

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRÍCOLA



Hongos endófitos aislados de *Nothofagus dombeyi* y *Nothofagus oblicua* recolectados en la Cordillera de Los Andes y Valle Central, Región de Ñuble: distribución de especies y producción de extractos activos contra bacterias y hongos patógenos.

CARLA IVETTE LEIVA REYES

HABILITACIÓN PROFESIONAL
PRESENTADA A LA FACULTAD
DE INGENIERÍA AGRÍCOLA DE
LA UNIVERSIDAD DE
CONCEPCIÓN, PARA OPTAR
AL TÍTULO DE
INGENIERA AGROINDUSTRIAL

**CHILLÁN – CHILE
2024**

Hongos endófitos aislados de *Nothofagus dombeyi* y *Nothofagus oblicua* recolectados en la Cordillera de Los Andes y Valle Central, Región de Ñuble: distribución de especies y producción de extractos activos contra bacterias y hongos patógenos.

Aprobado por:

Pedro Miguel Aqueveque Muñoz
Profesor de Biología, Dr.
Profesor Asociado

Profesor Guía

Natalia Valderrama Valdés
Ingeniero Civil en Industrias F., Mg.
Profesor Asociado

Profesor Asesor

Luis Antonio Seminario Salas
Ingeniero en Industrias Alimentarias, Mg. Sc.
Profesor Asistente

Profesor Asesor

Juan Antonio Cañumir Veas
Ingeniero Agrónomo, Ph. D.
Profesor Asociado

Director de departamento

María Eugenia González Rodríguez
Ingeniero Agrónomo, Ph. D.
Profesor Asociado

Decana

Agradecimientos

Primero que todo, debo agradecer a mi familia por su inquebrantable apoyo durante este proceso.

Quiero expresar mi gratitud al proyecto Fondecyt N°1200485 por el respaldo financiero proporcionado.

Agradecer enormemente al profesor Pedro, un excelente profesor guía, siempre preocupado y ayudándome en cada momento para resolver mis dudas.

Gracias a Héctor, que siempre se tomaba el tiempo para instruirme detalladamente en cada proceso que debía llevar a cabo en el laboratorio.

Agradezco a todas las personas que hicieron parte de este proceso en mi formación como Ingeniera Agroindustrial, sin ustedes no hubiese sido lo mismo.

ÍNDICE DE MATERIAS

1 INTRODUCCIÓN	4
1.1 Hongos endófitos	5
1.2 Metabolitos secundarios	5
1.3 Árboles en estudio	6
1.3.1 Roble (<i>Nothofagus oblicua</i>).....	6
1.3.2 Coihüe (<i>Nothofagus dombeyi</i>).....	7
2 HIPÓTESIS	8
3 OBJETIVO	8
3.1 Objetivo general:	8
3.2 Objetivos específicos:.....	8
4 MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1 Recolección y aislamiento de muestras.....	9
4.2 Purificación de los hongos endófitos	10
4.3 Caracterización macro y microscópica	10
4.4 Obtención de extractos	11
4.5 Evaluación actividad biológica	12
4.5.1 Preparación organismos-test	12
4.5.2 Actividad antibacteriana y antifúngica	13
4.6 Comparación entre poblaciones de hongos aislados	13

4.7	Evaluación actividad antifúngica <i>in vivo</i>	14
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
5.1	Recolección e identificación de material biológico	15
5.2	Aislamiento de hongos endófitos	15
5.3	Evaluación de la actividad antifúngica y antibacteriana.	16
5.4	Comparación de la distribución de especies y propiedades antimicrobiana de los hongos aislados.	20
5.5	Caracterización macro y microscópica	22
5.6	Evaluación actividad antifúngica <i>in vivo</i>	26
6	CONCLUSIONES	30
7	BIBLIOGRAFÍA.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Hongos endófitos aislados desde <i>N. oblicua</i> y <i>N. dombeyi</i>	15
Tabla 2.	Codificación de hongos endófitos aislados de <i>N. oblicua</i> y <i>N. dombeyi</i>	16
Tabla 3.	Actividad antifúngica de los extractos de acetato de etilo provenientes de <i>N. oblicua</i> , San Fabián.....	17
Tabla 4.	Actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo provenientes de <i>N. oblicua</i> , San Fabián.....	18
Tabla 5.	Actividad antifúngica de los extractos de acetato de etilo provenientes de <i>N. dombeyi</i> , Concepción.....	19
Tabla 6.	Actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo provenientes de <i>N. dombeyi</i> , Concepción.....	20
Tabla 7.	Caracterización macroscópica de hongos endófitos aislados de árboles <i>N. oblicua</i> y <i>N. dombeyi</i>	23
Tabla 8.	Caracterización microscópica de hongos endófitos aislados de árboles <i>N. oblicua</i> y <i>N. dombeyi</i>	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Total de extractos activos en las pruebas antibacterianas.....	20
Figura 2.	Total de extractos activos en las pruebas antifúngicas.....	21
Figura 3.	A) Hongo endófito 22NoSFT7; B) Hifas del hongo 22NoSFT7.....	24
Figura 4.	A) Hongo endófito 22NoSFT17; B) Hifas del hongo 22NoSFT17.....	24
Figura 5.	A) Hongo endófito 22NdCONT4; B) Hifas del hongo 22NdCONT4.....	24
Figura 6.	A) Hongo endófito 22NdCONT6; B) Hifas del hongo 22NdCONT6.....	25
Figura 7.	A) Hongo endófito 22NdCONT7; B) Hifas del hongo 22NdCONT7.....	25
Figura 8.	Medidas de crecimiento del hongo vs periodo de evaluación.....	26
Figura 9.	A) Manzanas desinfectadas, agrupadas y rotuladas antes de la evaluación in vivo; B) Manzanas preparadas luego de los tratamientos realizados a cada grupo.....	28
Figura 10.	A) Manzanas control día 1, inoculadas con el hongo <i>A. niger</i> ; B) Manzanas inoculadas con <i>A. niger</i> + 22NdCONT6; C) Manzanas inoculadas con <i>A. niger</i> + Rovral 50%.....	28
Figura 11.	A) Manzanas control día 5, inoculadas con el hongo <i>A. niger</i> ; B) Manzanas inoculadas con <i>A. niger</i> +	29

	22NdCONT6; C) Manzanas inoculadas con <i>A. niger</i> + Rovral 50%.....	
Figura 12.	A) Manzanas control día 5 y último inoculadas con el hongo <i>A. niger</i> ; B) Manzanas inoculadas con <i>A. niger</i> + extracto 22NdCONT6; C) Manzanas inoculadas con <i>A. niger</i> + Rovral 50%.....	29

Hongos endófitos aislados de *Nothofagus dombeyi* y *Nothofagus oblicua* recolectados en la Cordillera de Los Andes y Valle Central, Región de Ñuble: distribución de especies y producción de extractos activos contra bacterias y hongos patógenos.

