

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN,
CAMPUS LOS ÁNGELES,
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA VEGETAL**



**ESTUDIO DE LA COMUNIDAD FÚNGICA ENDOFÍTICA FOLIAR DE *Araucaria araucana*
Y SUS POSIBLES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.**

**PROYECTO DE TÍTULO PARA OPTAR AL
TÍTULO DE INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.**

**TAMARA MURIEL CABEZAS CORTÉS
LOS ÁNGELES – CHILE**

2025

“Estudio de la comunidad fúngica endofítica foliar de *Araucaria araucana* y sus posibles aplicaciones biotecnológicas”

Alumna

Tamara Muriel Cabezas Cortés
Ingeniería en Biotecnología Vegetal

Profesor Guía

Dr. Daniel Eduardo Chávez Matamala
Profesor Asociado
Ingeniero Forestal

Jefe de Carrera

Pedro Quiroz Hernández
Profesor instructor
Ingeniero (E) Forestal

Director de Departamento

Dr. Mauricio J. Rondanelli Reyes
Profesor Asociado
Biólogo

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a quienes me acompañaron a lo largo de este camino. En primer lugar, a mis padres, a mi hermano y a mi tía Patricia, por estar siempre presentes en los momentos más difíciles emocionalmente, sobre todo, brindándome su apoyo incondicional y palabras de aliento cuando sentía que ya no podía continuar. Su amor y fortaleza fueron fundamentales para seguir adelante.

Agradezco profundamente al Dr. Daniel Chávez, mi profesor guía, por su compromiso, orientación y paciencia durante todo este proceso. Su acompañamiento no solo fue clave en el desarrollo de esta tesis, sino que también ha sido una fuente constante de inspiración desde que decidí comenzar esta carrera.

También extendiendo mi gratitud al Ingeniero en Biotecnología Vegetal Christian Deramond, por su colaboración, disposición y voluntad en el apoyo de gran parte de los análisis experimentales realizados. Su ayuda fue significativa para concretar este trabajo.

De igual manera, agradezco a la profesora Carol Peña, por su disposición, amabilidad y paciencia al orientarme en los análisis de diversidad filogenética. Su apoyo fue clave para comprender y desarrollar esta parte fundamental del estudio.

Y, por último, pero no menos importante, me agradezco a mí misma. Por no rendirme, por levantarme en cada tropiezo, y por mantener la constancia necesaria para alcanzar esta meta.

Índice general

Índice de figuras	6
Índice de Tablas	7
Lista abreviaturas	8
Resumen	9
Abstract	10
I. Introducción.	11-12
II. Marco teórico.	13 - 20
2.1 Características e importancia de la <i>Araucaria araucana</i>	13-15
2.2 Interacciones microbianas en raíces y acículas de <i>A. araucana</i>	15
2.3 Hongos endófitos como componentes esenciales para los ecosistemas.	15-17
2.4 Hongos endófitos en asociación a <i>A. araucana</i>	17-18
2.5 Hongos fitopatógenos que afectan a <i>Araucaria araucana</i>	18-20
III Hipótesis y Objetivos	21
3.1 Hipótesis.	21
3.2 Objetivo general.	21
3.3 Objetivos específicos.	21
IV Metodología	22- 28
4.1 Área de estudio	22
4.2 Muestreo de hojas de <i>A. araucana</i>	22-23
4.3 Aislamiento de hongos endofíticos.	23
4.4 Purificación de hongos endofíticos y medición de crecimiento.	24
4.5 Extracción, amplificación y secuenciación del ADNr.	25-26
4.6 Estudio de la diversidad de hongos endófitos asociados con <i>A. araucana</i>	26-27
4.7 Actividad antagónica de hongos endófitos sobre hongos fitopatógenos	27
4.8 Análisis estadístico.	27-28
V. Resultados	29-39

5.1. Composición de endófitos fúngicos.....	29
5.2. Identificación de especies	29
5.3 Velocidad media de crecimiento radial de hongos endófitos secuenciados e identificados.	31
5.4. Análisis filogenético de las especies secuenciadas	33-34
5.5 Variación en diversidad de hongos endofíticos	34
5.6 Taxones más abundantes	34
5.7 Diversidad alfa y número efectivo de especies medido en índices	34-36
5.8 Evaluación de la actividad antagónica de hongos endófitos frente a fitopatógenos	37-39.
VI. Discusión.....	40-43
VII.Conclusión	44
VIII. Bibliografía	45-54

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de distribución de <i>Araucaria araucana</i> en la zona de los Andes y Costa de Chile.	13
Figura 2. Muestreo de material vegetal	23
Figura 3. Discos de hojas de <i>Araucaria araucana</i> en medio EMA.....	24
Figura 4. Cultivo Puro de hongo endófito aislado de hojas de <i>Araucaria</i> y medición de velocidad	25
Figura 5. Diagrama de Venn que representa el número de cepas identificadas en Villarrica y Malalcahuello.....	29
Figura 6. Cepas de hongos endófitos aislados desde el área foliar de <i>Araucaria araucana</i>	32
Figura 7. Árbol filogenético.	33
Figura 8. Curva de rarefacción por número de especies observadas e individual por sitio.	36
Figura 9. Agrupamiento jerárquico de muestras basado en la abundancia relativa de hongos endófitos aislados de hojas de <i>Araucaria araucana</i> en diferentes sitios de estudio y análisis no paramétrico nMDS.....	37
Figura 10. Evaluación antagónica entre hongos endófitos y hongos fitopatógenos..	39

Índice de Tablas

Tabla 1. Aplicaciones biotecnológicas de hongos endófitos en diferentes áreas.	16
Tabla 2. Especies de hongos endófitos encontrados en diferentes especies vegetales y sus potenciales biotecnológicos.....	17
Tabla 3. Hongos endófitos descritos en asociación con <i>Araucaria araucana</i>	18
Tabla 4. Identificación de cantidad de especies obtenidas por sitio de muestreo.	30
Tabla 5. Velocidad media de crecimiento radial de las especies identificadas molecularmente.....	31
Tabla 6. Índices de diversidad alfa comparados entre sitios.	35
Tabla 7. PICR% de la actividad antagónica de hongos endófitos aislados de <i>Araucaria araucana</i>	38

Lista abreviaturas

<i>A. araucana</i>		<i>Araucaria araucana</i>
Malal		Reserva Nacional Malalcahuello
Villa		Parque Nacional Villarrica
HE		Hongo(s) endófito(s)
EMA		Extracto de Malta Agar
ADNr		ADN ribosomal
PCR		Reacción en cadena de la polimerasa
ITS		Espaciador transcrito interno
NCBI		Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)
BLASTn		Herramienta básica de alineamiento de secuencias nucleotídicas
PICR		Porcentaje de inhibición del crecimiento radial
NMDS		Escalamiento multidimensional no métrico
ANOSIM		Análisis de similitud
CTAB		Bromuro de cetiltrimetilamonio
PDA		Papa dextrosa agar

Resumen

Araucaria araucana es una especie arbórea emblemática de Chile y Argentina, con gran importancia cultural para las comunidades mapuches. Actualmente, amenazas como el cambio climático, la deforestación y la expansión humana han provocado una disminución significativa de sus poblaciones naturales. Entre los organismos que interactúan con esta especie, los hongos endófitos (HE) destacan por colonizar sus tejidos sin causar daño, favoreciendo su crecimiento y su defensa frente a patógenos. El objetivo de este estudio fue caracterizar la diversidad de hongos endófitos foliares presentes en *A. araucana* y evaluar su capacidad antagónica frente a hongos fitopatógenos, con miras a su eventual uso como agentes de biocontrol. Para ello, se realizó el aislamiento, purificación e identificación molecular de cepas obtenidas de tejido foliar sano en dos sitios de muestreo (Parque Nacional Villarrica y Reserva Malalcahuello), junto con ensayos de confrontación dual para determinar su eficacia biocontroladora. Se aislaron 203 cepas, identificándose 29 morfoespecies, de las cuales 16 fueron secuenciadas mediante análisis molecular. No presentaron diferencias significativas en cuanto a la diversidad de especies en ambos sitios. A pesar de que las muestras provenían de hojas sin síntomas visibles, se detectaron especies fúngicas patógenas, como *Pewenomyces kalosus* (cancro del pehuén), lo que sugiere posibles interacciones con endófitos capaces de limitar la infección en la planta. En los ensayos de confrontación dual se evaluó el potencial antagónico de cinco HE: *Alternaria alternata* (cepa 1), *Pholiota* sp. (cepa 3), *Sydowia polyspora* (cepa 7), *Pseudocamarosporium brabeii* (cepa 12) y *Cladosporium ramotenellum* (cepa 19) frente a *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. y *Phytophthora* sp. Se registraron diferencias en los porcentajes de inhibición del crecimiento radial (PICR), destacando *Pseudocamarosporium brabeii* (cepa 12) con un 34,2% de inhibición del crecimiento de *Botrytis* sp., seguido de *A. alternata* (cepa 1) por su elevada capacidad inhibitoria: 19.6% frente a *Botrytis* sp. y 18.02% frente a *Phytophthora* sp. Estos resultados respaldan el potencial biotecnológico de los hongos endófitos foliares de *A. araucana* como agentes de biocontrol, contribuyendo a estrategias sostenibles para su conservación y la protección fitosanitaria.

Abstract

Araucaria araucana is an emblematic tree species of Chile and Argentina, with great cultural significance for the Mapuche communities. Currently, threats such as climate change, deforestation, and human expansion have led to a significant decline in its natural populations. Among the organisms interacting with this species, endophytic fungi (EF) stand out for colonizing its tissues without causing damage, enhancing both its growth and defense against pathogens. The aim of this study was to characterize the diversity of foliar endophytic fungi associated with *A. araucana* and to assess their antagonistic capacity against phytopathogenic fungi, with a view toward their potential use as biocontrol agents. For this purpose, isolation, purification, and molecular identification of strains obtained from healthy foliar tissue in two sampling sites (Villarrica National Park and Malalcahuello Reserve) were performed, along with dual confrontation assays to determine their biocontrol efficacy. A total of 203 strains were isolated, identifying 29 morphospecies, of which 16 were sequenced through molecular analysis. No significant differences in species diversity were observed between the two sites. Although samples were obtained from asymptomatic leaves, pathogenic fungal species such as *Pewenomyces kalosus* (pehuén canker) were detected, suggesting possible interactions with endophytes capable of limiting infection in the plant. Dual confrontation assays were conducted to evaluate the antagonistic potential of five EF: *Alternaria alternata* (strain 1), *Pholiota* sp. (strain 3), *Sydowia polyspora* (strain 7), *Pseudocamarosporium brabeii* (strain 12), and *Cladosporium ramotenellum* (strain 19) against *Botrytis* sp., *Fusarium* sp., and *Phytophthora* sp. Differences in percentage inhibition of radial growth (PIRG) were recorded, with *Pseudocamarosporium brabeii* (strain 12) showing the highest inhibition of *Botrytis* sp. (34.2%), followed by *A. alternata* (strain 1), which exhibited high inhibitory capacity: 19.6% against *Botrytis* sp. and 18.02% against *Phytophthora* sp. These results support the biotechnological potential of foliar endophytic fungi from *A. araucana* as biocontrol agents, contributing to sustainable strategies for its conservation and phytosanitary protection.

