, con halos bien definidos frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos fitopatógenos. Esto evidencia una alta estabilidad y concentración de metabolitos activos, incluso al aumentar el volumen de fermentación, lo que concuerda con observaciones previas de que algunos endófitos del género *Pezizula* mantienen su capacidad biosintética en procesos de escalamiento (Ibrahim et al., 2020). En contraste, *F. tricinctum* (Nd-250) mantuvo una actividad moderada y estable, mientras que *Trichoderma* sp. (Nd-5) y *A. consortialis* (Nd-258) presentaron respuestas más variables, con halos difusos o de menor intensidad, lo que sugiere una menor acumulación o estabilidad de los compuestos bioactivos producidos, comportamiento común en metabolitos de difusión limitada o de baja estabilidad química (Balouiri et al., 2016).

En conjunto, los resultados confirman que el escalamiento en condiciones controladas no afectó negativamente la síntesis de metabolitos antimicrobianos, lo que significa un avance importante para la aplicación biotecnológica de estos

endófitos (Keller, 2019). Sin embargo, la superioridad de *P. cinnamomea* (Na-78) en términos de potencia, estabilidad y reproducibilidad la posiciona como la cepa más prometedora para la purificación e identificación estructural del metabolito activo responsable de la bioactividad observada.

5.6 Análisis de metabolitos secundarios asociados a la actividad antimicrobiana

El hallazgo de actividad antimicrobiana en extractos de hongos endófitos adquiere mayor relevancia cuando se logra vincular dicha bioactividad con la producción de metabolitos secundarios específicos. La identificación y caracterización de metabolitos activos constituye un paso fundamental no solo para validar la actividad observada en los ensayos antibacterianos y antifúngicos, sino también para sentar las bases de futuros procesos de purificación, escalamiento y aplicaciones prácticas (Venugopalan & Srivastava, 2015).

Se abordó el análisis de cuatro cepas endófitas seleccionadas por su alto potencial bioactivo: *Trichoderma* sp. (Nd-5), *P. cinnamomea* (Na-78), *F. tricinctum* (Nd-250) y *A. consortialis* (Nd-258). Mediante ensayos cromatográficos se logró evidenciar la producción de distintos perfiles de metabolitos, algunos de ellos asociados a halos de inhibición detectados en bioautografía, lo que permitió establecer una correlación preliminar entre compuestos secundarios y actividad antimicrobiana. Sin embargo, la profundidad del análisis varió entre los aislados: mientras que en *Trichoderma* sp. (Nd-5), *F. tricinctum* (Nd-250) y *A. consortialis*

(Nd-258) el estudio se limitó a la detección de bandas cromatográficas indicativas de metabolitos activos, calculando el factor de retención (Rf), en *P. cinnamomea* (Na-78) se alcanzó la identificación y caracterización estructural del metabolito responsable de la actividad.

5.6.1 Bioautografía TLC de metabolitos secundarios asociados a la actividad antimicrobiana en la cepa *Trichoderma* sp. (Nd-5)

En el análisis cromatográfico por TLC de la cepa *Trichoderma* sp. (Nd-5), correspondiente al extracto de su medio óptimo "M5", utilizando como fase móvil CHCl₃/MeOH (9:1), se observaron principalmente tres bandas diferenciadas bajo irradiación UV (Véase Figura 9). Dos de ellas, localizadas en la zona basal (Rf bajo) y en la zona media de la placa, mostraron fluorescencia intensa de tonalidades celeste-azul, mientras que una tercera, ubicada en la zona superior (Rf alto), presentó menor intensidad, pero fue igualmente distinguible. La presencia de estas tres manchas sugiere la existencia de al menos tres metabolitos secundarios mayoritarios en el extracto.

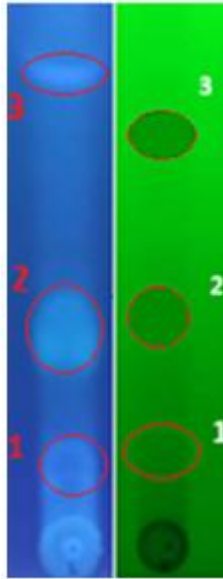


Figura 9. Bioautografía TLC de extractos de *Trichoderma* sp. (Nd-5) en cultivo "M5". Visualización bajo luz UV a 366 nm (izquierda) y 254 nm (derecha).

A 366 nm las fluorescencias fueron más claras y definidas, lo que permitió discriminar los componentes principales; en contraste, a 254 nm las señales fueron difusas y poco intensas, indicando que los metabolitos presentes poseen cromóforos con baja absorción en esa región, o bien se encuentran en menor concentración. El predominio de tonalidades azuladas y celestes es consistente con metabolitos polares (Tabla 15), potencialmente asociados a compuestos de naturaleza peptídica o derivados policétidos característicos del género *Trichoderma* (Vinale et al., 2008).

Tabla 15. Resumen de la detección de metabolitos secundarios para el extracto *Trichoderma* sp. (Nd-5).

Spot	Rf	UV (366 nm)	UV (254 nm)
1	0,15	Azul claro	Verde claro

2	0,55	Azul eléctrico	Verde claro
3	0,74	Azul claro	Verde oscuro

Para determinar cuál de estos compuestos estaba asociado a la bioactividad observada, se realizó una autobiografía en placa mediante la aplicación directa de los fragmentos cromatográficos sobre un cultivo de *B. cereus* (Figura 10). El ensayo evidenció que únicamente la fracción N°2 ($R_f = 0,55$) generó un halo de inhibición definido, lo que indica que este metabolito sería el principal responsable de la actividad antibacteriana detectada en el extracto.

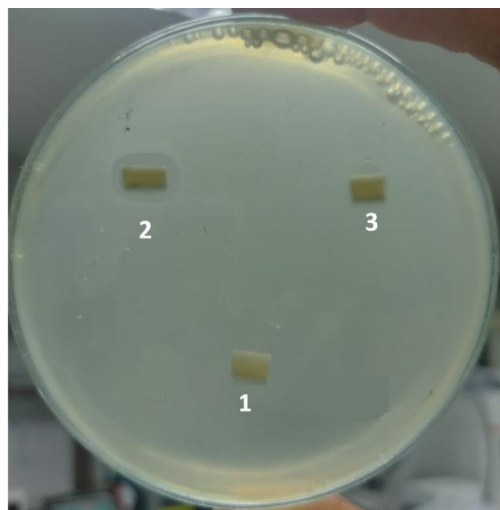


Figura 10. Bioautografía TLC en placa del extracto de cepa *Trichoderma* sp. (Nd-5) frente a *B. cereus*.

Este resultado concuerda con estudios previos que reportan en *Trichoderma* la producción de peptaiboles, gliotoxinas y derivados policétidos con acción frente a bacterias Gram positivas (Mukherjee et al., 2012).

5.6.2 Bioautografía TLC de metabolitos secundarios asociados a la actividad antimicrobiana en la cepa *P. cinnamomea* (Na-78)

El análisis cromatográfico en placa TLC de la cepa *P. cinnamomea* (Na-78), correspondiente al extracto de su medio óptimo M5, utilizando como fase móvil $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5), permitió distinguir al menos 4 fracciones principales (Figura 11), cada una correspondiente a metabolitos secundarios con distinta movilidad relativa (Rf). La visualización bajo 366 nm mostró un patrón complejo de fluorescencias azules y violetas, mientras que bajo 254 nm se observaron manchas oscuras coincidentes en varias posiciones, indicando compuestos aromáticos o fenólicos. Este perfil químico diverso concuerda con la amplia actividad antimicrobiana de esta cepa, sugiriendo que múltiples metabolitos podrían estar actuando en sinergia.