Endophytic fungi isolated from *Nothofagus dombeyi* and *Nothofagus oblicua* collected in the Andes Mountains and Central Valley, Ñuble Region: species distribution and production of active extracts against bacteria and pathogenic fungi.

Palabras claves: Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana, extractos naturales.

Resumen

Los hongos endófitos, que residen en las plantas sin causar daño, producen metabolitos secundarios con múltiples funciones. Estos compuestos no solo protegen a las plantas de enfermedades y predadores, sino que también tienen aplicaciones en agricultura, siendo alternativas naturales a los fungicidas. Este estudio se centró en examinar las propiedades antimicrobianas de extractos naturales obtenidos de dos especies de árboles del género *Nothofagus* en la Región de Ñuble. Se aislaron 27 cepas de hongos, de las cuales 12 mostraron actividad positiva frente a hongos y bacterias probados. Entre estas, se seleccionó la cepa con mayor potencial de inhibición para realizar pruebas *in vivo* en manzanas, demostrando una eficacia comparable a la de un fungicida comercial. Este hallazgo revela la presencia de productos naturales activos derivados de hongos endófitos

extraídos de *Nothofagus*, los cuales podrían ser utilizados como futuros agroquímicos naturales.

Endophytic fungi isolated from *Nothofagus dombeyi* and *Nothofagus oblicua* collected in the Andes Mountains and Central Valley, Ñuble Region: species distribution and production of active extracts against bacteria and pathogenic fungi.

Key words: Secondary metabolites, antimicrobial activity, natural extracts

Summary

Endophytic fungi, which reside in plants without causing damage, produce secondary metabolites with multiple functions. These compounds not only protect plants from diseases and predators, but also have applications in agriculture, being natural alternatives to fungicides. This study focused on examining the antimicrobial properties of natural extracts obtained from two species of trees of the genus *Nothofagus* in the Ñuble Region. Twenty-seven fungal strains were isolated, of which 12 showed positive activity against fungi and bacteria tested. Among these, the strain with the highest inhibition potential was selected for *in vivo* tests on apples, demonstrating an efficacy comparable to that of a commercial fungicide. This finding reveals the presence of active natural products derived from endophytic fungi extracted from *Nothofagus*, which could be used as future natural agrochemicals.

1 INTRODUCCIÓN

En los últimos tiempos, ha surgido una creciente demanda de productos que no contengan agentes perjudiciales para la salud. Los pesticidas, empleados para controlar plagas en diversos cultivos, son uno de estos elementos y contribuyen a la contaminación del entorno. Por ello, se exploran alternativas naturales para enfrentar estos desafíos. Una de ellas son los productos derivados de la naturaleza, como las plantas, que han despertado interés por su capacidad para repeler organismos dañinos.

Además de las propias defensas de estas, existe otro factor importante que contribuye a su resistencia contra patógenos: los hongos endófitos, quienes son microorganismos que durante todo o parte de su ciclo de vida invaden los tejidos internos de las plantas sin causar síntomas de enfermedad (Wilson 1995) tales pueden inducir la expresión de genes en las plantas para la producción de metabolitos secundarios en estas o en el medio donde se desarrollan, los cuales pueden ser extraídos para diferentes propósitos. (Aragón and Beltrán Acosta 2018).

Los metabolitos secundarios son específicos para cada especie y “tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales. (García and Carril 2011).

1.1 Hongos endófitos

Son organismos eucariotas, uni o pluricelulares, heterótrofos, que carecen de capacidad de desplazamiento, con reproducción sexual y/o asexual, y que producen esporas (Gómez). Sus células se agrupan formando hifas, las cuales son filamentos tabicados en la mayoría de las veces, o no tabicados, como en algunos mohos. Un conjunto de hifas se entrelaza formando el micelio, estructura de aspecto generalmente algodonoso, que penetra en el sustrato en que se desarrollan. (Mata and Salmones 2021).

Los hongos endófitos se han encontrado en todas las plantas (pastos, algas, musgos y plantas vasculares), desde las que habitan en el ártico hasta los trópicos, así como en los campos agrícolas. (Sánchez-Fernández, Sánchez-Ortiz et al. 2013) producen una multitud de compuestos de baja masa molecular conocidos como metabolitos secundarios (Brakhage 2013).

Los nuevos antibióticos, antimicóticos, inmunosupresores y compuestos anticancerígenos son solo algunos ejemplos de lo que se ha encontrado después del aislamiento, cultivo, purificación y caracterización de algunos endófitos selectos en el pasado reciente. (Strobel and Daisy 2003)

1.2 Metabolitos secundarios

Son producidos por los microorganismos y constituyen la interfase química entre éstos y el resto del mundo viviente. (Brizuela, García et al. 1998). Se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan

propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales.” (García and Carril 2011).

A medida que se han ido descubriendo nuevos productos naturales, el interés por los hongos endófitos ha ido en aumento. La producción a gran escala de metabolitos secundarios a partir microorganismos es más fácil y económica que su obtención por otros métodos o a partir de otras fuentes que los produzcan, de ahí el interés de explorar los endófitos, tanto por la diversidad química y biológica que cabe esperar como por el número de especies que podrían quedar por descubrir. (Rodríguez Hernández 2015).

Algunos conocidos por su importancia son los antibióticos penicilina, griseofulvina y cefalosporina, las micotoxinas (aflatoxinas), los alcaloides ergotamina o ácido lisérgico, entre otros.(Córdoba, Reynaldi and Rosa 2021)

1.3 Árboles en estudio

1.3.1 Roble (*Nothofagus oblicua*)

Conocido como Roble, Coyán, Hualle o Pellín, tiene hojas simples alternas, de forma ovada asimétrica y de borde doblemente aserrado. (Donoso 1983)

Los robles chilenos son árboles de gran tamaño que también alcanzan las mayores alturas en los bosques donde viven. Pierden sus hojas en el otoño y, entre enero y marzo, se encuentran sus frutos. Los robles se encuentran

entre Santiago (en el Cerro La Campana y en Las Vizcachas) y Chillán en los bosques de altura, y entre Chillán y Llanquihue son preponderantes en la depresión intermedia y faldeos cordilleranos. (Skewes and Guerra 2015).

1.3.2 Coihüe (*Nothofagus dombeyi*)

Conocido como Coigüe o Coihue, tiene hojas simples alternas de borde aserrado fino y de formas lanceoladas a oval-lanceoladas cortas, más pequeñas en general que las de Coigüe de Chiloé. En algunos árboles las hojas adquieren color plomizo-plateado. Es el árbol más común de los tipos forestales del sur de Chile. (Donoso 1983)

El Coihüe se distribuye entre los 35° y los 45 ° de latitud sur. Ocupa parte importante de los bosques de la Cordillera de la Costa y de los Andes, y también se encuentra en el Valle Central. Es una de las especies más abundantes de Chile. Especie cuyos árboles son de fuste recto y cilíndrico, pudiendo alcanzar hasta 40 m de altura y 4 m de diámetro. Es fácil de reconocer por su copa estratificada, que la distingue del resto de las especies que le acompaña. (Diaz-Vaz 1987).