I. Introducción.

Araucaria araucana, conocida también como pehuén, es un árbol emblemático y simbólico de los bosques del sur de Chile y Argentina (Lara et al., 1999; Chávez et al., 2023). Esta especie es importante culturalmente dentro de las comunidades mapuches, y a su vez desempeña un papel crucial en los ecosistemas forestales, debido a que contribuye a la biodiversidad y al equilibrio medioambiental (Lara et al., 1999; Vilches, 2024). *A. araucana* se ve enfrentada a desafíos como el cambio climático y deforestación lo que implica una disminución de su población en ambiente natural (Varas-Myrik et al., 2022).

Uno de los componentes biológicos que interactúan con *A. araucana*, son los hongos endófitos (HE), los que se han convertido en un área de estudio importante dentro de la biotecnología, por brindar efectos positivos en el crecimiento de las plantas (Díaz-Valenzuela et al., 2024). Los hongos endófitos son microorganismos que colonizan el interior de las plantas sin causarles daño aparente, estableciendo relaciones que pueden ofrecer diversos beneficios tanto a las plantas como a los ecosistemas en los que se encuentran (Bastías, 2009, Chávez et al., 2024). Estos hongos pueden desempeñar un papel vital de defensa utilizando mecanismo de mutualismo defensivo, además, le otorga promoción del crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas y solubilización de nutrientes (Bastías, 2009; Díaz-Valenzuela et al., 2024).

Las especies de HE asociados con *A. araucaria* son poco conocidas, lo que implica un amplio campo para seguir explorando sus potenciales biotecnológicos (Díaz-Valenzuela et al., 2024). Mediante estudios realizados previamente por otros investigadores, se descubrió que algunos HE tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, lo que propone investigar si pueden actuar como agentes biocontroladores efectivos contra hongos fitopatógenos que afectan a cultivos agrícolas (Saxena et al., 2024). La identificación y caracterización de estas especies podría abrir nuevas vías para el desarrollo de estrategias sostenibles en la agricultura, reduciendo la dependencia de fungicidas de origen químicos y promoviendo prácticas agrícolas más amigables con el medio ambiente (Fite et al., 2023).

El objetivo de este estudio fue caracterizar la diversidad de hongos endófitos presentes en las hojas de *Araucaria araucana* y evaluar su potencial biotecnológico como agentes de control de hongos fitopatógenos. Para lograr esto, se llevarán a cabo procesos de aislamiento e identificación molecular (Oliveira et al., 2016). A través de esta investigación,

se espera no solo contribuir al conocimiento sobre la microbiota endofítica asociada con *A. araucana*, sino también identificar cepa con propiedades biocontroladoras que puedan ser utilizadas en prácticas agrícolas sostenibles.

II. Marco teórico.

2.1. Características e importancia de la *Araucaria araucana*.

Araucaria araucana, (Pehuén, Monkey puzzle tree) es un árbol emblemático de Chile y Argentina exclusivo de los bosques subantárticos de características lluvioso-templados de Sudamérica (Lara et al., 1999; Cortés et al., 2019). En Chile, se encuentra en la Cordillera de los Andes y en la cordillera de Nahuelbuta (Donoso, 1993), desde la Región del Biobío hasta la vertiente sur del Volcán Villarrica en la Región de los Lagos, en dos zonas delimitadas: la primera en la Cordillera de Nahuelbuta ($37^{\circ}40'$ - $38^{\circ}40'S$) y la segunda ocurre en la Cordillera de Los Andes ($37^{\circ}03'$ - $40^{\circ}03'S$) (Hechenleitner et al., 2005; Puchi et al., 2021) (ver Fig. 1).

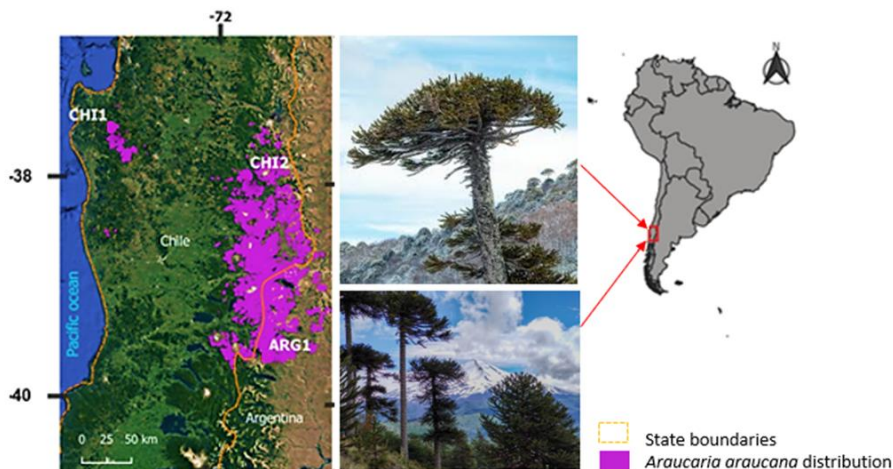


Figura 1. Mapa de distribución de *Araucaria araucana* en la zona de los Andes y Costa de Chile, (Modificado de Puchi et al., 2021).

Esta especie es endémica de los bosques subantárticos y se caracteriza por su longevidad, pudiendo vivir más de mil años (Muñoz et al., 2023). Debido a su importancia cultural para los pueblos originarios y además su relevancia dentro de la biodiversidad, *A. araucana* fue declarada monumento natural en 1990, lo que prohíbe su tala y explotación comercial en todo el territorio chileno (SAG, 2024). La protección de esta especie responde tanto a su valor simbólico para las comunidades indígenas, como el pueblo mapuche-Pewenche, también a su rol en la regulación del ciclo hídrico y la conservación de este árbol dentro de su hábitat (Ipinza, 2018; Sanguinetti et al., 2023). En la protección de *A. araucana*, se han implementado diversas estrategias. El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) ha llevado a cabo actividades de vigilancia fitosanitaria para diagnosticar problemas que afectan a estos

árboles, como la clorosis observada en algunos ejemplares (SAG, 2024). Además, se han establecido planes de restauración que incluyen colectas de semillas y producción de plántulas en viveros para reforestar áreas degradadas, por otro lado, el uso de la biotecnología ha sido relevante con el fin de crear especies resistentes al cambios climáticos y enfermedades (Tondreau, 2024). Estas acciones son fundamentales para asegurar la supervivencia de la especie frente a amenazas como el cambio climático, incendios forestales y especies invasoras (Carrillo, 2018). *Araucaria araucana* se reproduce principalmente a través de sus semillas, conocidas como piñones, que son dispersadas por animales en especial roedores como el ratón colilargo (*Oligoryzomys longicaudatus*), ratón topo cordillerano (*Chelemys macronyx*), rata parda (*Rattus norvegicus*), ratón lanudo (*Abrothrix longipilis*) y aves como la Cotorra Austral o cachaña (*Enicognathus ferrugineus*) entre otros ejemplares a través de su alimentación y defecación (Shepherd & Ditgen, 2012; Speziale et al., 2018). La producción de piñones es variable y depende de factores ambientales, lo que influye en la disponibilidad de alimento tanto para la fauna local como para las prácticas culturales humanas (Shepherd, et al., 2008; Donoso et al., 2009). La dispersión de la especie se realiza por caída de la semilla a gran altura desde el árbol, siendo desplazada ligeramente por el viento, y el ciclo reproductivo desde la formación de los conos femeninos hasta la diseminación de las semillas toma aproximadamente dos años (Sanguinetti & Kitzberger, 2014). Debido a las crecientes amenazas por las que está pasando esta especie, un programa de migración asistida ha sido implementado para salvaguardar su potencial evolutivo ante el cambio climático. Este programa incluye la selección de 450 árboles madre a lo largo de su distribución natural para mantener la estructura genética familiar (Ipinza et al., 2022). La migración asistida permitirá que se exprese la variación genética adaptativa y así proteger esta especie clave para el ecosistema chileno (Ipinza et al., 2018). El programa de migración asistida propuesto y apoyado por asociaciones como CONAF y comunidades Pehuenches, busca la conservación de la especie a través del traslado de semillas, propágulos, individuos juveniles o adultos a otras zonas, con el objetivo de mantener a la especie en áreas climáticas adecuadas, fuera de su distribución natural actual, por lo menos 100 años para que florezcan y produzcan nuevos piñones (Infor, 2021). *Araucaria araucana* es un recurso natural invaluable, su importancia histórica, ecológica y espiritual es reconocida por las comunidades mapuches-pehuenches que consideran al pehuén una especie sagrada

(Sanguinetti & Kitzberger, 2014). Hoy en día tiene una distribución natural limitada y un estado de conservación vulnerable en la cordillera de Los Andes y en Peligro para la Cordillera de la Costa debido a las amenazas por las que está pasando, por ello, es esencial seguir buscando alternativas para garantizar su conservación futura.

2.2. Interacciones microbianas en raíces y acículas de *A. araucana*

Araucaria araucana es un árbol que presenta un sistema radicular y acículas que albergan diversas comunidades de microorganismos, incluidos hongos endófitos y hongos micorrícicos arbusculares (Diehl et al., 2010; Chávez et al., 2023). La raíz principal de *A. araucana* es pivotante, y a su vez, presenta raíces laterales fibrosas no frondosas (Donoso et al., 2008). Las raíces de este árbol son fuertes y extensas, alcanzando hasta 20 metros. En suelos a poca profundidad, las raíces se encuentran más superficiales (Christian T, 2018). Este sistema radicular le proporciona estabilidad al árbol en suelos difíciles, que, a su vez, facilita la absorción de agua y nutrientes esenciales (Molina et al., 2024). Se ha demostrado que ciertos hongos están presentes en las raíces y hojas de *A. Araucana* jugando un papel importante en cuanto a la salud de la especie (Diehl & Fontenla, 2010). Se ha estudiado que algunos hongos pueden lograr potenciar el crecimiento de *A. araucana* bajo condiciones de estrés hídrico y en suelos afectados por incendios forestales (Chávez et al., 2023; Chávez et al., 2024).