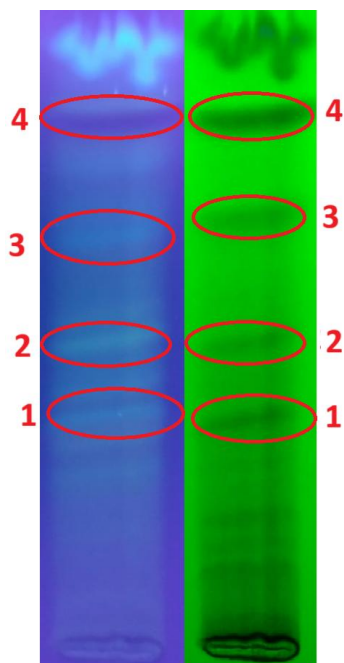


Figura 11. Bioautografía TLC extractos de *P. cinnamomea* (Na-78) en medio "M5". Visualización bajo luz UV a 366 nm (izquierda) y 254 nm (derecha)

La Tabla 16 resume los metabolitos secundarios detectados en el extracto de *P. cinnamomea* (Na-78) mediante cromatografía en capa fina (TLC). Se observaron un total de ocho metabolitos con valores de Rf entre 0,42 y 0,94, lo que refleja una diversidad química considerable en el extracto. Las manchas presentaron fluorescencias principalmente en tonalidades azul oscuro y azul celeste, además de un metabolito de color azul celeste (Rf = 0,74) y otro azul oscuro (Rf = 0,94), lo que sugiere la presencia de compuestos aromáticos conjugados.

Tabla 16. Resumen de la detección de metabolitos secundarios para el extracto *P. cinnamomea* (Na-78).

Spot	Rf	UV (366nm)	UV (254 nm)
1	0,42	Azul claro	Verde grisáceo

2	0,55	Azul celeste	Verde claro
3	0,77	Azul celeste	Verde claro
4	0,94	Azul celeste	Verde oscuro

Con el fin de determinar cuál de las fracciones correspondía al compuesto responsable de la actividad antimicrobiana, se realizó una bioautografía en placa aplicando directamente los segmentos cromatográficos sobre un cultivo de *S. epidermidis* (Figura 12). Entre las cuatro fracciones probadas, únicamente la N° 4 ($R_f = 0,94$) produjo un halo de inhibición claro y definido, evidenciando que este metabolito es el principal responsable de la acción antibacteriana observada en los ensayos previos. Estos resultados coinciden con reportes sobre especies de *Pezicula*, donde se han identificado cumarinas, dehidrofuranoïdes y piranocumarinas con fuerte actividad frente a bacterias Gram positivas (Ibrahim et al., 2020).

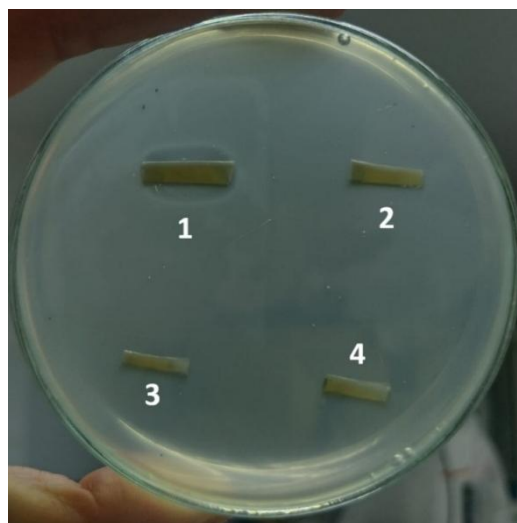


Figura 12. Bioautografía TLC en placa del extracto de cepa *P. cinnamomea* (Na-78) frente a *S. epidermidis*.

5.6.3 Análisis por HPTLC de metabolitos secundarios asociados a la actividad antimicrobiana en la cepa *F. tricinctum* (Nd-250)

Con el propósito de complementar los ensayos antimicrobianos y explorar de forma comparativa el perfil químico de los metabolitos producidos, se realizó un análisis cromatográfico por HPTLC (High-Performance Thin Layer Chromatography) del extracto de *F. tricinctum* (Nd-250), cultivado en su medio óptimo "M4". A diferencia de las cepas *Trichoderma* sp. (Nd-5) y *P. cinnamomea* (Na-78), este análisis se efectuó sin bioautografía directa, utilizándose como una alternativa analítica para caracterizar preliminarmente la composición química del extracto.



Figura 13. Cromatografía HPTLC de extracto de *F. tricinatum* (Nd-250) en medio “M4”. Visualización bajo luz UV a 366 nm (izquierda) y 254 nm (derecha).

La corrida cromatográfica, desarrollada con una fase móvil de tolueno:acetato de etilo (3.15:1.85 v/v), permitió evidenciar cuatro bandas principales bajo irradiación UV (Figura 13). Tres de ellas, localizadas en las zonas basal y media de la placa (Rf 0,15–0,26), presentaron fluorescencias en tonos azul celeste y azul claro, lo que sugiere compuestos de naturaleza moderadamente polar. En contraste, una cuarta fracción (Rf 0,88) mostró una fluorescencia azul-violácea más intensa, indicativa de un metabolito menos polar y de mayor abundancia relativa (Tabla 16).

Tabla 17. Resumen de la detección de metabolitos secundarios para el extracto *F. tricinatum* (Nd-250).

Spot	Rf	UV (366 nm)	UV (254 nm)
1	0,15	Azul celeste	Nd
2	0,21	Azul claro	Nd
3	0,26	Azul claro	Nd
4	0,88	Azul violeta	Nd

Nd: No detectado.

En el análisis cromatográfico del extracto de *F. tricinctum* (Nd-250), como refleja la Tabla 16, se identificaron cuatro metabolitos diferenciables con valores de Rf que van desde 0,15 hasta 0,88. Tres de ellos (metabolitos 1, 2 y 3) se localizaron en la zona basal y media de la placa, presentando tonalidades azul celeste y azul claro, lo que sugiere compuestos de naturaleza relativamente polar y en menor concentración. En contraste, el metabolito 4 se ubicó en la parte superior (Rf 0,88) con una fluorescencia azul violeta, indicando un carácter más apolar y una posible mayor afinidad por fases menos polares. Este patrón cromatográfico sugiere que el extracto de *F. tricinctum* (Nd-250) presenta una mezcla de compuestos de diferente polaridad, aunque dominada por el metabolito basal de fluorescencia intensa, el cual, se podría sugerir, ser el principal candidato para explicar la bioactividad antimicrobiana observada previamente. La predominancia de un metabolito principal en el extracto coincide con reportes para el género *Fusarium*, donde se han identificado tricotecenos, enniatinas y fusaricidinas como metabolitos característicos con actividad frente a bacterias Gram positivas y hongos filamentosos (Perincherry L. et al., 2021); Masiello et al., 2019).

5.6.4 Análisis por HPTLC de metabolitos secundarios asociados a la actividad antimicrobiana en la cepa *A. consortialis* (Nd-258)

El análisis cromatográfico por HPTLC del extracto de *A. consortialis* (Nd-258), obtenido a partir del medio óptimo "M6", permitió visualizar cuatro fracciones principales bajo luz UV a 366 nm (Figura 14).



Figura 14. Cromatografía HPTLC de de extracto de *A. consortialis* (Nd-258) en medio "M6". Visualización bajo luz UV a 366 nm (izquierda) y 254 nm (derecha).

La fluorescencia más intensa se concentró en una banda basal ($R_f = 0,08$), lo que sugiere la presencia de metabolitos polares y abundantes, posiblemente vinculados con la actividad antibacteriana y antifúngica observada en los ensayos previos. En las zonas medias de la placa se identificaron dos compuestos adicionales ($R_f = 0,22$ y $0,35$) con fluorescencias azul grisáceo y café tenue, que indican la presencia de metabolitos secundarios en menor concentración, probablemente derivados policétidos o compuestos aromáticos típicos del género *Alternaria* (Adhishree & Mukesh, 2014). Finalmente, una cuarta banda ($R_f = 0,68$), de color beige y menor intensidad, correspondió a un metabolito minoritario (Tabla 18).

Tabla 18. Resumen de la detección de metabolitos secundarios para el extracto *A. consortialis* (Nd-258).

Spot	Rf	UV (366 nm)	UV (254 nm)
1	0,08	Amarillo verdoso	Nd
2	0,22	Azul grisáceo	Nd
3	0,35	Café tenue	Nd
4	0,68	Beige	Nd

Nd: No detectado.

El perfil cromatográfico del extracto de *A. consortialis* (Nd-258), como muestra la Tabla 18 evidenció cuatro metabolitos secundarios diferenciables. Entre ellos, destacó un compuesto de bajo Rf (0,08) con fluorescencia amarillo verdoso e intensidad marcada, que probablemente sea el principal responsable de la actividad antibacteriana y antifúngica observada. Los metabolitos de Rf intermedios (0,22 y 0,35) se detectaron con menor intensidad, sugiriendo la presencia de compuestos secundarios menos abundantes que podrían contribuir de manera complementaria a la bioactividad. Finalmente, el metabolito de Rf más alto (0,68) apareció como una banda tenue, indicando un componente minoritario. En conjunto, estos resultados muestran que el perfil metabólico de *A. consortialis* (Nd-258) es menos complejo que el de otras cepas como *P. cinnamomea* (Na-78), pero concentra uno o dos metabolitos con mayor protagonismo en la actividad antimicrobiana.