2 HIPÓTESIS

- Los hongos endófitos aislados de las especies de *N. dombeyi* y *N. oblicua* producen extractos antimicrobianos cuando son cultivados artificialmente en medios líquidos.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo general:

- Evaluar las propiedades antimicrobianas de extractos naturales producidos por hongos endófitos aislados de *N. dombeyi* y *N. oblicua*.

3.2 Objetivos específicos:

- a. Caracterizar micro y macroscópicamente hongos endófitos aislados de *N. oblicua* y *N. dombeyi*.
- b. Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos producidos a partir de los hongos endófitos cultivados artificialmente en medios líquidos.
- c. Comparar la distribución de especies y propiedades antimicrobiana de los hongos aislados.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Recolección y aislación de muestras

La obtención del material vegetal de la especie *Nothofagus*, se realizó en la Cordillera de los Andes, región de Ñuble, comuna de San Fabián y en el Valle Central de Chile, región del Biobío, ciudad de Concepción. Las muestras fueron cortadas utilizando tijeras, rescatando los tallos y hojas saludables de *N. oblicua* y *N. dombeyi*, posteriormente fueron guardadas en bolsas herméticas y se llevaron al laboratorio de Microbiología y micología aplicada de la Universidad de Concepción, campus Chillán.

Ya en el laboratorio, se procedió a realizar un proceso de limpieza superficial con agua potable. Posteriormente se llevó a cabo el trabajo bajo campana de flujo laminar. Para esto se necesitaron frascos con etanol al 70%, hipoclorito de sodio al 2,8%, y agua destilada estéril.

Como primer paso se añadieron las hojas y tallos seleccionados al frasco con etanol al 70% durante 1 minuto, asegurándonos de que todas las muestras estuvieran cubiertas, terminado el tiempo se pasó al siguiente paso retirando las muestras con pinzas del frasco, traspasándolas al siguiente que contenía hipoclorito de sodio al 2,8% durante 3 minutos, y finalmente, se volvió a desinfectar con etanol al 70% durante 30 segundos.

Una vez completado todo este proceso, las muestras fueron transferidas al último frasco con agua destilada estéril para realizar un proceso de limpieza.

Se retiraron las muestras y se dejaron secar bajo campana de flujo laminar. Una vez secas se cortaron en trozos pequeños y se sembraron en placas de Petri rotuladas, las cuales contenían el medio de cultivo PDA (agar papa y dextrosa) y antibióticos (penicilina y estreptomycin), separando placas de tallos y hojas. Se dejaron una semana en incubadora a 27°C para esperar el crecimiento de microorganismos endófitos.

4.2 Purificación de los hongos endófitos

Transcurrido el tiempo, se procedió a revisar las placas, verificando que no hubiera contaminación con la ayuda de un microscopio. Las hifas de los hongos endófitos aparecieron sobre el medio de cultivo. Con un bisturí estéril se cortaron pequeños trozos de cada hifa y se transfirieron a placas con medio PDA (agar papa y dextrosa) dejándolas de 3 a 4 días en la incubadora. El proceso se repitió hasta lograr la purificación de todas las muestras posibles.

4.3 Caracterización macro y microscópica

Terminado el proceso de purificación, se llevó a cabo una observación de los cultivos, para realizar una caracterización microscópica en la cual se describió el micelio y los conidios. Además, se realizó caracterización macroscópica que se centró en el medio de cultivo, textura, colores y pigmentos que se encontraron en las muestras.

4.4 Obtención de extractos

Desde cada cepa aislada y pura se realizaron cortes pequeños de micelio y se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 1 litro con 500mL de medio con M10 estéril (4 g de extracto de glucosa, 10 g de extracto de malta, 4 g de extracto de levadura). Luego de esto, se ubicaron en un agitador orbital (120rpm, temperatura ambiental) hasta que el hongo consumió la glucosa del medio. Para determinar el contenido de glucosa de los cultivos, se utilizarán cintas reactivas universales. (OPTIMUS[®]test) (Aqueveque, Céspedes et al. 2017)

Una vez consumida la glucosa el cultivo se filtró mediante papel filtro hacia otro matraz Erlenmeyer, ya listo, se procedió a desechar el micelio y se continuó trabajando con la fase líquida, traspasándola a un embudo de decantación donde se agregó Acetato de etilo (1:1) dejándolos un tiempo aproximado de 6 horas hasta que se separen ambas soluciones.

Completado el tiempo, en ese momento se desechó el medio líquido y se trasladó el Acetato de etilo a un evaporador rotatorio para destilarlo. El objetivo era separar el Acetato de etilo del resto. Una vez completada la destilación, el contenido restante en el balón se consideró el “extracto de Acetato de etilo”. Este se transfirió y guardo en un tubo de ensayo, resguardado a una temperatura de 4°C hasta que se necesitara usar.

4.5 Evaluación actividad biológica

4.5.1 Preparación organismos-test

Para las pruebas antimicrobianas se utilizaron los extractos obtenidos, realizando dos tipos de pruebas: Test antifúngico y Test antibacteriano.

Para realizar la evaluación de la actividad antibacteriana, se utilizaron bacterias Gram positivas (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* y *Salmonella enteritidis*). Las bacterias almacenadas en frío se activaron por traspasos hacia medios de cultivo BHI (Brain Heart Infusion) a 37°C por 24 hrs. Luego se inocularon en medio Müller-Hinton en una razón de 1 mL de bacteria por cada 100 mL de medio, para así poder cultivarlas en placas y conservarlas bajo refrigeración hasta su posterior análisis (Shiva and Calvo 2007).

Para las pruebas antifúngicas se utilizaron los hongos *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp y *Rhizopus stolonifer*. Estos hongos se obtuvieron al estar cubiertos completamente de micelio y de ahí se adquirieron sus esporas. Para esto, bajo campana, se añadió agua peptonada estéril y con un asa se desprendieron las esporas. Las esporas en solución se traspasaron a tubos de ensayo y posteriormente se inocularon en medio de cultivo PDA, en una

razón de 2 mL de hongo por cada 100 mL de medio. Finalmente, se cultivaron en placas y se mantuvieron bajo refrigeración (Sanchis Talón)

4.5.2 Actividad antibacteriana y antifúngica

Bajo campana, se realizaron perforaciones con un sacabocados a las placas preparadas en el punto 4.5.1 y se procedió a aplicar con micropipetas los extractos de acetato de etilo previamente obtenidos.

El efecto biológico se evaluó de acuerdo con la presencia o ausencia de halos de inhibición alrededor de la perforación, en las cual se medirá su diámetro en milímetros.