Las hojas de *A. araucana* son gruesas y coriáceas, lo que permite resistencia a condiciones climáticas adversas, algunas comunidades microbianas como los hongos endófitos que se encuentran presentes en las hojas pueden inducir mecanismos de defensa en la planta, aumentando su resistencia a patógenos (Shi et al., 2020). Las investigaciones deben ser continuas sobre los microorganismos asociados a las raíces y hojas de *A. araucana*, ya que es esencial para desarrollar estrategias efectivas de conservación y restauración para esta especie protegida y actualmente en peligro (Pulido, 2024).

2.3 Hongos endófitos como componentes esenciales para los ecosistemas

Se le llama hongo endófito a los microorganismos que establecen relaciones simbióticas con las plantas, colonizando sus tejidos sin causar síntomas de enfermedad (Villar, 2024) A esta interacción se le conoce como mutuamente beneficiosa, ya que los hongos obtienen nutrientes y refugio de su planta hospedera, mientras que las plantas reciben metabolitos bioactivos que les confieren ventajas adaptativas frente a patógenos y condiciones ambientales adversas (Raya, 2017; Ipinza et al., 2022). Se han identificado hongos endófitos en una amplia variedad de especies vegetales, incluyendo gramíneas, helechos

y angiospermas, lo que demuestra su amplia distribución en ecosistemas desde los trópicos hasta los climas más fríos (Rodríguez et al., 2009). La gran parte de los hongos endófitos pertenecen al filo taxonómico *Ascomycota*, aunque también se han encontrado representantes en *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Oomycota* (Dezzotti et al., 2012). Este tipo de hongos proporcionan a las plantas hospedadoras mediante diversos mecanismos, la inducción de defensas químicas en la planta y la ocupación del nicho ecológico para prevenir el establecimiento de patógenos (Morelli et al., 2020; Ipinza et al., 2022). Actualmente, el interés por los hongos endófitos ha incrementado debido a su potencial para ser utilizados en biotecnología y medicina (Manganyi & Ateba 2020; Ipinza et al., 2022). Se ha documentado que algunos compuestos derivados de estos hongos poseen propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes, lo que abre nuevas vías para el desarrollo de nuevos fármacos o productos de uso agrícola (El-Sayed et al., 2024). Por lo que los hongos endófitos no solo son un eslabón importante en el bienestar de las plantas, sino que también representan un gran recurso para futuras investigaciones científicas.

Las tablas 1 y 2 muestran los principales usos que se le pueden otorgar a los HE en diferentes áreas y algunos hongos endófitos encontrados en diferentes organismos vegetales con sus respectivos potenciales biotecnológicos:

Tabla 1. Aplicaciones biotecnológicas de hongos endófitos en diferentes áreas.

Área Aplicación	Metabolitos / Acción	Aplicación biotecnológica	Referencias
Farmacéutica / Medicina	Alcaloides, terpenoides	Antibióticos, anticancerígenos	(Tan & Zou, 2001) (Strobel & Daisy, 2003) (Tiwari et al., 2022), (Singh et al., 2023)
Agrícola / Forestal	Fitohormonas, sideróforos	Biofertilizantes, biopesticidas	(Harman et al., 2004) (Xu et al., 2021)
Industrial /Enzimática	Celulasas, lipasas, xilanasas	Biocatálisis, biorremediación	(Kusari et al., 2012) (Bhadra et al., 2022)
Ambiental / Ecológica	Degradación metales y/o contaminantes	Fitorremediación, control medioambiental	(Rusell et al., 2011) (Kusari et al., 2012) (Tiwari et al., 2022)

Tabla 2. Especies de hongos endófitos encontrados en diferentes especies vegetales y sus potenciales biotecnológicos.

Hongo Endófito	Planta hospedera	Actividad	Potencial biotecnológico	Referencia
<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus spp.</i>	Regulación de biosíntesis de taxol.	Investigación en taxol vía efectos endófitos	(Cheng et al., 2022)
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Hedera hélix</i>	Degradación de poliuretano (enzima serina hidrolasa)	Biodegradación de plástico	(Rusell et al., 2011)
<i>Beauveria bassiana</i>	Tomate, maíz	Entomopatógeno natural	Biocontrol de plagas y promotora del crecimiento	(Sinno et al., 2021)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Cítricos, cereales	Producción de fitohormonas	Promoción de crecimiento vegetal	(Hernández et al., 2019)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Eucalyptus spp.</i>	Generación de hidrolizados proteicos	Bioestimulante agrícola	(Li et al., 2014)

2.4 Hongos endófitos en asociación con *A. araucana*

Araucaria araucana es conocida por su capacidad para formar asociaciones con hongos arbusculares y endófitos, lo que le permite adaptarse a condiciones adversas (Ipinza et al., 2022). Investigaciones recientes han demostrado que estas interacciones pueden mejorar la tolerancia de la planta a factores de estrés como sequías e incendios forestales (Ipinza et al., 2022; Chávez et al., 2023). Se ha investigado cómo la inoculación con hongos endófitos puede potenciar el crecimiento y la capacidad de establecimiento de *A. araucana* en suelos afectados por incendios (Pulido, 2024). Los hongos endófitos contribuyen a la salud de las especies vegetales al mejorar su resistencia frente a condiciones desfavorables como sequía y salinidad del suelo, temperaturas extremas, deficiencias nutricionales e invasión de patógenos, favoreciendo la absorción de nutrientes del suelo mediante la producción de fitohormonas y enzimas asociadas a la solubilización de minerales. (Verma et al., 2022; Zhang et al., 2024). *Araucaria araucana* no es la excepción a estos beneficios (Olguin, 2018). La investigación continua sobre estos hongos y es esencial para desarrollar estrategias efectivas de conservación y restauración para esta especie milenaria, asegurando su supervivencia frente a los desafíos ambientales actuales (Chávez et al., 2024).

Los hongos endófitos presentan una infinidad de potenciales biotecnológicos descubiertos y por descubrir, destacando su capacidad para mejorar la nutrición vegetal, estimular el crecimiento y aumentar la tolerancia a estreses bióticos y abióticos. Esto lo logran mediante la producción de metabolitos secundarios que protegen a las plantas frente a patógenos, herbívoros y condiciones ambientales adversas (Sánchez-Fernández & Elvira 2013). El microbioma de *A. araucana* ha sido poco estudiado, lo que ha aumentado el interés por identificar las especies fúngicas que habitan en su entorno (Díaz-Valenzuela et al 2024). Estas especies, que provienen de ambientes extremos y/o cambiantes, podrían ofrecer un gran potencial biotecnológico como observamos en algunos estudios realizados (Alarcón et al., 2020). La tabla 3 muestra algunos ejemplos de hongos endófitos aislados desde *Araucaria araucana*.

Tabla 3. Hongos endófitos descritos en asociación con *Araucaria araucana*

Taxones fúngicos	Función biotecnológica	Referencia
<i>Phialocephala fortinii</i>	Promoción del crecimiento de las plantas, solubilización de fosfatos	(Díaz-Valenzuela et al., 2024)
<i>Umbelopsis dimorpha</i>	Producción del IAA, promoción del crecimiento de las plantas, tolerancia a la sequía	(Chávez et al., 2023) (Díaz-Valenzuela et al., 2024)
<i>Diaporthe araucanorum</i>	Especie nueva, endófito específica <i>A. araucana</i>	(Zapata et al., 2020)
<i>Resinoglea araucana</i>	Hongo asociado a la resina que contribuye a la biodiversidad fúngica	(Balocchi et al., 2023)
<i>Ophiostoma pehueninum</i>	Actividad antimicrobiana, sistema de apareamiento heterotálico	(Zapata et al., 2018)
<i>Penicillium melinii</i>	Solubilización de fosfato, promoción de crecimiento vegetal	(Díaz-Valenzuela et al., 2024)
<i>Preussia cimatomera</i>	Solubilización de fosfato, promoción de crecimiento vegetal	(Díaz-Valenzuela et al., 2024)

2.5 Hongos fitopatógenos que afectan a *Araucaria araucana*

Araucaria araucana, enfrenta diversas amenazas de origen biótico, entre las que destacan los hongos fitopatógenos. Dentro de estos ejemplares, uno de los géneros más relevantes en este contexto son *Pewenomyces* (Balocchi et al., 2022). Las especies más conocidas actualmente de este género son *Pewenomyces kutranfy*, que es un patógeno que produce daño foliar en *A. araucana*, llegando a causarle la muerte a los árboles en menos de un

año (Molina et al., 2024). Por otro lado, está *Pewenomyces kalosus*, descrito recientemente, es el causante del cancro del pehuén, afecta en las ramas y tallos del árbol, provocando lesiones y un aspecto seco o agrietado (Balocchi et al., 2022).

Las enfermedades ocasionadas por patógenos del suelo y follaje pueden destruir los cultivos, generando altos costos de control (Jaramillo, 2014). Los hongos fitopatógenos pertenecientes a los géneros *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. y *Phytophthora* sp., provocan enfermedades severas en una amplia variedad de cultivos agrícolas y forestales (Naimuzzaman et al., 2025), lo que representa una amenaza creciente, motivando la búsqueda de soluciones amigables para su biocontrol (Adeleke et al., 2022).

Botrytis es un género de hongos necrotróficos reconocidos por su capacidad de infectar tejidos senescentes o dañados en condiciones de humedad (Williamson et al., 2007). Entre las afectaciones más importantes que provoca se encuentran la reducción del rendimiento, necrosis del fruto, momificación, quemaduras de las inflorescencias y pudrición del fruto (Gauthier & Wright, 2021). Infectan los cultivos en cualquier estado del desarrollo del fruto y a cualquier parte de la planta, como a los tallos, flores, hojas y frutos (Viteri et al., 2016). Aunque se ha estudiado principalmente en cultivos hortofrutícolas, también puede representar una amenaza para plantas leñosas en ambientes húmedos de montaña, como los que habita *A. araucana*, sobre todo en individuos debilitados (Harman et al., 2004; Dean et al., 2012).