El patrón observado revela un perfil químico menos diverso, pero con metabolitos de mayor intensidad, lo que concuerda con el comportamiento bioactivo selectivo de esta cepa frente a bacterias Gram positivas y hongos fitopatógenos. Este tipo de perfil concentrado ha sido descrito para especies de *Alternaria*, las cuales suelen producir metabolitos como alterporrioles, alternarioles y tenuazónicos con efecto antifúngico o citotóxico (Barkai-Golan & Nachman, 2013).

En conjunto, los resultados sugieren que *A. consortialis* (Nd-258) posee una menor diversidad metabólica que *P. cinnamomea* (Na-78). Dado el predominio del metabolito basal fluorescente, este extracto se considera un candidato interesante para estudios posteriores de purificación e identificación estructural.

Los resultados obtenidos mediante las distintas aproximaciones cromatográficas (TLC y HPTLC) evidencian la heterogeneidad química de los metabolitos secundarios producidos por las cepas endófitas estudiadas. Mientras que *Trichoderma sp.* (Nd-5) y *P. cinnamomea* (Na-78) mostraron perfiles complejos mediante TLC, acompañados de bioautografías que permitieron asociar directamente fracciones específicas con la actividad antimicrobiana, las cepas *F. tricinctum* (Nd-250) y *A. consortialis* (Nd-258) fueron analizadas mediante HPTLC, permitiendo una resolución superior en la separación de compuestos y una visión complementaria del rango de polaridades presentes.

En conjunto, los resultados confirman que la producción de metabolitos bioactivos varía significativamente entre especies y géneros, reflejando la influencia de factores genéticos y ambientales en la expresión metabólica secundaria (Keller, 2019). Entre las cepas evaluadas, *P. cinnamomea* (Na-78) destacó por presentar un perfil químico más diverso y equilibrado, con cuatro metabolitos bien definidos y uno de ellos ($R_f = 0,94$) asociado directamente a la inhibición de *S. epidermidis*. Esta consistencia entre el patrón cromatográfico y la bioactividad respalda su selección como la cepa de mayor potencial biotecnológico para la purificación e identificación estructural del metabolito responsable de la actividad antimicrobiana.

5.6.5 Comparación de perfiles de metabolitos secundarios de *P. cinnamomea* en diferentes medios de cultivo mediante cromatografía HPLC

Con el objetivo de profundizar en la caracterización química de los extractos más promisorios, se analizó el perfil de metabolitos secundarios de *P. cinnamomea* (Na-78) mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Para ello se utilizaron extractos obtenidos de cultivos líquidos en dos condiciones distintas: el medio estándar “MM10” (18 mg/mL) y el medio optimizado “M5” (20 mg/mL). Este análisis permitió comparar la influencia de la composición del medio de cultivo sobre la síntesis y acumulación de metabolitos, estableciendo una correlación entre los perfiles cromatográficos y la actividad antimicrobiana previamente observada.

Los perfiles cromatográficos obtenidos mediante HPLC para *P. cinnamomea* (cepa 78) confirmaron la influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios (Figura 15).

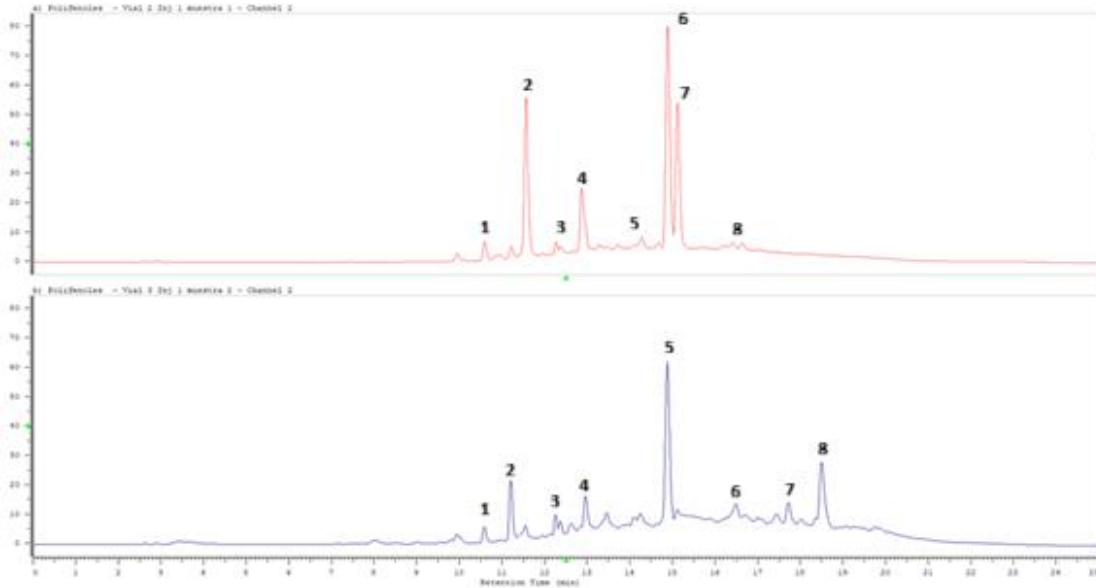


Figura 15. Perfiles cromatográficos por HPLC de metabolitos secundarios de *P. cinnamomea* (Na-78) cultivada en medios “MM10” (arriba) y “M5” (abajo).

Los cromatogramas obtenidos para *P. cinnamomea* (Na-78) evidencian diferencias claras entre los extractos cultivados en el medio estándar “MM10” y el medio optimizado “M5”. En “MM10”, el perfil cromatográfico mostró ocho picos bien definidos entre los 12 y 17 minutos, destacando dos señales mayoritarias de alta intensidad en torno a los 15 minutos. Este comportamiento sugiere la acumulación preferencial de uno o más metabolitos dominantes, acompañados de compuestos secundarios de menor abundancia.

Tabla 19. Principales picos cromatográficos detectados en los extractos de *P. cinnamomea* (Na-78) cultivada en medios “MM10” y “M5”.

Medio de cultivo	Nº de pico	Tiempo de retención (min)	Intensidad relativa (%)
MM10	1	~12,7	10%
	2	~13,3	45%
	3	~13,8	18%
	4	~14,3	25%
	5	~14,7	20%
	6	~15,0	100%
	7	~15,2	60%
	8	~16,0	12%
M5	1	~11,3	8%
	2	~12,0	15%
	3	~12,6	18%
	4	~13,2	20%
	5	~14,9	100%
	6	~17,8	22%
	7	~18,3	35%
	8	~19,0	28%

Por otro lado, el extracto cultivado en “M5” también presentó ocho picos definidos, pero dentro de un cromatograma con mayor heterogeneidad y un nivel más elevado de ruido de base. En este medio solo un pico principal, ubicado cerca de los 15 minutos, alcanzó intensidades comparables a las observadas en “MM10”, mientras que las demás señales se distribuyeron con alturas bajas o moderadas. Este patrón indica que “M5” promueve un perfil químico más disperso, con la síntesis de varios metabolitos en menor proporción relativa y sin la presencia de múltiples compuestos altamente acumulados.

En conjunto, estos resultados muestran que el medio de cultivo influye significativamente en la expresión metabólica de *P. cinnamomea*. Mientras

“MM10” favorece la concentración de metabolitos mayoritarios en niveles elevados, “M5” estimula una producción más diversa, pero con intensidades relativas menores para la mayoría de los compuestos. Estas diferencias cromatográficas son coherentes con la variación observada en la actividad antimicrobiana, reforzando la relevancia del medio de cultivo en la optimización de la biosíntesis de metabolitos secundarios bioactivos.