En los resultados, la actividad biológica se indicó de acuerdo con la siguiente nomenclatura: (+) presencia de halo de inhibición, (-) ausencia de halo de inhibición. La zona del diámetro de inhibición se consideró significativa (+++) cuando el diámetro fue mayor a 20 mm, moderada (++) cuando sea entre los 10 y los 20 mm y baja (+) en el caso de que el diámetro haya sido menor a 10 mm (DESALE 2016)

4.6 Comparación entre poblaciones de hongos aislados

Se realizó una comparación entre las poblaciones de hongos aislados según la especie de árbol que descienda, ubicación geográfica donde se recolectaron las muestras, cantidad de hongos aislados por especie y número de cepas con actividad antimicrobiana.

4.7 Evaluación actividad antifúngica *in vivo*

Para la evaluación *in vivo* se procedió a seleccionar los extractos que exhibieron la más destacada actividad antimicrobiana. A partir de esta preselección, se llevó a cabo un análisis detallado, priorizando aquel extracto que manifestó una actividad biológica significativa y con este, se realizó la evaluación.

Se comenzó con un proceso de esterilización superficial de las manzanas, utilizando una solución de alcohol al 70%. Cada fruta se sumergió durante dos minutos en esta solución y luego se ubicaron en la campana de flujo laminar hasta que su superficie estuvo completamente seca.

Se constituyeron tres conjuntos experimentales, cada uno compuesto por un trío de unidades de prueba representadas por manzanas. A cada entidad frutas se le efectuó una incisión precisa mediante el uso de un bisturí, con el propósito de extraer la pulpa de la zona correspondiente, generando así un espacio más accesible y despejado para las futuras observaciones y mediciones.

El primer grupo se dejó como un control, el cual solo se inoculó con el hongo seleccionado la incisión realizada. El segundo grupo se inoculó con el hongo y luego el extracto de Acetato de etilo escogido, ambos con la misma medida, y el último grupo con el hongo y el fungicida comercial Rovral 50%. Luego de este proceso, se realizaron medidas del crecimiento durante 5 días.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Recolección e identificación de material biológico

Se realizó la recolección de muestras de material vegetal (hojas y tallos) de las especies *N. oblicua* y *N. dombeyi* en diferentes localidades; San Fabián, Región de Ñuble y Concepción, Región del Biobío, respectivamente. Cada muestra fue transportada al laboratorio de microbiología de la Facultad Agrícola, Universidad de Concepción, ubicado en el Campus Chillán donde se les asignó un código único para su posterior análisis, como se observa en la Tabla 1. Este código sigue un formato que incluye el año de obtención de la muestra, las iniciales del árbol de origen y el lugar de procedencia, ya sea tallo u hoja.

Tabla 1. Codificación de hongos endófitos aislados de *N. oblicua* y *N. dombeyi*

Árbol	Lugar	Codificación de hongos endófitos	
		Tallo	Hoja
<i>N. oblicua</i>	San Fabián	22NoSFT	22NoSFH
<i>N. dombeyi</i>	Concepción	22NdCONT	22NdCONH

5.2 Aislamiento de hongos endófitos

De los dos ejemplares arbóreos seleccionados para el análisis, se logró aislar un conjunto total de 27 cepas de hongos endófitos, extraídas tanto de tallos como de hojas de dichos árboles, las cuales fueron identificadas con los

códigos descritos en la Tabla 1 pero agregando un número al final de cada nombre para llevar un conteo de ellas.

La mayoría de las cepas (25) se originaron en los tallos, mientras que los 2 restantes provinieron de las hojas. (Tabla 2).

Tabla 2. Hongos endófitos aislados desde *N. oblicua* y *N. dombeyi*.

Árbol	Lugar	Código	Cantidad hongos endófitos		Total
			Tallo	Hoja	
<i>N. oblicua</i>	San Fabián	22NOSF	17	1	17
<i>N. dombeyi</i>	Concepción	22NdCON	8	1	9
		Total	25	2	27

5.3 Evaluación de la actividad antifúngica y antibacteriana.

Para la evaluación, se examinó la eficacia antibacteriana y antifúngica de los extractos derivados previamente mediante acetado de etilo de cada cepa. En total, se lograron obtener 27 extractos, de los cuales 18 procedían de *N. oblicua* y 9 de *N. dombeyi*. Es importante destacar que el extracto 22NdSFH1 fue descartado debido a la presencia de contaminantes.

En las siguientes tablas (Tabla 3 a 6) se observan los resultados de las pruebas antifúngicas y antibacterianas para cada extracto obtenido.

Tabla 3 Actividad antifúngica de los extractos de acetato de etilo provenientes de *N. oblicua*, San Fabián.

Código	Alt	Asp	Bo	Clad	Fc	Pen	Rhiz
22NoSFT1	-	+++	-	-	-	+++	-
22NoSFT2	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT3	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT4	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT5	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT6	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT7	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT8	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT9	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT10	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT11	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT12	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT13	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT14	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT15	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT16	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT17	-	-	-	-	-	-	-

Alt: *Alternaria*; Asp: *Aspergillus niger*; Bo: *Botrytis cinérea*; Clad: *Cladosporium spp*; Fc: *Fusarium*; Pen: *Penicillium sp*; Rhiz: *Rhizopus*; (+) Presencia de halo de inhibición; (-) Ausencia de halo de inhibición; (+): 1- 10 mm, (++) : 10- 20 mm, (+++): 20 o más mm.

En la Tabla 3, se visualizan los resultados de la prueba antifúngica, donde solo 1 extracto correspondiente a 22NOSFT1 del árbol *N. oblicua* resultó activo contra dos hongos; *A. niger* y *P. sp*, observando un efecto inhibitorio notable para ambos, indicando una actividad antifúngica potente, especialmente ya que el halo de inhibición superó los 20mm.

En la Tabla 4 se observan los resultados de la prueba antibacteriana, destacando que los hongos 22NOSFT6, 22NOSFT7, 22NOSFT10 aislados del árbol *N. oblicua*, demostraron actividad contra *B.cereus*, *B.subtilis* y *S.epidermidis*. Específicamente, el extracto 22NoSFT6 mostró una marcada actividad, con un halo de inhibición superior a los 20 mm.

Tabla 4 Actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo provenientes de *N. oblicua*, San Fabián.

Código	Bc	Bs	Ea	Ec	Kp	Lm	Sal	S.a	S.e	Psa	MRS Ec	MRS Sa
22NoSFT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT6	++	++	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
22NoSFT7	++	++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
22NoSFT8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT11	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
22NoSFT12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NoSFT17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

B.c: *Bacillus cereus*; B.s: *Bacillus subtilis*; E.a: *Enterococcus faecalis*; E.c: *Escherichia coli*; K.p: *Klebsiella pneumoniae*; L.m: *Listeria monocytogenes*; Sal: *Salmonella entérica*; S.a: *Staphylococcus aureus*; S.e: *Staphylococcus epidermidis*; PSA: *Pseudomonas syringae pv. actinidiae*; MRS: resistente a los antibióticos; (+) Presencia de halo de inhibición; (-) Ausencia de halo de inhibición; (+): 1- 10 mm, (++) : 10- 20 mm, (+++): 20 o más mm

Tabla 5. Actividad antifúngica de los extractos de acetato de etilo provenientes de *N. dombeyi*, Concepción.