Fusarium es un género capaz de causar enfermedades vasculares identificándose distintas formas especializadas según cultivos mediante colonización del xilema, lo que provoca obstrucción en el transporte hídrico y por lo tanto marchitez o damping off en las plantas (Lamichhane et al., 2017). *Fusarium* ha sido asociado a daños en plántulas, estrés radicular y necrosis en raíces secundarias, pudiendo tener implicancias serias para el reclutamiento natural de *Araucaria araucana* en condiciones adversas (Wen et al., 2022).

Phytophthora pertenece al grupo de los oomicetos y es uno de los patógenos más destructivos a nivel mundial (Roy & Grünwald, 2014). Su ciclo de vida incluye zoosporas móviles en agua, lo que permite una rápida diseminación en ambientes húmedos (Tabilo, 2024).

Estos tres patógenos comparten la capacidad de permanecer en el ambiente, infectando a una amplia gama de hospedero, adaptándose a diferentes condiciones climáticas. Su impacto en *Araucaria araucana* podría ser severo, debido a los diferentes estreses que se

ve sometido en su habidad natural como el cambio climático, incendios forestales y deforestación. Esto resalta la relevancia de investigar los hongos endófitos con posible potencial como agentes de biocontrol, con el fin de proteger nuestras especies nativas frente a patógenos agresivos

III Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis.

La comunidad de hongos endófitos foliares asociada a *Araucaria araucana* incluye especies con propiedades biotecnológicas, particularmente con capacidad de inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos, lo que sugiere un potencial uso en estrategias de biocontrol.

3.2 Objetivo general.

Caracterizar la diversidad de hongos endófitos presentes en las hojas de *Araucaria araucana* y evaluar su potencial biotecnológico como agentes de control de hongos fitopatógenos.

3.2.1 Objetivos específicos.

1. Aislar y purificar hongos endófitos a partir del tejido foliar sano de individuos de *Araucaria araucana* colectado en dos sitios de su hábitat natural en la cordillera de Los Andes.
2. Identificar los hongos endófitos aislados mediante técnicas moleculares, incluyendo PCR y análisis de secuencias.
3. Estudiar la diversidad de los hongos endófitos aislados desde *Araucaria araucana* y compararlo entre los dos sitios.
4. Evaluar la actividad antagonista de los hongos endófitos frente a hongos fitopatógenos, como indicador de su potencial uso en biocontrol.

IV Metodología

4.1 Área de estudio

El estudio se centró en bosques prístinos de *A. araucana* en la Reserva Nacional Malalcahuello (Malal) y Parque Nacional Villarrica (Villa), ubicados en la Región de La Araucanía, sur de Chile, específicamente en la comuna de Curacautín, provincia de Malleco y Villarrica provincia de Cautín. Su ubicación geográfica se centra aproximadamente en las coordenadas: 38°25'S, 71°34'O y 39°25'S, 71°57'O, respectivamente. “Villa” abarca parte de las regiones de La Araucanía y Los Ríos. Este parque cubre territorio en las comunas de Pucón, Curarrehue y Villarrica (en La Araucanía) y Panguipulli (en Los Ríos). Su extensión abarca unas 63.000 hectáreas, y está dominado por el volcán Villarrica, uno de los volcanes más activos de Sudamérica. En “Malal”, el clima consiste en veranos frescos con temperaturas promedio entre 12°C y 18°C e inviernos fríos, con temperaturas que oscilan entre 0°C y 5°C, y posibilidad de nevadas frecuentes. Por otro lado, Villa tiene un clima de tipo templado frío con influencia andina donde los veranos son frescos, con temperaturas promedio entre 12°C y 18°C, con temperaturas que pueden oscilar entre -2°C y 7°C, con presencia de nevadas en las zonas más altas (Hechenleitner et al., 2005).

4.2 Muestreo de hojas de *A. araucana*

Se realizaron colectas de pequeñas ramas que contienen las hojas de *Araucaria* en Malal y Villa (Fig. 2). Se recogieron muestras de tres subáreas por sitio. En cada punto se eligieron de 3 a 7 individuos de *Araucaria* (dependiendo si las condiciones geográficas y climáticas lo permitían), de los que se seleccionaron puntas de ramas sanas (sin signos de daños), las que fueron almacenadas en cooler y trasladadas rápidamente (menos de 24h) al Laboratorio de Investigación en Micorrizas y Aplicaciones Biotecnológica de Hongos (LIMAB), de la Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles. Se obtuvieron 27

muestras de ramas por recolección de todas las subzonas. Las muestras se procesaron en un plazo máximo de 24 horas desde su colecta.



Figura 2. Muestreo de material vegetal. a) Colecta de muestras en sectores nevados; b) Material vegetal en laboratorio; c) Procesamiento de muestras y registro de datos.

4.3 Aislamiento de hongos endofíticos

En el laboratorio, las hojas de *Araucaria* recolectadas se lavaron primero cuidadosamente con agua corriente y jabón común. A continuación, se cortan discos de hojas (de 6 mm de diámetro) de todas las partes de las hojas seleccionadas al azar. Los discos se desinfectaron con etanol al 70 % durante 1 minuto y con hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 % durante 2,5 minutos. Por último, se lavaron nuevamente con alcohol al 70 % durante 30s para eliminar el exceso de hipoclorito. Para completar el proceso desinfección, el material se enjuagó tres veces con agua destilada esterilizada previamente (Araújo et al. 2002).

Bajo condiciones de asepsia dentro de la cámara de flujo laminar, se transfirieron seis discos de hoja a cada una de las placas Petri (triplicado) que contenían agar extracto de malta 1% (EMA) suplementadas con cloranfenicol (50 mg L^{-1}) (Fig. 3), se incubaron en estufa de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y se observaron diariamente durante 15 días para registrar el desarrollo de colonias fúngicas de cada muestra. Como control aséptico, 50 μl del agua de enjuague final se sembraron en EMA como prueba de la desinfección de la superficie (Pereira et al. 1993). Los aislados se agruparon primero en morfotipo basándose en las características macro-morfológicas de las cepas, las que posteriormente se confirmaron mediante secuenciación del ADN.

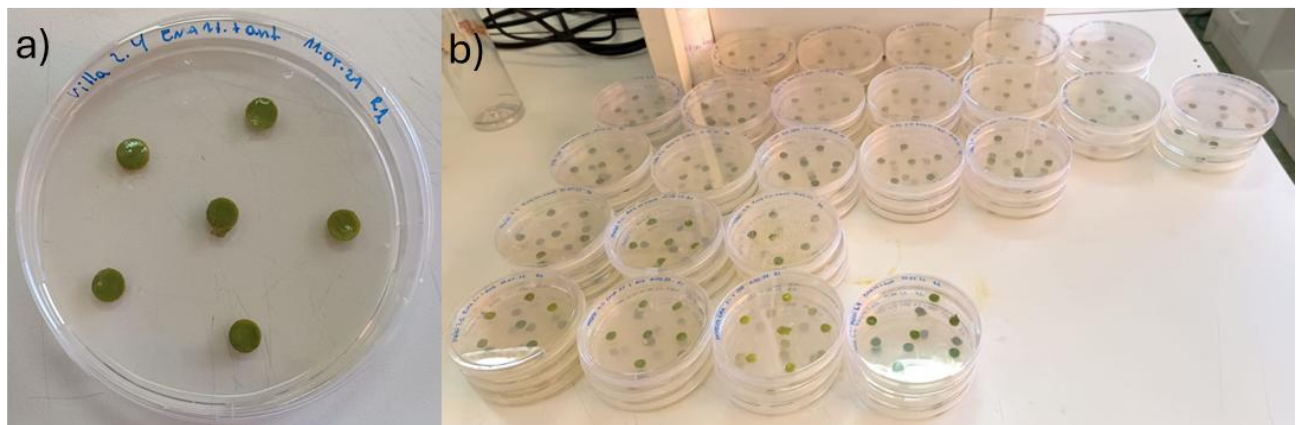


Figura 3. Discos de hojas de *Araucaria araucana* en medio EMA.

4.4 Purificación de hongos endofíticos y medición de crecimiento

La biomasa fúngica obtenida a partir de los cultivos desarrollados en medio EMA, tras 7 días de incubación a 28 °C, fue nuevamente aislada mediante la selección de colonias individuales provenientes de cada disco. Esta selección se realizó en base a características morfológicas distintivas, como el color, la textura y el patrón de crecimiento. Las colonias seleccionadas fueron transferidas a nuevas placas estériles bajo condiciones de asepsia, utilizando material de inoculación previamente esterilizado. Se repitió este procedimiento varias veces para eliminar contaminantes que surgieron en el periodo de incubación, con el fin de dejarlas completamente puras, evaluando cada una de las placas por inspección visual, seleccionando solo aquellas que se observaron diferentes unas de otras. Finalmente, se midió con regla graduada la velocidad media de crecimiento radial de los hongos en las placas Petri durante 15 días complementando el análisis con la aplicación de una regresión lineal en el mismo período. (Fig. 4).



Figura 4. a) Cultivo Puro de hongo endófito aislado de hojas de Araucaria; b) Medición de velocidad media de crecimiento radial de HE purificados.

4.5 Extracción, amplificación y secuenciación del ADNr

La biomasa fúngica purificada obtenida a partir de cultivos crecidos en EMA, fue utilizada para la extracción de ADN utilizando el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) basado en el protocolo descrito por Oliveira et al. (2016). Para ello, se dejaron tubos eppendorf estériles con 5 discos de 5 mm de micelio de cada muestra en el congelador por 12 a 24 horas, al día siguiente se molió el material genético con ayuda de un vortex, hasta obtener un polvo. Se añadieron a cada tubo 800 μ L de buffer CTAB 2% (1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA, 1% polivinilpirrolidona) y se pusieron en la centrifuga con velocidad 5,5 m/s por 40 segundos. Posterior a eso, se puso a incubar en baño maría por 40 minutos a 60°C. Transcurrido ese tiempo, los tubos en centrifugaron a 13.000 rpm por 10 minutos y se transfirió cuidadosamente el sobrenadante con ayuda de una micropipeta a un nuevo tubo eppendorf. En esta etapa se trabajó con la fase acuosa previamente retirada. A cada muestra se le añadió un volumen de 300 μ L, equivalente al volumen presente en el tubo que contenía cloroformo. Posteriormente, las muestras se agitaron en vórtex durante algunos segundos, hasta obtener una solución con apariencia lechosa. Cada tubo fue colocado en la centrifuga y procesado a 13.000 rpm durante 10 minutos. Finalizada la centrifugación, se descartó cuidadosamente la fase acuosa, conservando únicamente la interfase. A esta interfase se le añadieron 600 μ L de isopropanol frío (-20 °C). Las muestras se congelaron durante 30 minutos y, posteriormente, fueron centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos. En esta etapa se formó un pellet, que fue recuperado para continuar con el protocolo.