5.7 Purificación del metabolito bioactivo

A partir del extracto crudo obtenido del cultivo líquido de la cepa seleccionada, se llevó a cabo un proceso de purificación con el objetivo de aislar el metabolito responsable de la actividad antimicrobiana observada en los ensayos preliminares. La separación cromatográfica en columna como fase estacionaria y una fase móvil de Tolueno: Etil acetato (3:2 v/v) (Figura 15), permitió obtener 18 fracciones, las cuales mostraron perfiles diferenciales al ser analizadas mediante TLC. Entre estas, solo un subconjunto presentó señales coincidentes con las bandas asociadas a actividad antibacteriana.



Figura 16. Sistema de separación cromatográfica en columna abierta para purificación de compuesto antibacteriano de *P. cinnamomea*.

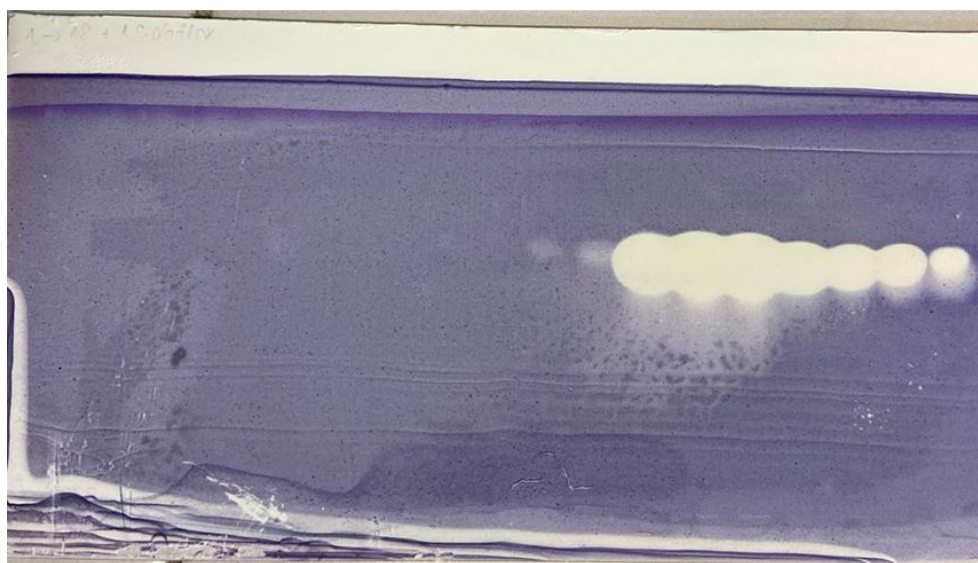


Figura 17. Bioautografía de *B. subtilis* para las 18 fracciones recolectadas de *P. cinnamomea*.

La bioautografía directa (Figura 17) confirmó que únicamente las fracciones correspondientes a la zona media de la elución mostraban inhibición frente a *B. subtilis*, lo que permitió focalizar el proceso de purificación en este grupo específico. Estas fracciones activas exhibieron un patrón cromatográfico similar entre sí, sugiriendo la presencia de un compuesto mayoritario común.

Posteriormente, la purificación por HPLC preparativo permitió concentrar y aislar un único pico dominante, cuya intensidad y pureza relativa fueron superiores a las observadas en el extracto crudo. Este pico fue recolectado y analizado nuevamente por TLC, evidenciando una sola banda definida, sin señales de interferencia provenientes de otros compuestos.

En conjunto, estos resultados confirman que el proceso de fraccionamiento logró concentrar el metabolito activo en un conjunto reducido de fracciones, y que la purificación en HPLC permitió obtener una muestra suficientemente pura para los análisis estructurales posteriores. Esto establece un vínculo directo entre las fracciones bioactivas y el compuesto aislado, justificando la caracterización química presentada en el siguiente apartado.

5.8 Identificación estructural del metabolito secundario de *P. cinnamomea* (Na-78)

El análisis químico del extracto bioactivo obtenido desde el aislado Na-78 permitió identificar el metabolito responsable de la actividad antimicrobiana observada. La caracterización estructural se llevó a cabo mediante UPLC-DAD-

HRMS y espectroscopía RMN (^1H , ^{13}C , DEPT-135, COSY, HSQC y HMBC), lo que permitió establecer de manera precisa su composición molecular. El espectro HRMS mostró un ion molecular correspondiente a la fórmula $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_4$, mientras que los datos de RMN revelaron la presencia de dos carbonilos conjugados, un sistema aromático desfasado y un fragmento alifático con gem-dimetilos, todos ellos característicos de metabolitos policetídicos de tipo piranocumarina.

La comparación detallada de los datos experimentales con la literatura permitió confirmar que el compuesto aislado corresponde a (+)-mycorrhizin A (Figura 18), una piranocumarina descrita originalmente por Trofast y Wickberg (1977) en un hongo micorrícico y, más recientemente, detectada en especies del género *Pezicula*. Sin embargo, a diferencia de estos antecedentes, el presente estudio constituye, hasta donde llega el conocimiento disponible, la primera evidencia de (+)-mycorrhizin A aislada desde un hongo endófito, lo cual amplía de manera significativa el espectro ecológico y metabólico asociado a esta clase de compuestos.

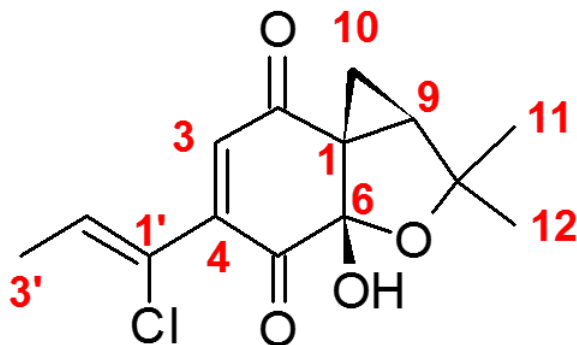


Figura 18. Estructura química de la piranocumarina (+)-Mycorrhizin A identificada como metabolito bioactivo en *P. cinnamomea* (Na-78).

Además, mientras que la literatura describe para (+)-mycorrhizin A principalmente actividades antifúngicas y citotóxicas, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el compuesto presenta también actividad antibacteriana de amplio espectro, particularmente frente a *B. cereus*, *E. aerogenes* y *S. aureus* MRSA. Este hallazgo es especialmente relevante, ya que no existen reportes previos que atribuyan actividad antibacteriana a este metabolito, lo que sugiere que la producción del compuesto en un contexto endofítico podría estar asociada a un repertorio bioactivo más diverso que el descrito históricamente.

La coincidencia entre el perfil espectroscópico, la actividad biológica observada y la estructura tricíclica característica de las piranocumarinas confirma que (+)-mycorrhizin A es el metabolito mayoritario responsable de la actividad antimicrobiana del aislado *P. cinnamomea* (Na-78). En conjunto, estos

resultados posicionan a este hongo endófito como una nueva fuente natural de piranocumarinas bioactivas, con un compuesto cuya actividad antibacteriana no había sido previamente reportada, lo que abre oportunidades para explorar su potencial en aplicaciones de biocontrol y sanidad vegetal.

6. CONCLUSIONES

En este estudio se confirmó la presencia de hongos endófitos asociados a especies chilenas del género *Nothofagus*, específicamente *N. alpina*, *N. dombeyi* y *N. obliqua*. Asimismo, se demostró que estos hongos pueden ser aislados y cultivados bajo condiciones controladas de laboratorio, lo que permitió su evaluación antimicrobiana.

A partir de la recolección de muestras vegetales de tallos y hojas en tres sectores de la Región de Ñuble (Termas de Chillán, Atacalco y San Fabián), se aislaron 37 cepas endófitas, de las cuales el 81,1 % provino de tejido de tallo y el 18,9 % de hojas, lo que sugiere que este tejido constituye un nicho favorable para la colonización endófitas en especies de *Nothofagus*.

La identificación molecular de las 37 cepas aisladas evidenció una alta diversidad taxonómica, con representantes distribuidos en nueve órdenes del reino Fungi. La mayoría de los aislados correspondió al filo Ascomycota, incluyendo órdenes como Hypocreales, Helotiales, Diaporthales, Pleosporales, Eurotiales, Botryosphaeriales, Magnaporthales y Sordariales,

mientras que se identificó además un representante del filo Basidiomycota, perteneciente al orden Polyporales, lo que amplía la diversidad filogenética observada en los hongos endófitos asociados a *Nothofagus*. A nivel de género, *Trichoderma*, *Pezizula*, *Alternaria*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Clonostachys*, *Penicillium* y *Neofusicoccum* fueron los más representativos.