Código	Alt	Asp	Bo	Clad	Fc	Pen	Rhiz
22NdCONH1	-	++	-	-	-	-	-
22NdCONT1	-	-	-	-	-	-	-
22NdCONT2	-	-	-	-	-	-	-
22NdCONT3	-	-	-	-	-	-	-
22NdCONT4	-	+++	-	-	-	-	-
22NdCONT5	-	-	-	-	-	-	-
22NdCONT6	-	+++	-	-	-	-	-
22NdCONT7	-	-	-	-	-	-	-
22NdCONT8	-	-	-	-	-	-	-

Alt: *Alternaria*; Asp: *Aspergillus niger*; Bo: *Botrytis cinérea*; Clad: *Cladosporium spp*; Fc: *Fusarium*; Pen: *Penicillium sp*; Rhiz: *Rhizopus*; (+) Presencia de halo de inhibición; (-) Ausencia de halo de inhibición; (+): 1- 10 mm, (++): 10 - 20 mm, (+++): 20 o más mm.

En la Tabla 5, se observan los resultados de la prueba antifúngica del árbol *N. dombeyi* donde solo 3 extractos correspondientes a 22NdCONH1, 22NdCONT4, 22NdCONT6, resultaron activos y en este caso para inhibir el crecimiento de *A. niger*.

En la Tabla 6 se aprecia que fueron activos 5 extractos correspondientes a 22NdCONH1, 22NdCONT4, 22NdCONT6, 22NdCONT7 y 22NdCONT8, del árbol *N. dombeyi*, para inhibir el crecimiento de las bacterias *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* y *S.epidermidis*.

Tabla 6. Actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo provenientes de *N. dombeyi*, Concepción.

Código	Bc	Bs	Ea	Ec	Kp	Lm	Sal	S.a	S.e	Psa	MRS Ec	MRS Sa
22NdCONH1	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
22NdCONT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NdCONT2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NdCONT3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NdCONT4	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	-	-
22NdCONT5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22NdCONT6	+	+	+++	-	-	-	-	-	+	-	-	-
22NdCONT7	+++	+++	+++	+++	-	+	-	-	+++	-	-	-
22NdCONT8	+++	+++	+++	+++	-	+++	-	-	+++	-	-	-

B.c: *Bacillus cereus*; B.s: *Bacillus subtilis*; E.a: *Enterococcus faecalis*; E.c: *Escherichia coli*; K.p: *Klebsiella pneumoniae*; L.m: *Listeria monocytogenes*; Sal: *Salmonella entérica*; S.a: *Staphylococcus aureus*; S.e: *Staphylococcus epidermidis*; PSA: *Pseudomonas syringae pv. actinidiae*; MRS: resistente a los antibióticos; (+) Presencia de halo de inhibición; (-) Ausencia de halo de inhibición; (+): 1- 10 mm, (++) : 10- 20 mm, (+++): 20 o más mm

5.4 Comparación de la distribución de especies y propiedades antimicrobiana de los hongos aislados.

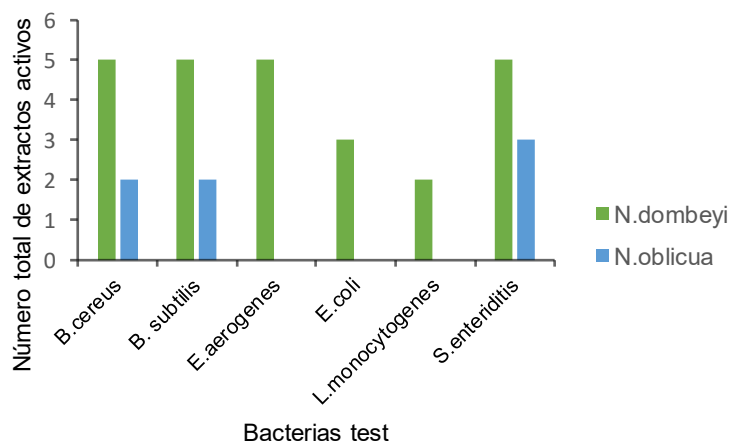


Figura 1. Número total de extractos activos de acetado de etilo procedentes de los árboles *N. oblicua* y *N. dombeyi* contra bacterias test.

En la Figura 1, se puede apreciar el número total de los extractos activos provenientes de hongos endófitos tanto del árbol *N. oblicua* como *N. dombeyi* en las pruebas antibacterianas. Resultaron ser 5 extractos activos de *N. dombeyi* y 2 de *N. oblicua*, contra *B. cereus* y *B. subtilis*. En el caso de *S. enteriditis*, 5 extractos de *N. dombeyi* y 3 de *N. oblicua* inhibieron su crecimiento. Además los extractos provenientes de *N. dombeyi* fueron capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias *E. aerogenes*, *E. coli* y *L.monocytogenes* con 5, 3 y 2 extractos respectivamente.

En la Figura 2, se observan el total de los extractos activos en las pruebas antifúngica provenientes de los árboles *N. dombeyi* y *N. oblicua*. En estas pruebas, 3 extractos de *N. dombeyi* y 1 de *N. oblicua* inhibieron el crecimiento de *A. niger* y solo 1 extracto de *N. oblicua* inhibió el de *P.sp.*

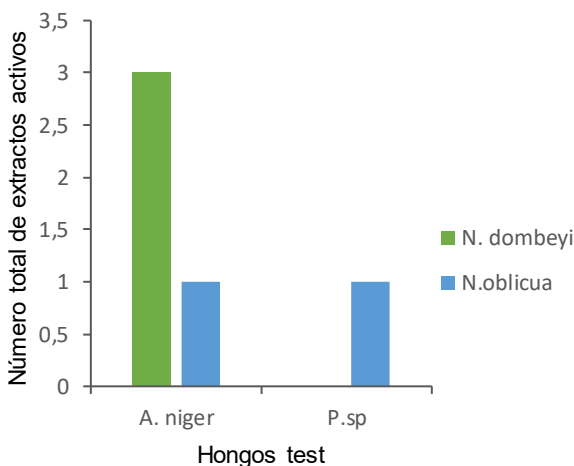


Figura 2. Número total de extractos activos de acetato de etilo procedentes de los árboles *N. oblicua* y *N. dombeyi* contra hongos test.