El sobrenadante fue descartado, y el pellet se lavó con 1 mL de etanol al 70 %. Luego, los pellets fueron dejados en la estufa hasta que se evaporó completamente el etanol. Finalmente, una vez secos, se resuspendieron en 50 µL de agua libre de nucleasas y se almacenaron en refrigeración durante 24 horas. Para amplificar la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS) del ADNr nuclear, se utilizó los partidores ITS1/ITS4 (White et al. 1990), siguiendo el protocolo de PCR descrito por Oliveira et al. (2014). En total se obtuvieron 17 productos de PCR de entre 500 y 600 pb, con concentraciones principalmente de 80 ng/µL y algunas muestras de menor concentración 30 ng/µL los cuales fueron enviados a Austral Omics, de la Universidad Austral de Chile para su secuenciación. Algunas extracciones presentaron fallas en la amplificación, a pesar de contar con ADN de buena calidad e intentarlo varias veces, las secuencias obtenidas mostraron cromatogramas deficientes, lo que limitó la identificación a nivel de género y/o especie. Las secuencias obtenidas fueron observadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) y se compararon por porcentaje de identidad, con secuencias homólogas de varios taxones de hongos (por BLASTn) ya depositadas en el NCBI.

4.6 Estudio de la diversidad de hongos endófitos asociados con Araucaria

La abundancia de hongos endófitos se determinó contando el número total de especies de los diferentes aislados, y la riqueza de especies será el número de especies de hongos endófitos observadas en cada sitio. La diversidad se estimó utilizando los siguientes índices:

1. Shannon-Wiener (H') = $-\sum p_i \times \ln p_i$, donde $\sum$ es la suma de p_i (abundancia relativa de cada especie, p_i = número de repeticiones del endófito i dividido por la abundancia total de endófitos) y $\ln$ es el logaritmo natural (Moreno 2001).
2. Índice de diversidad de Simpson ($1-D$) = $1/\sum p_i^2$, donde p_i es la abundancia proporcional de cada especie (Moreno 2001).
3. Índice de Margalef (I) = $(s-1) / \ln N$, donde I es el índice de biodiversidad, s es el número de especies presentes y N es el número total de individuos encontrados (pertenecientes a todas las especies) (Moreno 2001).

Las comparaciones de la composición de los hongos endófitos entre sitios fueron realizadas utilizando el índice de similitud de Bray-Curtis, que indica el reemplazo de especies entre comunidades y considera la abundancia relativa de las especies (Moreno 2001).

4.7 Actividad antagónica de hongos endófitos sobre hongos fitopatógenos

La técnica de cultivos duales se empleó para determinar la actividad antagónica de los diferentes aislamientos de hongos endófitos sobre *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. y *Phytophthora* sp. Se utilizó un diseño completamente aleatorio, con tres repeticiones. Los ensayos se realizaron evaluando los cultivos duales de cinco hongos endófitos seleccionados por literatura, contrapuestos con los tres fitopatógenos mencionado anteriormente. En la prueba de cultivos duales se utilizó placas Petri con PDA libre de antibióticos, se depositó en un extremo un disco de 5 mm de diámetro con micelio activo del fitopatógeno (previamente crecido en PDA por cinco días) y en el extremo equidistante se colocó un disco de micelio de los endófitos seleccionados (previamente crecido en PDA por cinco días) de 5 mm de diámetro, las cajas Petri se incubaron a 28 ± 1 °C y se observaron diariamente para registrar el número de días al primer contacto entre el antagonista y el fitopatógeno, se midió el crecimiento de ambas colonias (cm) y se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial radial, basándose en la fórmula propuesta por Ezziyyani et al. (2007), calculando de la siguiente manera:

$$\text{PICR}\% = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Donde: PICR= porcentaje de inhibición de crecimiento radial; R1= crecimiento radial (mm) del patógeno sin el endófito; R2= crecimiento radial (mm) del patógeno con el endófito.

4.8 Análisis estadístico

La significación del dendrograma de similitud se determinó mediante ANOSIM (análisis de similitud) para comparar la composición de especies de hongos endófitos entre sitios. La agrupación jerárquica se llevó a cabo utilizando la abundancia relativa de los hongos

endófitos asociados con *A. araucana* en los diferentes sitios de estudio. Se utilizó un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) para visualizar la separación de las comunidades de hongos endófitos en los diferentes sitios (Villa y Malal), utilizando el programa de acceso gratuito Past 4.10. Para los datos de velocidad de crecimiento, se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones. Los datos obtenidos para cada uno de los ensayos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$). Dichos datos se analizaron con el paquete estadístico Statistica 10, 2012).

V. Resultados

5.1. Composición de endófitos fúngicos

En total se analizaron 486 discos foliares de *A. araucana* de los cuales 180 provenían de la Reserva Nacional Malalcahuello y 306 del Parque Nacional Villarrica. A partir de estos, se obtuvieron 203 ejemplares de endófitos fúngicos, muchos de ellos morfológicamente similares entre sí, identificándose 97 aislados de endófitos en los sitios de Malal y Villa (Figura 5a), con una frecuencia de aislamiento del 41,77% para ambos sitios. Del total aislado se identificaron 29 morfoespecies. De las 29 morfoespecies, se lograron secuenciar 16 cepas (Fig. 5b), 11 correspondiente al sitio de Villarrica, y 5 al sitio Malalcahuello, dentro de estas últimas 1 fue clasificadas como hongo endófito de acuerdo con secuencia consenso. El resto de los aislados (n=13) no pudo ser identificado.

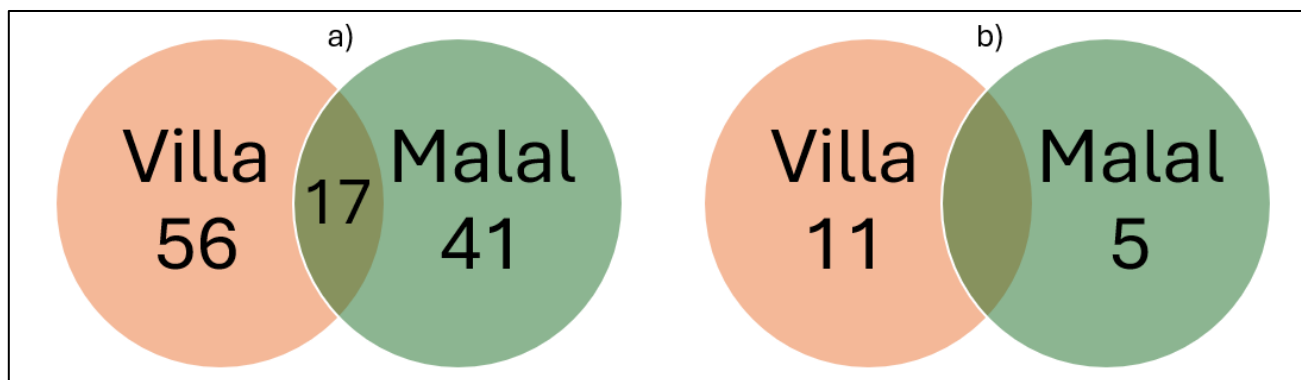


Figura 5. a) Diagrama de Venn que representa el número de cepas identificadas en Villarrica y Malalcahuello, incluyendo (17) que se encuentran presentes en ambos sitios. b) Diagrama de Venn de las cepas secuenciadas (n= 16).

5.2. Identificación de especies

La identificación de las especies se obtuvo por secuenciación molecular a través del programa BLASTn de la plataforma NCBI <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Tabla 4), en donde se puede apreciar sus porcentajes de confianza para cada especie, órdenes y números de acceso para las especies.

Tabla 4. Identificación de cantidad de especies obtenidas por sitio de muestreo.

Cepa	% Id	Cobertura (%)	E-value	Blast Match (N° Acceso GenBank)	Especie/Género	Orden	Sitio	
							Villa	Malal
1	100	100	0.0	ATCC34957	<i>Alternaria alternata</i>	Coryneliales		
2	100	100	0.0	OM937772	<i>Pewenomyces kalosus</i>	Coryneliales		
3	99,7	98	0.0	KC589021	<i>Pholiota</i> sp.	Agaricales		
4	99,5	100	0.0	OR800200	<i>Nigrospora</i> sp.	Amphisphaeriales		
5					DESCONOCIDO 1*			
6	99,7	73	0.0	FR846476	<i>Phoma</i> sp.	Pleosporales		
7	93	93	9e-175	TXID64499	<i>Sydowia polyspora</i>	Dothideales		
8					DESCONOCIDO 2*			
9	98,4	100	0.0	PP523940	<i>Coniochaeta</i> sp.	Coniochaetales		
10	100	100	0.0	KY643763	<i>Cladosporium</i> sp.	Capnodiales		
11					DESCONOCIDO 3*			
12	100	100	0.0	MG098280	<i>Pseudocamarosporium brabeji</i>	Pleosporales		
13					DESCONOCIDO 4*			
14					DESCONOCIDO 5*			
15					DESCONOCIDO 6*			
16					DESCONOCIDO 7*			
17	100	100	0.0	MZ493102	<i>Chromelosporium</i> sp.	Pezizales		
18					DESCONOCIDO 8*			
19	99,3	95	0.0	TXID470174	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	Capnodiales		
20					DESCONOCIDO 9*			
21					DESCONOCIDO 10*			
22	99,6	99	0.0	TXID3294362	<i>Preussia apgarae</i>	Pleosporales		
23	100	100	0.0	TXID1354946	<i>Penicillium</i> sp.	Eurotiales		
24					DESCONOCIDO 11*			
25					DESCONOCIDO 12*			
26	100	100	0.0	TXID1970644	<i>Cladosporium subcinereum</i>	Capnodiales		
27					DESCONOCIDO 13*			
28	100	100	0.0	TXID1338630	<i>Cladosporium allicinum</i>	Capnodiales		
29	99,8	99	0.0	MF976766	<i>Fungal endophyte 1</i>			

*DESCONOCIDO 1-13: No fue posible su identificación molecular.