Del total de cepas aisladas, un 42,8 % presentó actividad antibacteriana y un 37,1 % actividad antifúngica, siendo las bacterias Gram positivas las más sensibles a los extractos evaluados. En este contexto, destacaron las cepas *Trichoderma* sp. (5), *P. cinnamomea* (78), *F. lateritium* (250) y *A. consortialis* (258), las cuales exhibieron una actividad antimicrobiana amplia e intensa, posicionándose como las más promisorias del estudio.

La optimización de los medios de cultivo confirmó que la composición nutricional influye directamente en la producción de metabolitos secundarios bioactivos. En particular, los medios "M1" y "M5" favorecieron la actividad de *Trichoderma* sp. (5) y *P. cinnamomea* (78), respectivamente, mientras que el medio "M4" resultó más adecuado para *F. lateritium* (250). Además, los ensayos de escalamiento evidenciaron que la actividad antimicrobiana se conservó al aumentar el volumen de cultivo a 2 y 5 litros, lo que constituye un antecedente favorable para estudios posteriores de mayor escala.

En *P. cinnamomea* (78) se identificó que el compuesto denominado mycorrhizin, una piranocumarina, fue el responsable de la actividad

antimicrobiana observada, evidenciada frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como frente a hongos fitopatógenos, incluyendo especies de *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Listeria*, y hongos como *Alternaria*, *Botrytis* y *Penicillium*. Este hallazgo integra los resultados de aislamiento, evaluación de bioactividad, optimización de cultivo y análisis químico-desarrollados en el presente trabajo, y posiciona a los hongos endófitos asociados a bosques nativos de *Nothofagus* como una fuente relevante de metabolitos secundarios bioactivos con potencial de valorización futura.

Finalmente, el presente estudio evidenció que la bioprospección de hongos endófitos asociados a bosques nativos de *Nothofagus* constituye una estrategia eficiente y precisa para la identificación de metabolitos secundarios bioactivos. De este modo, este enfoque se consolida como una herramienta metodológica clave para valorizar la biodiversidad fúngica nativa y generar conocimiento con proyección biotecnológica, particularmente en el desarrollo de alternativas sostenibles para el control de bacterias y hongos patógenos de interés biotecnológico.

GLOSARIO

Abreviación	Nombre completo
Bc	<i>Bacillus cereus</i>
Bs	<i>B. subtilis</i>
Ea	<i>Enterobacter aerogenes</i>
Ec	<i>Escherichia coli</i>
Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>
Sal	<i>Salmonella enterica</i>
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
Se	<i>S. epidermidis</i>
Sa MRSA	<i>S. aureus resistente a la meticilina</i>
Aa	<i>Alternaria alternata</i>
An	<i>Aspergillus niger</i>
Bo	<i>Botrytis cinerea</i>
Cc	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
Fu	<i>Fusarium sp.</i>
Pe	<i>Penicillium expansum</i>
Rs	<i>Rhizopus stolonifer</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> – Región del ADN ribosomal usada para identificar hongos
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reacción en cadena de la polimerasa
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> – Cromatografía en capa fina
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> – Cromatografía líquida de alta eficiencia
Rf	<i>Retention Factor</i> – Factor de retención (TLC)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> – Medio nutritivo para crecimiento de bacterias
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i> – Medio para cultivo de hongos
UFC	<i>Unidades Formadoras de Colonias</i>
amb	Cepa cultivada a T° ambiente
tem	Cepa cultivada en shaker a 23°C
2L	Cultivo en matraz de 2 litros
5L	Cultivo en matraz de 5 litros

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adhishree Nagda, Mukesh Meena. *Alternaria mycotoxins in food and feed: Occurrence, biosynthesis, toxicity, analytical methods, control and detoxification strategies*. Food Control. Volume 158. 2024 110211, ISSN 0956-7135. Recuperado en [en <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110211>](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110211)
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. (1996). *Introducción a la micología* (4ª ed.). Editorial Reverté.
- Almaraz-Abarca, N., Ávila-Reyes, J. A., Delgado-Alvarado, E. A., Naranjo-Jiménez, N., & Herrera-Corral, J. (2006). *El metabolismo secundario de las plantas: un nuevo concepto*. Instituto Politécnico Nacional. Recuperado en [en <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8292/1/METABOLISMO%20SECUNDARIO-ALMARAZ.pdf>](https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8292/1/METABOLISMO%20SECUNDARIO-ALMARAZ.pdf)
- Alvarado, Britt. (2017). *Actividad antioxidante y citotóxica de 35 plantas medicinales de la Cordillera Negra*. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Mayor Nacional de San Marcos. Lima, Perú. Recuperado en [en <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://docs.bvsalud.org/biblio-ref/2018/02/879811/actividad-antioxidante-y-citotoxica-de-35-plantas-medicinales-d_OE9Ywr3.pdf>](https://docs.bvsalud.org/biblio-ref/2018/02/879811/actividad-antioxidante-y-citotoxica-de-35-plantas-medicinales-d_OE9Ywr3.pdf)

- Aly, A. H., Debbab, A., & Proksch, P. (2011). Fungal endophytes: Unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(6), 1829–1845.

- Agromatica, la web de referencia en Agricultura. ¿Qué productos se utilizan en agricultura ecológica? 2012. Recuperado en <<https://www.agromatica.es/productos-usados-en-agricultura-ecologica/#:~:text=Permanganato%20de%20potasio%3A%20sustancia%20fungicida,fungicida%20usada%20exclusivamente%20en%20frutales.>>

- Andersen, B., Duvold, T., & Smedsgaard, J. (2015). *Fungal secondary metabolites in Alternaria alternata and their importance in plant disease. Fungal Biology Reviews*, 29(4), 175–187.

- Arnold, A. E., & Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88(3), 541–549. Recuperado en <<https://doi.org/10.1890/05-1459>>

- Arnold, A. E., Maynard, Z., Gilbert, G. S., Coley, P. D., & Kursar, T. A. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, 3(4), 267–274. Recuperado en <<https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00159.x>>

- Ávalos-García, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3), 119-145.

- Avnish, K. (2018). *Penicillium species: significance, diversity, and role in biotechnology*. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 6(2), 45–52.

- Avnish Kumar, Monika Asthana, Ankur Gupta, Darshika Nigam, Surabhi Mahajan, Chapter 3 - Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of Penicillium, Editor(s): Vijai Kumar Gupta, Susana Rodriguez-Couto, *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 2018, Pages 47-68, ISBN 9780444635013, Recuperado en <<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00003-X>>

- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. Recuperado en <<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>>

- Barkai-Golan, R., & Nachman, P. (2013). *Alternaria toxins and their effects*. In R. Barkai-Golan (Ed.), *Mycotoxins in fruits and vegetables* (pp. 185–203). Academic Press.

- Brakhage, A. A. (2013). *Regulation of fungal secondary metabolism*. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 21–32. Recuperado en <<https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>>

- Barrales-Cureño, Hebert. 2016. Generalidades del fármaco Taxol: una revisión sistematizada. División de Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica del Valle de Toluca. México. Recuperado en <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol16_num1/articulos/generalidades.pdf>
- Barrantes Jiménez, K., Chacón Jiménez, L. y Arias Andrés, M. (2022) El impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo sostenible. Población y Salud en Mesoamérica, 19(2). Doi: 10.15517/psm.v0i19.47590
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., & Parr-Dobrzanski, B. (2002). *The strobilurin fungicides*. Pest Management Science, 58(7), 649–662. Recuperado en <https://doi.org/10.1002/ps.520>
- Bilbao, N. 2018. Estado actual de las resistencias de *Candida* a los fármacos antifúngicos y estudio de los mecanismos implicados. Facultad de Medicina y Enfermería. Universidad Politécnica de Valencia. España. Recuperado en <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/30830/TFG_Bilbao_Bilbao_Rev.pdf;jsessionid=F24F7AFBE52456426AD8070A17B864B0?sequence=4>
- Bills, G. F., Platas, G., Fillola, A., Jiménez, M. R., Collado, J., Vicente, F., Martín, J., González, A., Bur-Zimmermann, J., Tormo, J. R., Peláez, F. (2012).

Pezizula species are a source of bioactive secondary metabolites. Mycologia, 104(2), 461–472.