En el marco de la evaluación de la actividad antifúngica y antibacteriana de los extractos obtenidos, se evidenció que el árbol *N. dombeyi* sobresalió al demostrar una mayor eficacia en la inhibición del crecimiento de ambos tipos de microorganismos, a pesar de haber producido un número inferior de cepas en comparación con *N.oblicua*. Con mayor detalle, *N.dombeyi* presentó un total de 9 cepas, y de estas, 8 demostraron actividad biológica al inhibir el desarrollo tanto de hongos como bacterias. En contraste, *N. oblicua* que generó 17 cepas, sin embargo, únicamente 8 de ellas manifestaron dicha actividad. Según bibliografía, estos resultados pueden deberse a que el árbol *N. dombeyi* se encuentra colonizado por un amplio número de hongos endófitos, y confirman que el criterio de selección empleado, es decir, plantas que crecen en áreas de gran diversidad biológica y que no presentan ningún daño por patógenos o herbívoros, constituyen una buena estrategia para aislar una gran cantidad y diversidad de endófitos. (Sánchez-Fernández, Sánchez-Ortiz et al. 2013), otra razón que puede influir es la edad de sus hojas ya que las hojas jóvenes, aún en yemas, son generalmente libres de endófitos debido a que aún no han sido expuestas al inóculo de éstos (Wilson and Carroll 1994).

5.5 Caracterización macro y microscópica

Para la identificación de los hongos endófitos, se puso énfasis en sus características observables a simple vista y en niveles microscópicos. Se describieron los aspectos macroscópicos tales como el color, la forma y

tamaño. Además, se analizaron las características microscópicas de las hifas, considerando la presencia de esporas, la existencia de divisiones internas (septos) y otros detalles relevantes. (Maldonado Torres, Lores Cruz and Osorio Hernández 2017)

Tabla 7 Caracterización macroscópica de hongos endófitos aislados de *N. oblicua* y *N. dombeyi*.

Hongo	Color	Forma del micelio	Textura	Tinción del agar	Color del agar
22NoSFT7	Gris/blanco	Ovalada	Rugosa	No	-
22NoSFT17	Café claro/gris	Ovalada	Algodonosa	No	-
22NdCONT4	Blanco/negro	Circular	Rugosa	No	-
22NdCONT6	Café oscuro	Circular	Compacto	No	-
22NdCONT7	Blanco/amarillo	Circular	Algodonosa	Si	Amarillo

Tabla 8. Caracterización microscópica de hongos endófitos aislados de *N. oblicua* y *N. dombeyi*.

Hongo	Producción de esporas	Septos	Otras características
22NoSFT7	nd	Si	Hifas oscuras
22NoSFT17	nd	Si	Hifas delgadas y ramificadas
22NdCONT4	nd	No	Hifas transparentes y ramificadas
22NdCONT6	No	Si	Hifas muy delgadas y ramificadas
22NdCONT7	No	No	Hifas delgadas y transparentes

Nd: no detectable.



Figura 3. A) Hongo endófito 22NoSFT7; B) Hifas del hongo 22NoSFT7



Figura 4. A) Hongo endófito 22NoSFT17; B) Hifas del hongo 22NoSFT17

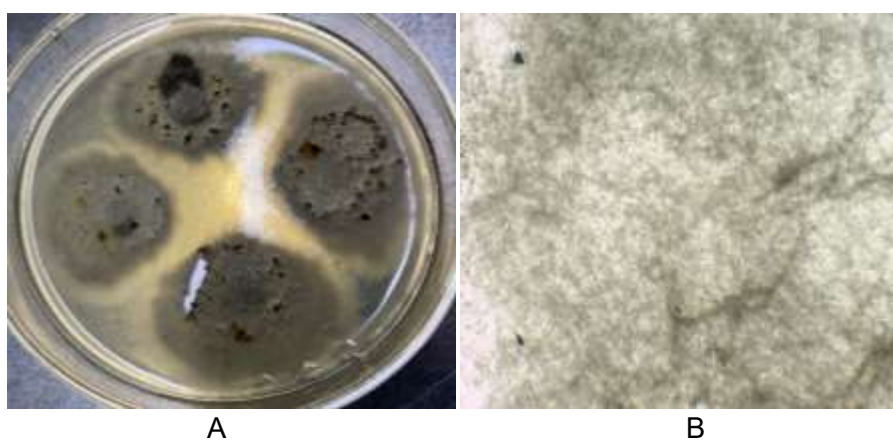


Figura 5. A) Hongo endófito 22NdCONT4; B) Hifas del hongo 22NdCONT4



Figura 6. A) Hongo endófito 22NdCONT6; B) Hifas del hongo 22NdCONT6



Figura 7. A) Hongo endófito 22NdCONT7; B) Hifas del hongo 22NdCONT7

La caracterización y clasificación de los hongos endófitos se vuelve un poco complicada debido a la diversidad morfológica de cada individuo, aunque tradicionalmente, la taxonomía de los hongos se basa en el análisis de los caracteres morfológicos de las estructuras de reproducción pero para una alta proporción de hongos endófitos resulta difícil su identificación mediante tales criterios, debido a que muchos de los aislados en el laboratorio permanecen en forma micelial, sin esporular en los medios de cultivos utilizados rutinariamente. (Delgado, Ortega et al. 2021)

5.6 Evaluación actividad antifúngica *in vivo*

Se realizó la actividad *in vivo* en manzanas (*Fuji*) por un periodo de 5 días.

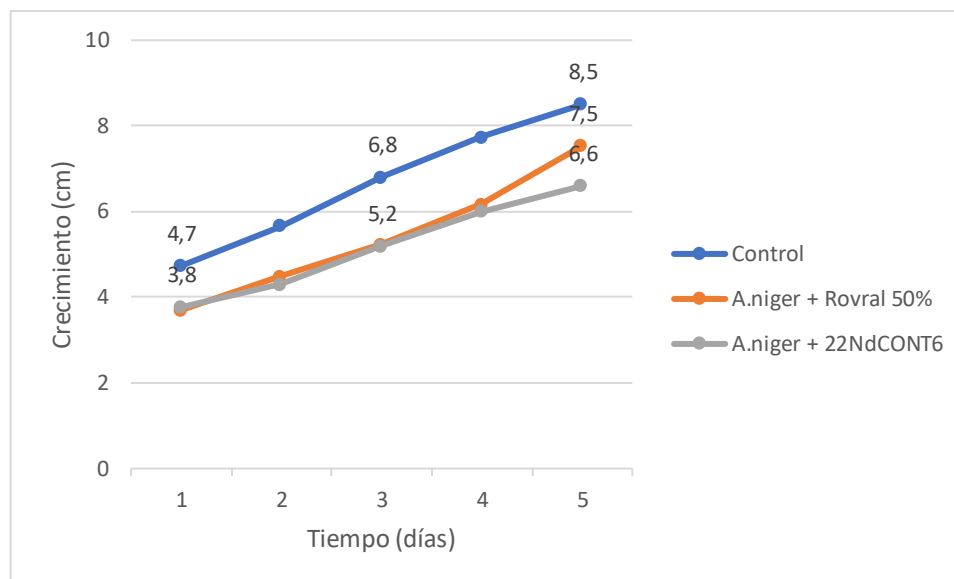


Figura 8. Medidas del crecimiento del hongo inoculado en las manzanas vs el periodo de evaluación durante 5 días.

En la Figura 8 se graficaron los datos obtenidos de la prueba *in vivo* aplicada a manzanas, ocupando un control, el hongo escogido que en este caso fue *A. niger* y el extracto con actividad antifúngica sobresaliente 22NdCONT6, para esta actividad se fueron realizando medidas del crecimiento que tenía el hongo en cada manzana de los grupos realizados.