 Identificado en ambos sitios

5.3 Velocidad media de crecimiento radial de hongos endófitos secuenciados e identificados.

La velocidad media de crecimiento radial de los hongos endófitos aislados del área foliar de *Araucaria araucana*, mostraron una amplia variabilidad, presentando velocidades de 0,39 a 3,6 mm/día. El género *Nigrospora* sp. (cepa 4), presentó la mayor velocidad media de crecimiento radial siendo estas diferencias significativas con todas las demás cepas, seguido de *Phoma* sp. y *Sydowia polyspora*, presentando los crecimientos más rápidos durante los 15 días que duraron las mediciones. Mientras otros aislados como *Chromelosporium* sp. (cepa 17) y *Fungal endophyte 1* (cepa 29), mostraron un crecimiento más lento, evidenciando una alta diversidad funcional entre los endófitos aislados (Tabla 5; Figura 6).

Tabla 5. Velocidad media de crecimiento radial de las especies identificadas molecularmente.

N° Cepa	Nombre especie o género	Velocidad media crecimiento radial (mm/día) *		Desviación estándar	
1	<i>Alternaria alternata</i>	1,61	±	0.32	bc
2	<i>Pewenomyces kalosus</i>	1,41	±	0.10	bc
3	<i>Pholiota</i> sp	1,33	±	0.21	bc
4	<i>Nigrospora</i> sp	3,60	±	0.24	a
6	<i>Phoma</i> sp.	2,05	±	0.21	b
7	<i>Sydowia polyspora</i>	1,91	±	0.17	b
9	<i>Coniochaeta</i> sp.	0,85	±	0.07	bc
10	<i>Cladosporium</i> sp	1,18	±	0.09	bc
12	<i>Pseudocamarosporium brabeji</i>	1,75	±	0.17	bc
17	<i>Chromelosporium</i> sp.	0,42	±	0.12	c
19	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	0,72	±	0.01	bc
22	<i>Preussia apgarae</i>	1,19	±	0.09	bc
23	<i>Penicillium</i> sp.	0,75	±	0.13	bc
26	<i>Uncultured Davidiella</i>	1,05	±	0.04	bc
28	<i>Cladosporium allicinum</i>	0,74	±	0.05	bc
29	<i>Fungal endophyte 1</i>	0,39	±	0.02	bc

*Valores promedio corresponden a (n=3) ± su desviación estándar.

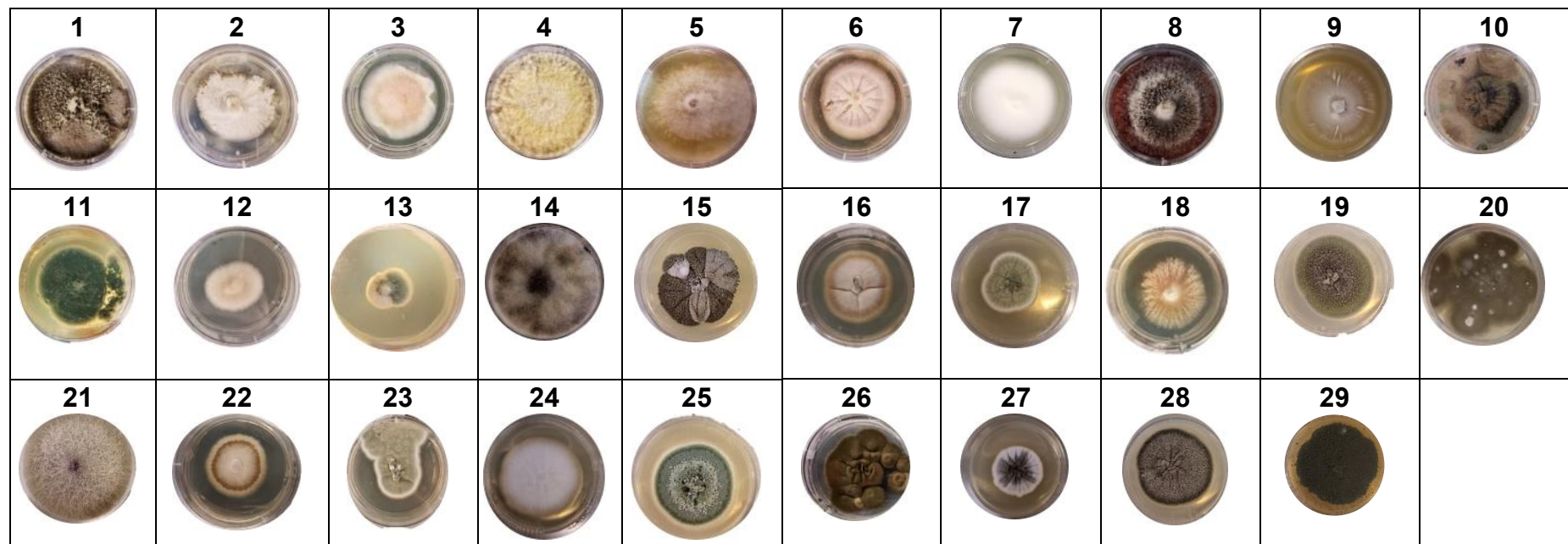


Figura 6. Cepas de hongos endófitos aislados desde el área foliar de *Araucaria araucana* (ver tabla 4).

5.4. Análisis filogenético de las especies secuenciadas.

Las relaciones evolutivas entre los hongos endófitos aislados desde las hojas de *Araucaria araucana*, se basaron en un árbol filogenético, que se construyó a partir de las secuencias de ADN ribosomal obtenidas en la secuenciación. El análisis se realizó con interferencia bayesiana, usando valores de probabilidad posteriores para evaluar el grado de confianza estadística que tiene determinado clado (Figura 7). Este análisis respalda la diversidad genética presente en el área foliar de *A. araucaria* y proporciona una base para estudios funcionales posteriores.

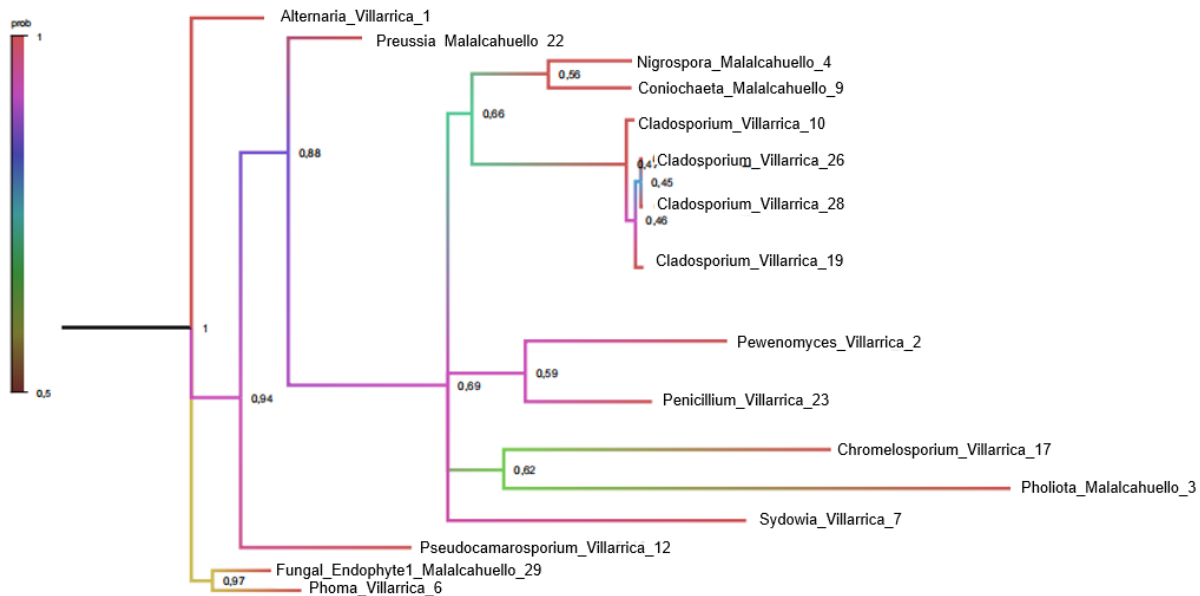


Figura 7. Árbol filogenético de especies a nivel de género aisladas de *Araucaria araucana*. Representa las relaciones evolutivas de 16 cepas identificadas a través de secuenciación, se usaron valores porcentuales en los nodos, que indican los niveles de confianza de cada agrupación de especies.

Las especies del género *Cladosporium*: *Cladosporium* sp. (10), *Cladosporium ramotenellum* (19), *Cladosporium subcinereus* (26) y *Cladosporium allicinum* (28) forman un clado bien definido, con alto porcentaje de confianza (>90%), lo que confirma su estrecha relación filogenética. Las cepas *Penicillium* sp. (23) y *Pewenomyces kalosus* (2) se agruparon dentro de ramas que indican una alta relación entre ellas, en comparación a *Pseudocamarosporium brabeji* (12) que se agrupan en una rama distinta entre las cepas mencionadas, evidenciando una mayor distancia evolutiva entre ellas. Dentro del árbol podemos apreciar géneros diversos como *Pholiota* sp. (3), *Nigrospora* sp. (4), *Coniochaeta* sp. (9), y *Chromelosporium* sp. (17) lo que da cuenta de la diversidad de hongos endófitos

asociados a la especie arbórea *Araucaria araucana*. Es importante recalcar que las longitudes de las ramas representan el grado de divergencia genética. Este análisis muestra los agrupamientos respecto a los órdenes taxonómicos descritos en literatura, por lo que otorga validez a los resultados obtenidos. Asimismo, se detectaron secuencias no identificadas que podrían corresponder a especies aún no descritas.

5.5 Variación en la diversidad de hongos endofíticos

La abundancia de especies endofíticas en el Parque Nacional Villarrica fue de 0,57 (correspondiente a 57 % de los hongos endófitos), en la Reserva Nacional Malalcahuello fue de aproximadamente 0,42 (correspondiente a un 42.2% del total de los hongos endófitos). Por lo tanto, en el Parque Nacional Villarrica se presentó numéricamente una mayor diversidad en comparación a la Reserva Nacional Malalcahuello.

5.6 Taxones más abundantes

El taxón más abundante fue el género *Cladosporium*, el cual se detectó en muestras tanto del sitio Villarrica como de Malalcahuello. Este género estuvo representado por las especies *Cladosporium ramotenellum* (cepa 19), *Cladosporium subcinerum* (26) y *Cladosporium allicinum* (cepa 28), además de una cepa identificada únicamente como *Cladosporium* sp. (cepa 10). Otra especie relevante fue *Pewenomyces kalosus* (cepa 2) que se identificó solo en el sitio de Villarrica.