- Burgess, T. I., Barber, P. A., & Hardy, G. E. S. J. (2006). Botryosphaeria species from Eucalyptus in Australia. *Fungal Diversity, 25*, 45–66.

- Camacho Silvas LA. 2023. Resistencia bacteriana, una crisis actual [Bacterial resistance, a current crisis.]. *Rev Esp Salud Publica. 2023 Feb 20;97: e202302013.* Spanish. PMID: 36815211; PMCID: PMC10541255.

- CDC, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. 2019. Candida auris: Un microbio resistente a los fármacos que se propaga en los establecimientos de atención médica. División de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos, el Agua y el Medioambiente, Estados Unidos. Recuperado en <<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/es/c-auris-drug-resistant.html>>

- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. 2020. Prescripción y uso de Antibióticos. Departamento de Salud y Servicios Humanos. Estados Unidos. Recuperado en <<https://www.cdc.gov/antibiotic-use/sp/antibiotic-resistance.html>>

- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R. O., Degenkolb, T., & Samuels, G. J. (2015). *Systematics of the Trichoderma harzianum species*

complex and re-identification of commercial biocontrol strains. Mycologia, 107(3), 558–590.

- Clay, K., & Schardl, C. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, 160(S4), S99–S127. Recuperado en <<https://doi.org/10.1086/342161>>
- CLSI. (2018). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically* (11th ed.). CLSI standard M07.
- Crous, P. W., Wingfield, M. J., Burgess, T. I., Hardy, G. E. S., & Barber, P. A. (2021). *Fungal Planet description sheets: 1272–1381. Persoonia, 47, 178–374.*
- Del Olmo-Ruiz, M., & Arnold, A. E. (2014). Community structure of endophytic fungi in leaves of *Pinus ponderosa*. *Fungal Ecology*, 8, 1–11.
- Demir, O., et al. (2023). *Bioactive coumarins from endophytic Pezizula species.*
- Desjardins, A. E. (2006). *Fusarium mycotoxins: Chemistry, genetics, and biology.* The American Phytopathological Society Press.

- Donoso, C. (1993). *Bosques templados de Chile y Argentina: variación, estructura y dinámica*. Editorial Universitaria.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. *Focus*, 12, 13–15.
- Dutta, S., Egar, A. S., & Zubair, F. (2022). Biological control of plant pathogens: major strategies and techniques. *Frontiers in Microbiology*, 13, 8879208. Recuperado en <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.8879208>>
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., & Kubicek, C. P. (2012). *Trichoderma: The genomics of opportunistic success*. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 749–759.
- Ebisa Mirete Deresa, Tamiru Fayisa Diriba. *Phytochemicals as alternative fungicides for controlling plant diseases: A comprehensive review of their efficacy, commercial representatives, advantages, challenges for adoption, and possible solutions*. *Heliyon*. Volume 9. Issue 3. 2023. e13810. ISSN 2405-8440, Recuperado en <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844023010174>>
- EUCAST. (2024). *EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing – Version 13.0*.

- Eurostat. (2020). *Sales of pesticides by type of pesticide*. Statistical Office of the European Union. Recuperado en <https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Pesticide_sales_statistics>

- Espectrometría. 2021. *Espectrometría; mecanismo, tipos y usos*. México. Recuperado en <<https://espectrometria.com.mx/espectrometria-mecanismo-tipos-y-usos/>>

- FAO. ONU. FAOSTAT. 2023. Recuperado en <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>>

- Fardella, C., Oses, R., Torres-Díaz, C., y Molina-Montenegro, M. A. 2014. Hongos endófitos antárticos como herramienta para la reintroducción de especies nativas en zonas áridas. *Bosque (Valdivia)*, 35(2), 235-239. Recuperado en <https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-92002014000200011&lng=en&nrm=iso&tlng=en>

- Fernández Rodríguez, A. (2020). *Resistencia antimicrobiana y medioambiente: una amenaza silenciosa*. Revista Española de Salud Pública, 94(e202010129). Recuperado en <https://www.mscbs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/resp/revista_cdrom/VOL94/REVISIONES/RS94C_202010129.pdf>

- Freimoser, F.M., Rueda-Mejia, M.P., Tilocca, B. *et al.* Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World J Microbiol Biotechnol* 35, 154 (2019). Recuperado en <<https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>>

- Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology*, 49, 1–173.

- Gao, Y., Zhao, J., Zu, Y., Fu, Y., & Wu, N. (2017). Antimicrobial activity of fungal endophytes from *Pinus tabulaeformis* Carr. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 5.

- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). *ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts.* *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118. Recuperado en <<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>>

- Geiser, D. M., Al-Hatmi, A. M. S., Aoki, T., Crous, P. W., de Hoog, G. S., O'Donnell, K., ... & Samson, R. A. (2021). *Phytopathogenic fungi: Fusarium species and their teleomorphs.* *Studies in Mycology*, 98, 1–52.

- Godeas, A., Scervino, J. M., & Colombo, R. (2013). Occurrence of dark septate endophytes in *Nothofagus* seedlings from Patagonia, Argentina. *Mycosphere*, 4(5), 1081–1089.

- Gómez BL, Escandón P. Fungal infections: A growing threat. *Biomedica*. 2023 Aug 31;43(Sp. 1):11-16. English, Spanish. doi: 10.7705/biomedica.7214. PMID: 37721896; PMCID: PMC10581601

- González-Teuber, M. (2016). *The defensive role of foliar endophytic fungi for a South American tree*. *AoB Plants*, 8, plw050. Recuperada en <<https://doi.org/10.1093/aobpla/plw050>>

- González-Teuber, M. (2019). Leaf resistance traits influence endophytic fungi colonization and community composition in a South American temperate rainforest. *74*(2), 1–14. Recuperado en <<https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1365-2745.13314>>

- Gunatilaka AA. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J Nat Prod*. 2006 Mar;69(3):509-26. doi: 10.1021/np058128n. PMID: 16562864; PMCID: PMC3362121.

- Hashimoto, T., Tanaka, M., & Asakawa, Y. (2015). *Secondary metabolites from endophytic fungi: structures and bioactivities*. *Natural Product Reports*, 32(9), 1317–1338.

- Hall, B. G. (2013). *Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA*. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1229–1235. Recuperado en <<https://doi.org/10.1093/molbev/mst012>>

- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43–56.

- Harris, D. C. (2015). *Quantitative chemical analysis* (9th ed.). W. H. Freeman and Company.

- Hormazábal, E., & Piontelli, E. (2009). *Endophytic fungi from Chilean native gymnosperms: Antimicrobial activity against human and phytopathogenic fungi*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 813–819. Recuperado en <<https://doi.org/10.1007/s11274-014-1686-0>>

- Hidalgo, J. (2023). *Identificación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana en el extracto de P. cinnamomea obtenido de Nothofagus dombeyi* [Tesis de pregrado, Universidad de Concepción]. Facultad de Ingeniería Química, Universidad de Concepción.

- Ibrahim, S. R. M., Mohamed, G. A., & Ross, S. A. (2020). *Endophytic fungi: An endless source of bioactive secondary metabolites*. *Biochemical*

Pharmacology, 173, 113737. Recuperado en
<<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113737>>

- Jaklitsch, W. M. (2009). *European species of Hypocrea. Part I: The green-spored species. Studies in Mycology*, 63, 1–91.
- Jaklitsch, W. M., & Voglmayr, H. (2015). *Biodiversity of Trichoderma (Hypocreales) in Southern Europe and Macaronesia with descriptions of nine species. Studies in Mycology*, 80, 1–87.
- Kendrick, B. (2001). *The fifth kingdom* (3rd ed.). Hackett Publishing Company.
- Klemke, C., Kehraus, S., Wright, A. D., & König, G. M. (2009). *New secondary metabolites from the fungal endophyte Pezicula sp. Journal of Natural Products*, 72(6), 965–970. Recuperado en
<<https://doi.org/10.1021/np800763x>>
- Kulik, T., Treder, K., Załuski, D., Łojko, M., & Buśko, M. (2017). *Diversity of the Fusarium tricinctum species complex and related species revealed by multilocus phylogenetic analysis. Fungal Biology*, 121(10), 858–872.
- Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chemical Biology*, 19(7), 792–798.

- Lancet, 2022. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Feb 12; 399(10325):629-655. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0. Epub 2022 Jan 19. Erratum in: Lancet. 2022 Oct. 1;400(10358):1102. PMID: 35065702; PMCID: PMC8841637.