El fungicida comercial Rovral 50% tuvo una diferencia de efectividad antifúngica contra *A. niger* de un 1,1 cm más que el extracto 22NdCONT6, esto quiere decir que el extracto inhibió hasta 7,5 cm y el antifúngico hasta 6,6 cm. Según bibliografía uno de los temas de investigación más analizados de los hongos endófitos se relaciona con los estudios encaminados a su

selección como agentes de control biológico (ACB) para el manejo de plagas ya que estos producen un amplio arsenal de metabolitos secundarios que mejoran la resistencia frente a patógenos y herbívoros, la absorción de nutrientes y promueven el crecimiento vegetal (Delgado, Ortega et al. 2021).

Esto queda un tanto demostrado en el crecimiento entre las muestras tratadas con el extracto antifúngico y el fungicida de mercado en comparación con el control sin tratamiento, ya que esos dos primeros actuaron de manera similar, teniendo un punto de igual medida en el día tres.

Aun cuando los hongos endófitos pueden ser utilizados en diferentes estrategias de manejo junto a otras tácticas, es necesario el desarrollo de experimentos en condiciones controladas para conocer aspectos como las dosis de aplicación, el momento y la frecuencia antes de proceder a la aplicación en campo. Algunas investigaciones refieren resultados positivos, mientras otras los refieren como neutros, o incluso negativos, en lo que respecta a la mezcla de los hongos endófitos con otros controles biológicos. (Delgado, Ortega et al. 2021).



Figura 9. A) Manzanas desinfectadas, agrupadas y rotuladas antes de la evaluación *in vivo*; B) Manzanas preparadas luego de los tratamientos realizados a cada grupo.

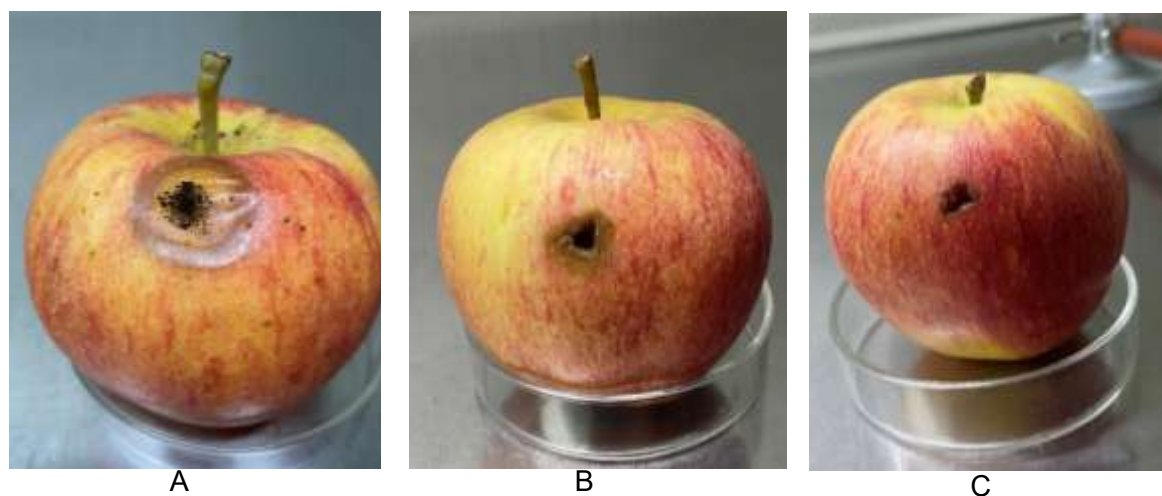


Figura 10. A) Manzanas control día 1, inoculadas con el hongo *A. niger*; B) Manzanas inoculadas con *A. niger* + 22NdCONT6; C) Manzanas inoculadas con *A. niger* + Rovral 50%.

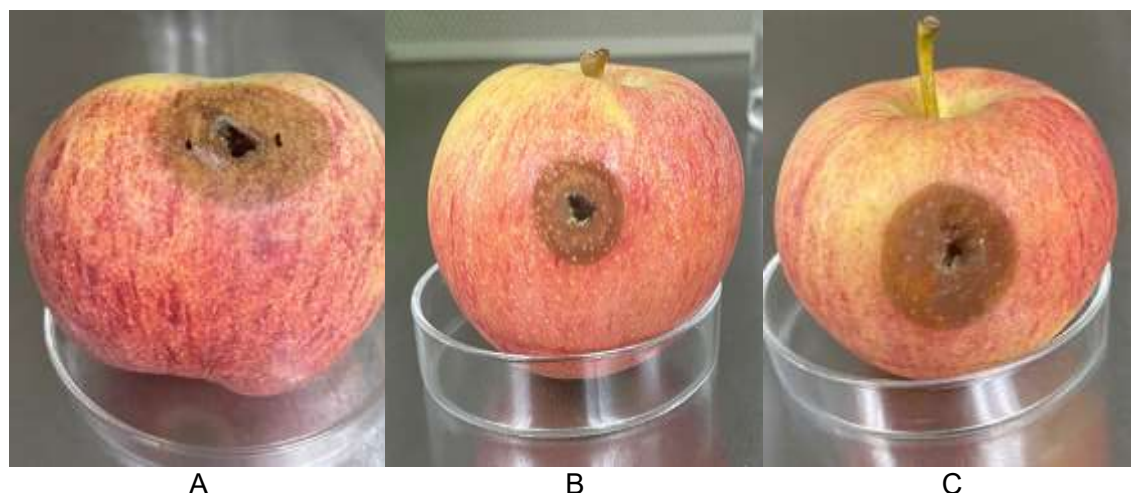


Figura 11. A) Manzanas control día 5, inoculadas con el hongo *A. niger*; B) Manzanas inoculadas con *A. niger* + 22NdCONT6; C) Manzanas inoculadas con *A. niger* + Rovral 50%.