5.7 Diversidad alfa y número efectivo de especies medido en índices

Los índices de diversidad alfa calculados para las comunidades evaluadas en Villa y Malal revelan ciertas diferencias en la riqueza y diversidad, aunque ninguna de ellas resultó estadísticamente significativa (valor $p > 0.05$) (ver tabla 6). Villa presentó una mayor riqueza taxonómica (Taxa S = 26) en comparación con Malal (S = 20), lo cual se traduce también en valores superiores para los índices de diversidad.

Tabla 6. Índices de diversidad alfa comparados entre sitios.

	Villarrica (Villa)	Malalcahuello (Malal)	Valor p
Taxa S	26	20	0.151
Individual	56	41	
Shannon H	3,08	2,82	0.141
Simpson indx	0,94	0,93	0.287
Margalef	6,2	5,1	0.107

El índice de Shannon (H') fue de 3,08 en Villa y 2,82 en Malal ($p = 0.141$), lo que sugiere una mayor diversidad general en Villa, aunque esta diferencia no fue significativa. De igual forma, el índice de Simpson, que refleja la dominancia de especies, fue muy similar en ambas localidades (0,94 en Villa y 0,93 en Malal; $p = 0.287$), indicando una distribución equitativa de las abundancias en ambas comunidades. En cuanto al índice de Margalef, que se enfoca en la riqueza específica ajustada por el número de individuos, Villa también mostró un valor mayor (6,2 frente a 5,1), con una diferencia marginal ($p = 0.107$), aunque no significativa. En conjunto, estos resultados sugieren que, si bien Villa tiende a albergar una comunidad ligeramente más diversa y rica en especies en comparación con Malal, estas diferencias no alcanzan significancia estadística.

Con relación a las curvas de rarefacción entre Villa y Malal (Figura 8 a y b), inicialmente se sobrelapan, lo que sugiere que ningún sitio es más diverso que el otro. Sin embargo, se observa que, a nivel superior a igualdad de número de especímenes, Villa presentó un mayor número esperado de morfotipos, con intervalos de confianza no solapados en los tramos superiores, lo que sugiere una mayor diversidad fúngica. Además, mientras que la curva de Malal tiende a estabilizarse, la de Villa continúa en ascenso, indicando la posible existencia de especies aún no detectadas en este último.

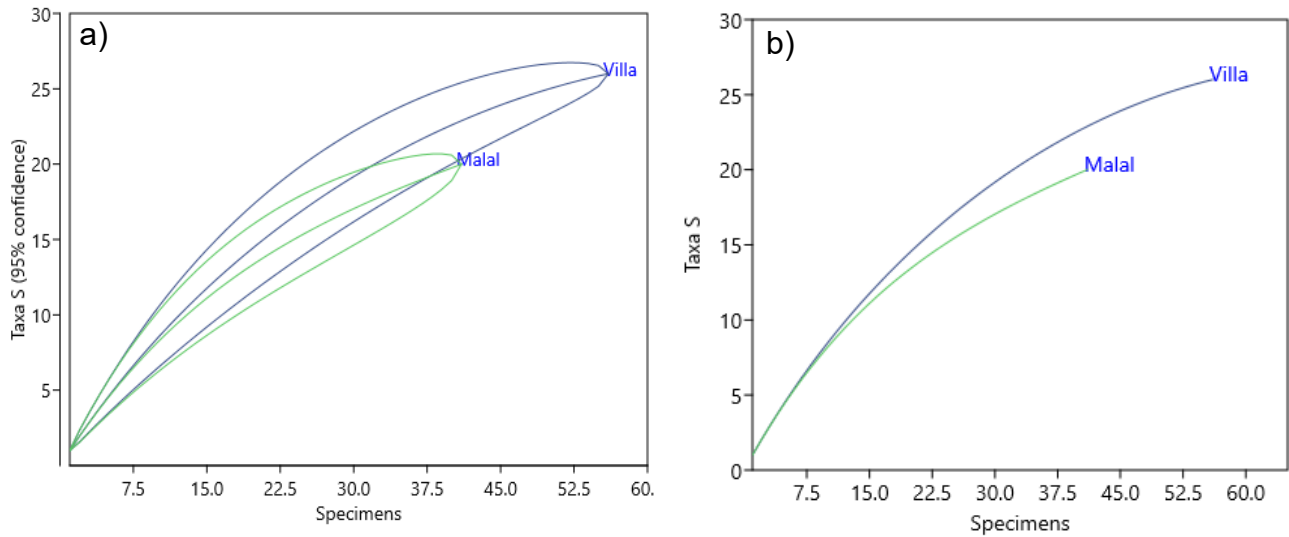


Figura 8. a) Curva de rarefacción por número de especies observadas (agrupado); b) individual por sitio.

Se evaluó la estructura de la comunidad fúngica mediante análisis de agrupamiento jerárquico (clustering) y ordenación no métrica multidimensional (nMDS), ambos basados en el índice de similitud de Bray-Curtis y realizados con el software PAST. El dendrograma (Figura 9a) revela una tendencia a la agrupación de las muestras según su sitio de origen (Villarica en naranja y Malalcahuello en verde). Por otra parte, el análisis nMDS (Figura 9b), con un valor de stress menor a 0.2, mostró una disposición espacial coherente con el agrupamiento jerárquico. Aunque se evidencia una ligera segregación entre las muestras de Villarica y Malalcahuello, las áreas convexas delimitadas alrededor de los puntos indican traslapes entre los centroides de ambos grupos, reflejando similitudes compartidas en la composición fúngica. Para cuantificar estadísticamente las diferencias en la composición comunitaria entre los dos sitios, se aplicó un ANOSIM (Análisis de similitud), que arrojó un valor $p = 0.52$, indicando que no existen diferencias significativas en la estructura de las comunidades de hongos entre Villarica y Malalcahuello.

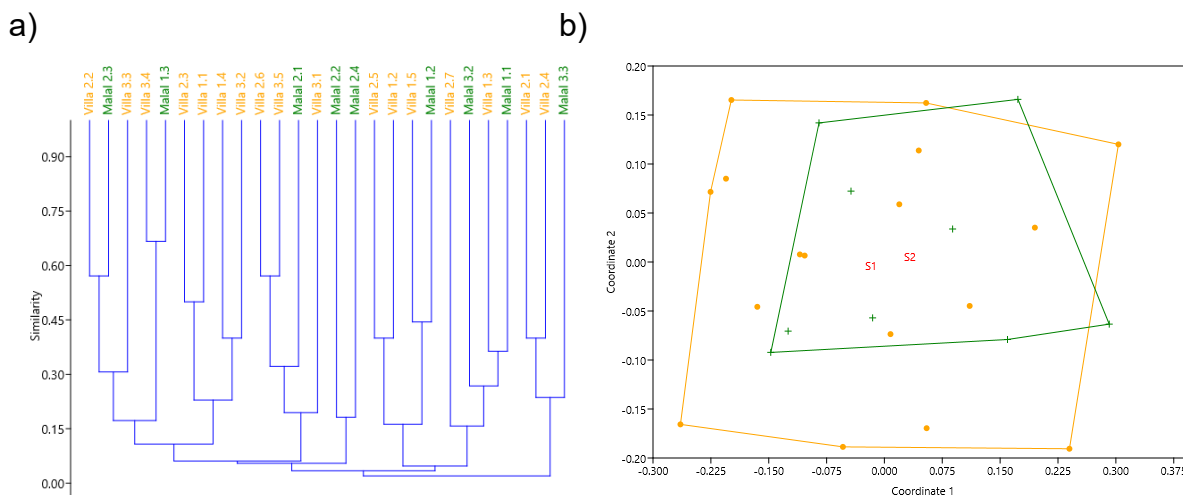


Figura 9. a) Agrupamiento jerárquico de muestras basado en la abundancia relativa de hongos endófitos aislados de hojas de *Araucaria araucana* en diferentes sitios de estudio. b) Análisis no paramétrico nMDS.

5.8 Evaluación de la actividad antagonica de hongos endófitos frente a fitopatógenos

Los ensayos de confrontación dual permitieron evaluar la actividad antagonica de cinco aislamientos de hongos endófitos identificados en *Araucaria araucana*: *Alternaria alternata* (1), *Pholiota* sp. (3), *Sydowia polyspora* (7), *Pseudocamarosporium brabeii* (12) y *Cladosporium ramotenellum* (19), frente a los fitopatógenos *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. y *Phytophthora* sp. Durante el período de incubación a 22 ± 1 °C, se observaron interacciones variables, con distintos niveles de inhibición según el tiempo y la combinación micelial. De acuerdo con los valores promedio del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), el aislamiento de *Pseudocamarosporium brabeii* (cepa 12) fue la que obtuvo los mejores resultados antagonicos, alcanzando un PICR promedio de 34,2%, frente a *Botrytis* sp., con una interacción micelial de tipo antibiosis con halo evidente. Seguido de *Alternaria alternata* (cepa 1) con 19,6 y 18,02% frente a *Botrytis* sp. y *Phytophthora* sp., respectivamente, con presencia de barrera de contacto y halos parciales visibles (Tabla 7) (Figura 10). Por otra parte, no se observó inhibición de crecimiento para *Fusarium* con *Alternaria alternata*; *Pseudocamarosporium brabeii* y *Cladosporium ramotenellum*, evidenciando contacto sin inhibición. Este último tampoco presentó actividad frente a *Botrytis* sp. y *Phytophthora* sp, con únicamente crecimiento paralelo sin interacción inhibitoria.

Tabla 7. PICR% de la actividad antagónica de hongos endófitos aislados de *Araucaria araucana*.