- Lawrence, D. P., Rotondo, F., & Gannibal, P. B. (2013). *Biodiversity and taxonomy of the genus Alternaria*. *Mycological Progress*, 12(1), 1–18.

- Logrieco, A. F., Moretti, A., & Ritieni, A. (2018). *Biotechnological approaches for the reduction of mycotoxins in food and feed*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–10. Recuperado en <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01983>>

- Li, X. Z., & Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 69(12), 1555–1623.

- Masiello M, Somma S, Ghionna V, Logrieco AF, Moretti A. In Vitro and in Field Response of Different Fungicides against *Aspergillus flavus* and *Fusarium* Species Causing Ear Rot Disease of Maize. *Toxins* (Basel). 2019 Jan 1;11(1):11. doi: 10.3390/toxins11010011. PMID: 30609646; PMCID: PMC6357132.

- Mendoza, Mireya. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 15-

23. Recuperado en

<http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000100004&lng=es&tlng=es>

- Morales García, D. 2014. Bioprospección de hongos endófitos para el control biológico del nematodo barrenador *radopholus similis* (cobb) thorn en el cultivo del banano. Repositorio Tecnológico de Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Recuperado en <<https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/5797>>
- Mousa, W. K., & Raizada, M. N. (2013). *The diversity of antifungal compounds produced by endophytic fungi*. *Natural Product Communications*, 8(4), 539–545.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2012). *Trichoderma research in the genome era*. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 105–129. Recuperado en <<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172912>>
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656.
- O'Donnell, K., Rooney, A. P., Proctor, R. H., Brown, D. W., McCormick, S. P., Ward, T. J., & Geiser, D. M. (2013). *Phylogenetic analyses of Fusarium species and their teleomorphs*. *Studies in Mycology*, 76, 123–156.

- Omega Bio-tek, Inc. 2024. Mag-Bind® Blood & Tissue DNA HDQ 96 Kit
Recuperado en < <https://omegabiotek.com/product/tissue-and-blood-kit-genomic-dna-isolation-mag-bind-hdq-96/?cn-reloaded=1>>

- Oses, R., Valenzuela, S., Freer, J., Rodríguez, J., & Zamorano, A. (2008). Fungal endophytes in xylem of healthy *Chilean* trees and their possible role in early wood biodegradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 1213–1217. Recuperado en < <https://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/33-4.pdf>>

- Papagianni, M. (2004). *Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes*. *Biotechnology Advances*, 22(3), 189–259. Recuperado en <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.005>>

- Perincherry L, Witaszak N, Urbaniak M, Waśkiewicz A, Stępień Ł. Effects of Secondary Metabolites from Pea on *Fusarium* Growth and Mycotoxin Biosynthesis. *J Fungi (Basel)*. 2021 Nov 24;7(12):1004. doi: 10.3390/jof7121004. PMID: 34946987; PMCID: PMC8706721.

- Petigrosso, L.R; et. al. (2019). *Hongos endófitos en festuca alta: del problema a las soluciones*. Universidad de Mar del Plata, Argentina. Recuperado en <<https://www.redalyc.org/journal/864/86460707015/html/>>

- Petrini, O. (1991). Fungal Endophytes of Tree Leaves. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience, 179-197. Recuperado en <https://doi.org/10.1007/978-14612-3168-4_9>

- Porrás-Alfaro, A., & Bayman, P. (2011). Hidden fungi, emergent properties: Endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 291–315.

- Programa para el medioambiente. Efectos de plaguicidas y fertilizantes sobre el medio ambiente y la salud y formas de reducirlos. Resumen para encargados de la formulación de políticas. 2022. Organización de las Naciones Unidas. Recuperado en <https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/34463/JSUNEPPF_Sp.pdf>

- Pusztahelyi, T., Holb, I. J., & Pócsi, I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*, 6, 573. Recuperado en <<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00573>>

- Qingmiao, Z., W. Xiying and W. Jiawen, 2012. Phillyrin produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus isolated from *Forsythia suspensa*. *Fitoterapia* 83: 1500-1505.

- Raimilla, V., González, T. E., Rodríguez, J. A., & Rubilar, R. (2013). *Hongos endófitos en Chile: diversidad y potencial uso en sistemas agroforestales*. *Bosque*, 34(2), 165–175. Recuperado en <<https://doi.org/10.4067/S0717-92002013000200009>>

- Ramos, Katia. (2017). *Metabolitos secundarios de las plantas: Una alternativa para el manejo de enfermedades en cultivos de interés económico*. Editorial Académica Española. 76 páginas. Madrid, España.

- Revie, N. M., Iyer, K. R., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2018). *Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact*. *Current Opinion in Microbiology*, 45, 70–76. Recuperado en <<https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.005>>

- Roberti, R. (2006). Biocontrol of plant pathogens by *Clonostachys rosea*. *Plant Pathology Journal*, 5(3), 317–325.

- Roberti, Roberta & Badiali, F. & Pisi, Annamaria & Veronesi, A. & Pancaldi, D. & Cesari, A.. (2006). Sensitivity of *Clonostachys rosea* and *Trichoderma* spp. as Potential Biocontrol Agents to Pesticides. *Journal of Phytopathology*. 154. 100 - 109. 10.1111/j.1439-0434.2006.01069.x.

- Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314–330. Recuperado en <<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>>

- Romero, E. J., & Dibbern, H. A. (1985). Evolution of the genus *Nothofagus*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 72(3), 458–478. Recuperado en <<https://doi.org/10.2307/2399225>>

- Romero-Benavides, J. C., Ruano, A. L., Silva-Rivas, R., Guerrero-Dalgo, A., & Tinitana-Imaicela, F. (2017). Identificación de metabolitos secundarios y evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de *Callitaloon speciosus* (escobillón rojo). *Revista Venezolana de Ciencias Farmacéuticas*, 36(1), 1-10.

- Ruano-Rosa, D., López-Herrera, C., & Gómez-Vázquez, A. (2016). Biocontrol potential of *Alternaria arborescens* against soilborne plant pathogens. *Biological Control*, 95, 1–10.

- Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., & Sullivan, T. J. (1998). Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 319–343.

- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sánchez-Fernández, R. E., Díaz, D., Lappe-Oliveras, P., & Guzmán-de-Peña, D. (2013). Endophytic fungi: a source of bioactive metabolites with

biotechnological potential. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(2), 91–100. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70011-9](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70011-9)

- Sanchís, M. 2016. Evaluación experimental de terapias antifúngicas frente a hongos oportunistas emergentes. Tesis, Doctor. Universitat Rovira i Virgili, Departmen de Ciències Mèdiques Bàsiques. Catalunya, España.
- Secugen S.L. 2012. Identificación Microbiana mediante secuenciación de ADN. Madrid, España. Recuperado en <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfefindmkaj/https://www.secugen.es/es/pdf/identificacion_microbiana.pdf>
- Schmeda-Hirschmann, G., & Hormazábal, E. (2005). *Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm Prumnopitys andina (Lleuque)*. *Phytochemistry Reviews*, 16(5), 1041–1059.
- Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras-Villaseñor, N., Mendoza-Mendoza, A., Tisch, D., Aleman, M. I., & Herrera-Estrella, A. (2016). *The genomes of three uneven siblings: Footprints of the lifestyles of three Trichoderma species*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 205–327.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A. K., & Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: A source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106(9), 996–1004.

- Schulz, B., Wanke, U., Draeger, S., & Aust, H. J. (1993). Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*, 97(12), 1447–1450. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80215-3](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80215-3)
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2011). *Introduction to Modern Liquid Chromatography* (3rd ed.). John Wiley & Sons.
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491–502. Recuperado en <<https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003>>
- Strobel, G. A. (2018). The emergence of endophytic microbes and their biological promise. *Journal of Fungi*, 4(2), 57.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67(2), 257–268.
- Tanney, J. B., & Seifert, K. A. (2020). *Pezicula and related genera in the Helotiales: Taxonomy, phylogeny, and ecology*. *Studies in Mycology*, 95, 1–69.

- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2018). *Microbiología* (11.^a ed.). Pearson Educación.

- Trofast, J., & Wickberg, B. (1977). *Mycorrhizin A and Chloromycorrhizin A: Two antibiotics from a mycorrhizal fungus*. *Tetrahedron*, 33(24), 3277–3283.