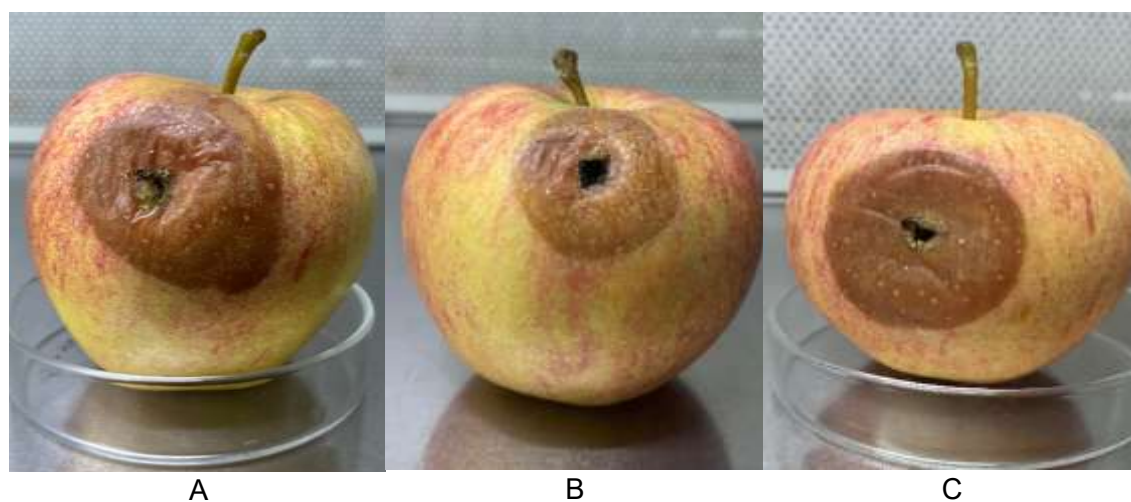


Figura 12. A) Manzanas control día 5 y último inoculadas con el hongo *A. niger*; B) Manzanas inoculadas con *A. niger* + 22NdCONT6; C) Manzanas inoculadas con *A. niger* + Rovral 50%.

6 CONCLUSIONES

Los hongos endófitos aislados de las especies *N. dombeyi* y *N. oblicua* sí producen extractos antimicrobianos cuando se cultivan artificialmente en medios líquidos.

Se lograron recolectar 27 muestras en total, de las cuales se cultivaron artificialmente 9 del árbol *N. dombeyi* y 18 de *N. oblicua*. Los hallazgos revelaron efectos positivos en la capacidad de inhibición del crecimiento tanto bacteriano como fúngico, logrando inhibir el crecimiento de las bacterias *B.cereus* ,*B. subtilis* , *E. aerogenes*, *E. coli*, *L.monocytogenes* , *S.enteriditis* y los hongos *A.niger* y *P.expansum*. Lo que sugiere un potencial uso de estos extractos como agentes antifúngicos naturales.

Las cepas obtenidas de los hongos endófitos encontrados en el árbol *N. dombeyi* de la ciudad de Concepción, a pesar de ser solo 9, mostraron una actividad con potencial de inhibición, con 5 cepas exhibiendo actividad. En comparación, la otra especie contó con 18 cepas, pero solo 4 mostraron actividad. Esto podría deberse a factores como la alta biodiversidad en el entorno se encontraba la especie *N. dombeyi*, lo cual fue favorable para la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica.

Los extractos producidos por hongos endófitos aislados de *N. oblicua* mostraron una mayor actividad antibacteriana. De las 17 cepas evaluadas, 3 exhibieron capacidad de inhibición contra tres tipos de bacterias: *B. cereus*,

B. subtilis y *S. epidermis*. Así fue también en el caso de *N. dombeyi*, que los hongos endófitos aislados obtuvieron mayoría en la misma actividad, donde 5 de estos, tuvieron actividad inhibitoria contra las bacterias *B. cereus*, *B.subtillis*, *E.faecalis*, *E.coli*, *L. monocytogenes*, *S.epidermidis*.

Se realizó caracterización macro y microscópica de las cepas con más actividad. Se seleccionaron 5 extractos totales, de los cuales 3 provenían del árbol *N.dombeyi* de Concepción y 2 del árbol *N. oblicua* de San Fabián. No se encontraron coincidencias de cepas entre sí al momento de ser realizada la actividad bajo las condiciones de laboratorio.

En el experimento con manzanas, seleccionamos el extracto que mostró una fuerte capacidad para combatir hongos. Se evaluó su efectividad al compararlo con un fungicida comercial Rovral 50% y un grupo de control. Los resultados fueron notables, ya que el extracto actuó de manera similar al fungicida, retrasando el crecimiento del hongo de manera significativa comparados con el crecimiento en el control.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Aqueveque, P., et al. (2017). "Antifungal activities of secondary metabolites isolated from liquid fermentations of *Stereum hirsutum* (Sh134-11) against *Botrytis cinerea* (grey mould agent)." Food and Chemical Toxicology **109**: 1048-1054.
2. Aragón, S. M. and C. Beltrán Acosta (2018). "Los hongos endófitos en el control biológico de fitopatógenos e insectos plaga."
3. Brakhage, A. A. (2013). "Regulation of fungal secondary metabolism." Nature Reviews Microbiology **11**(1): 21-32.
4. Brizuela, M. A., et al. (1998). "Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios." Revista Iberoamericana de Micología **15**(6974): 1998-1915.
5. Córdoba, S. B., et al. (2021). "Micología en Medicina Veterinaria." Libros de Cátedra.

6. Delgado, B. P., et al. (2021). "Los hongos endófitos y sus aplicaciones potenciales en la agricultura." Revista de Protección Vegetal **36**(3).
7. DESALE, M. G. (2016). Bioprospecting of endophytic fungi from certain medicinal plants, BHARATI VIDYAPEETH.
8. Diaz-Vaz, J. E. (1987). "Anatomía de madera de *Nothofagus dombeyi* (Mirbel) Oerstedt." Bosque **8**(1): 63-65.
9. Donoso, Z. (1983). "Árboles nativos de Chile. Guía de reconocimiento."
10. García, A. Á. and E. P.-U. Carril (2011). "Metabolismo secundario de plantas." Reduca (biología) **2**(3).
11. Gómez, C. F. L. "Definición de Reino Fungi (de los hongos) características, reproducción, e importancia."
12. Maldonado Torres, A., et al. (2017). "Identificación morfológica de hongos y bacterias en lodos de extracción de gas natural y de tratamiento de aguas residuales." REPOSITORIO NACIONAL CONACYT.

13. Mata, G. and D. Salmones (2021). "Técnicas de aislamiento, cultivo y conservación de cepas de hongos en el laboratorio." Xalapa: Instituto de Ecología, AC https://www.inecol.mx/images/pdf/libro_cepas.
14. Rodríguez Hernández, J. (2015). "Biodiversidad de hongos endófitos de especies vegetales y su potencial bioplaguicida."
15. Sánchez-Fernández, R. E., et al. (2013). "Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina." TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas **16**(2): 132-146.
16. Sanchis Talón, M. Evaluación experimental de terapias antifúngicas frente a hongos oportunistas emergentes, Universitat Rovira i Virgili.
17. Shiva, C. and M. Calvo (2007). "Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos." Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento [Tesis Doctoral]. España: Universidad autónoma de Barcelona.

18. Skewes, J. C. and D. E. Guerra (2015). "Sobre árboles y personas: La presencia del roble (*Nothofagus obliqua*) en la vida cordillerana mapuche de la cuenca del río Valdivia." Atenea (Concepción)(512): 189-210.

19. Strobel, G. and B. Daisy (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev*67: 491–502.

20. Wilson, D. (1995). "Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition." Oikos: 274-276.

21. Wilson, D. and G. Carroll (1994). "Infection studies of *Discula quercina*, an endophyte of *Quercus garryana*." Mycologia **86**(5): 635-647.