- Udayanga, D., Liu, X., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2011). Multilocus phylogeny reveals that *Diaporthe* species associated with *Mangifera indica* represent host generalists. *Fungal Diversity*, 49(1), 193–208.

- Urcelay, C., Longo, S., Geml, J., Tecco, P. A., & Nouhra, E. R. (2011). Occurrence of dark septate endophytes in *Nothofagus* seedlings from Patagonia, Argentina. *Mycorrhiza*, 21(5), 529–536. Recuperado en <<https://doi.org/10.1007/s00572-011-0362-4>>

- U'Ren JM, Lutzoni F, Miadlikowska J, Laetsch AD, Arnold AE. Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. *Am J Bot*. 2012 May;99(5):898-914. doi: 10.3732/ajb.1100459. Epub 2012 Apr 26. PMID: 22539507.

- Vaca, G., Quispillo, J., Tubón, I., & Viteri, J. (2020). Identificación de metabolitos secundarios y evaluación de la actividad antimicrobiana del

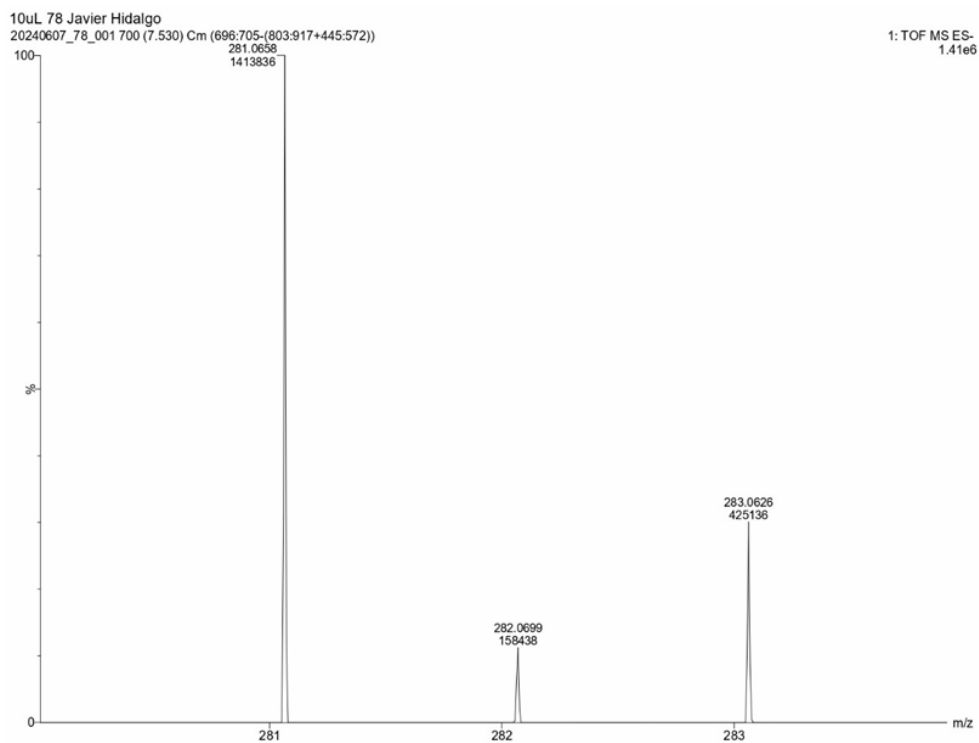
extracto etanólico de *Callitaloon speciosus* (escobillón rojo). Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica, 39(2), 165-172.

- Veblen, T. T., Hill, R. S., & Read, J. (1996). *The Ecology and Biogeography of Nothofagus Forests*. Yale University Press.
- Velásquez, E., & Piontelli, E. (2005). Endophytic fungi associated with *Prumnopitys andina* and their bioactive secondary metabolites. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 50(2), 157–166.
- Venugopalan, A., & Srivastava, S. (2015). Endophytes: Potential storehouse of bioactive secondary metabolites. *Biotechnology*, 14(4), 195–204. Recuperado en <<https://doi.org/10.3923/biotech.2015.195.204>>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma–plant–pathogen interactions*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1–10. Recuperado en <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>>
- Vohník, M., Kolaříková, Z., & Fehrer, J. (2013). The endophytic fungal community of *Nothofagus antarctica* roots in southern Patagonia. *Fungal Ecology*, 6(6), 527–538.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In M. A. Innis,

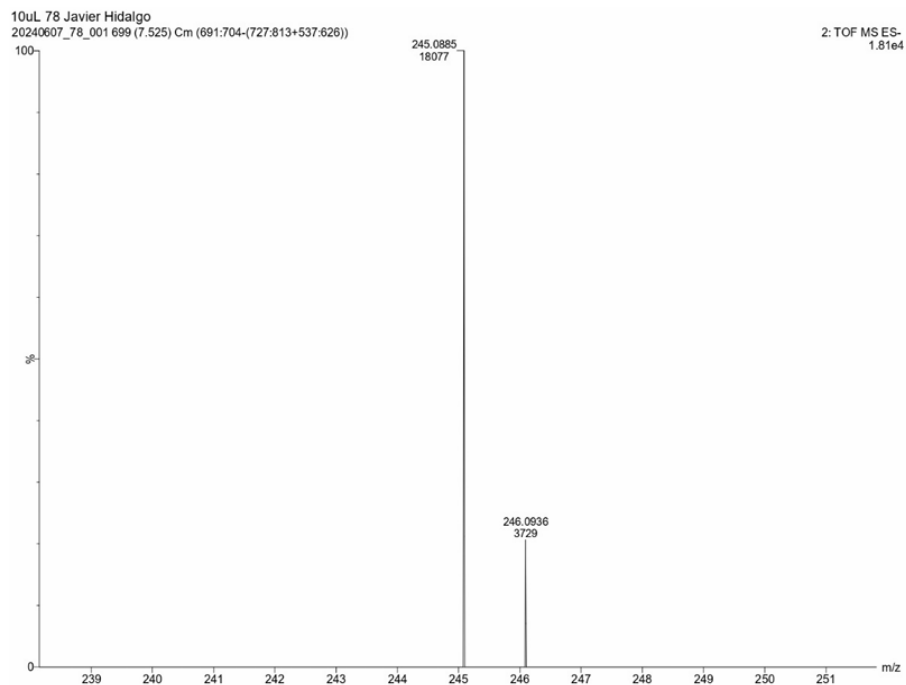
D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (pp. 315–322). Academic Press.

- World Health Organization (WHO). (2014). *Antimicrobial resistance: Global report on surveillance 2014*. World Health Organization. Recuperado en <<https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748>>
- Yang, L., Wen, K.S., Ruan, X., Zhao, Y.X, Wei, F., Wang, Q. (2018). Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors.
- Zhang, H. W., Song, Y. C., & Tan, R. X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, 23(5), 753–771. Recuperado en <<https://doi.org/10.1039/b609472b>>
- Zhao, J., Li, C., Wang, W., & Zhang, C. (2018). Mechanisms of antifungal action of bioactive compounds from endophytic fungi. *Frontiers in Microbiology*, 9, 560.

8. ANEXOS



Anexo 1. Cluster de peaks con mayor porcentaje de abundancia presente en el espectro de masas del compuesto antibacteriano aislado de *P. cinnamomea* (Na-78).



Anexo 2. Cluster de peaks de ion molecular de compuesto antibacteriano aislado de *P. cinnamomea* (Na-78).

C	δ H (multiplicidad)	δ C	Integración	J (Hz)	HMBC (H \rightarrow C)
1	1,59;1,92 (ddd;m)	15,00	2	8,3; 4,8; 1,2	C-6, C-7, C- 8, C-13
2	2,03 (d)	16,62	3	6,9	C-6, C9, C- 11, C-12
3	1,35 (s)	25,13	3		C-4, C-6, C-7
4	1,25 (s)	29,22	3		C-3, C-6, C-7
5		43,24			
6	2,24 (m)	44,91	1		C-7
7		82,97			
8		101,22			
9		127,36			
10	7,12 (s)	136,04	1		C-5, C-9, C- 13
11	7,01 (q)	137,46	1	6,9	C-9, C-12
12		144,79			
13		192,25			
14		192,48			

Anexo 3. Datos RMN de compuesto aislado de cepa *P. cinnamomea* (Na-78).