N° cepa	Nombre especie o género	Patógeno	PICR% (Promedio n=2)
1	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Botrytis</i> sp.	19.6
		<i>Fusarium</i> sp.	0
		<i>Phytophthora</i> sp.	18.02
3	<i>Pholiota</i> sp	<i>Botrytis</i> sp.	4.99
		<i>Fusarium</i> sp.	17.75
		<i>Phytophthora</i> sp.	8.75
7	<i>Sydowia polyspora</i>	<i>Botrytis</i> sp.	1.6
		<i>Fusarium</i> sp.	13.05
		<i>Phytophthora</i> sp.	6.55
12	<i>Pseudocamarosporium brabeii</i>	<i>Botrytis</i> sp.	34.2
		<i>Fusarium</i> sp.	0
		<i>Phytophthora</i> sp.	7.15
19	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	<i>Botrytis</i> sp.	0
		<i>Fusarium</i> sp.	0
		<i>Phytophthora</i> sp.	0

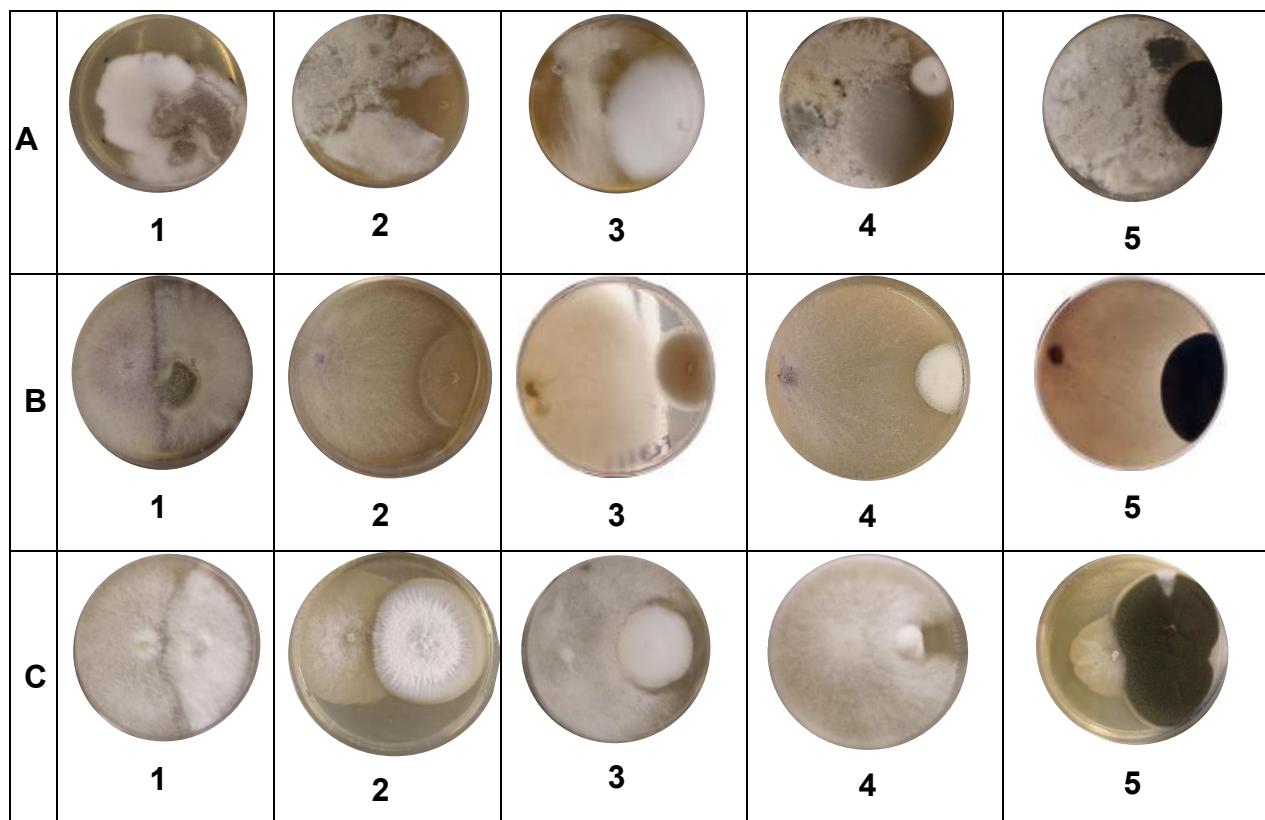


Figura 10. Evaluación antagónica entre hongos endófitos y hongos fitopatógenos. A) *Botrytis* sp. (izquierda); B) *Fusarium* sp. (izquierda) y C) *Phytophthora* sp. (izquierda). Derecha hongos endófitos aislados de *Araucaria araucana*. Las cepas que fueron evaluadas en el correspondiente orden; 1. *Alternaria alternata* (cepa 1), 2. *Pholiota* sp. (cepa 3), 3. *Sydowia polyspora* (cepa 7), 4. *Pseudocamarosporium brabeii* (cepa 12) y 5. *Cladosporium ramotenellum* (cepa 19). Los ensayos fueron medidos durante 14 días.

VI. Discusión

Este estudio tuvo como objetivo caracterizar la diversidad de hongos endófitos presentes en las hojas de *Araucaria araucana* y evaluar su potencial biotecnológico como agentes de control de hongos fitopatógenos. Para ello, se trabajó en dos sitios cordilleranos (Villa y Malal), donde se identificaron las especies presentes en cada sitio y se realizó un análisis de diversidad para comparar las poblaciones. Se observaron ciertas limitaciones metodológicas en la identificación molecular de las cepas, sobre todo posterior a la secuenciación donde algunas cepas no lograron ser identificadas a nivel de especie (solo 16 de 29). Se atribuyó a que probablemente era una incompatibilidad de los primers utilizados durante la amplificación de ADN. Se utilizaron los primers universales en la metodología (ITS1-ITS4) pero se ha reportado en trabajos anteriores que no se logran amplificar algunos grupos filogenéticamente divergentes. (Hibbett et al., 2016) menciona que la identificación con el uso exclusivo de ITS puede inducir a error, especialmente en ambientes con alta diversidad como lo que ocurre en bosques nativos. Se reconoce los marcadores ITS como uno de los más utilizados para identificación fúngica debido a su alta variabilidad y capacidad de resolución taxonómica, pero existen sesgos de amplificación que no puede cubrir completamente, por lo que afecta a la asignación taxonómica y representa un error (Tedersoo et al., 2018). Algunos autores recomiendan el uso de primers RPB1, RPB2 utilizados en dos fragmentos superpuestos (pares 5f2 × 7cr y 7cf × 11ar) los que ofrecen una amplificación fiable y una mejor resolución taxonómica en comparación a ITS, por lo que sería una alternativa para continuar con futuras investigaciones de las cepas no identificadas (O'Donnell et al., 2022). Además, secuencias analizadas pudiesen corresponder a especies aún no descritas lo que sugiere un reservorio fúngico inexplorado en esta especie arbórea endémica.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de agrupamiento jerárquico con índice de similitud Bray-Curtis, mostraron patrones similares entre las comunidades fúngicas endófitas aisladas de *Araucaria araucana* de localidades de Villa y Malal. Respecto a la separación observada en el dendrograma, sugiere que pueden existir variables ambientales locales que ejercen influencia sobre la diversidad de los hongos. La separación puede estar relacionada con diferencias edáficas o climáticas, las que han sido reconocidas como moduladores en la estructura de comunidades endófitas (Rodríguez et al., 2009).

La mayor similitud entre las cepas encontradas en Malalcahuello indica una mayor homogeneidad en sus comunidades fúngicas, lo que puede ser reflejo de condiciones más estables o menos heterogéneas dentro del sitio. Por otro lado, la dispersión observada en Villarrica podría deberse a una mayor variabilidad microambiental, lo que favorecería el establecimiento de una comunidad más diversa (Kembel & Mueller, 2014). En este contexto, un modelamiento de nicho ecológico podría ayudar a corroborar o descartar influencia de condiciones ambientales sobre la composición de las comunidades endofíticas encontradas. Complementariamente, los índices de diversidad alfa revelaron una tendencia consistente, aunque no significativa, hacia una mayor diversidad en Villarrica. Esta localidad presentó una mayor riqueza taxonómica ($S = 26$ vs. 20) y valores superiores en los índices de Shannon ($3,08$ vs. $2,82$), Simpson ($0,94$ vs. $0,93$) y Margalef ($6,2$ vs. $5,1$), en comparación con Malalcahuello. Sin embargo, las pruebas estadísticas asociadas no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$), lo que podría atribuirse a la variabilidad intra-localidad o al tamaño muestral.

En cuanto a la identificación de las especies, resulta llamativo que, aun cuando los aislados se obtuvieron a partir de tejido sano (sin síntomas visibles de enfermedad), se detectara la presencia de *Pewenomyces kalosus*, agente causal del cancro del pehuén (*A. araucana*), descrito por primera vez en 2015 (Balochi et al., 2015). Este hallazgo sugiere que *P. kalosus* podría comportarse como un patógeno latente o endófito facultativo, permaneciendo en equilibrio dentro del tejido hospedero sin manifestar síntomas, posiblemente debido a la regulación ejercida por la comunidad microbiana residente. Diversos estudios han documentado que interacciones competitivas y la producción de metabolitos antifúngicos por parte de otros endófitos pueden limitar la proliferación de patógenos en estado latente, manteniéndolos asintomático. En este contexto, planteamos la hipótesis de que los endófitos presentes en los tejidos de *A. araucana* cumplen un rol activo en suprimir el desarrollo de *P. kalosus*. Para evaluar esta posibilidad, se realizaron ensayos de confrontación dual entre cepas endófitas seleccionadas y *P. kalosus* en forma adicional al estudio (Anexo 1), con el fin de explorar el potencial antagonista de la microbiota asociada. Se observó que los endófitos tienen el potencial de inhibir su crecimiento, en algunos casos más del 50% PICR, lo que pudiese respaldar la hipótesis planteada.

Los ensayos de confrontación dual permitieron evaluar la capacidad inhibitoria de cinco cepas de hongos endófitos aislados desde el área foliar de *Araucaria araucana*.

Pseudocamarosporium brabeii, y *Alternaria alternata* fueron la cepa que presentaron las mayores inhibiciones de crecimiento frente a todos los fitopatógenos enfrentados (*Botrytis* sp., *Fusarium* sp. y *Phytophthora* sp.) presentando zonas de inhibición visibles. *Alternaria alternata* (1), según estudios, es capaz de emitir sesquiterpenos durante su etapa de crecimiento, lo que está relacionado con condiciones de competencias, por lo que estos metabolitos podrían ayudar con actividad antifúngica (Weigl et al., 2016). Los ensayos de confrontación dual realizados en este estudio mostraron que la cepa (1) no presentó inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp., (PICR 0%). Sin embargo, presentó actividad inhibitoria moderada frente a *Botrytis* sp., (19,6%) y *Phytophthora* sp., (18,02%), sugiriendo un comportamiento selectivo en su capacidad antagónica frente a los patógenos a los que se enfrentó.

El antagonismo observado en los ensayos entre las cepas de hongos endófitos y los fitopatógenos podría estar influido por factores ecológicos y climáticos propios de los sitios de muestreo. Dado que las cepas fueron recolectadas en dos localidades con condiciones térmicas invernales distintos, estas diferencias podrían haber incidido en su comportamiento. En particular, Villarrica presenta una mayor variabilidad térmica de -2°C a 7°C durante el invierno, lo que, según Mora et al., (2020), podría favorecer el desarrollo y la persistencia de endófitos adaptados a fluctuaciones ambientales. Hongos que crecen en entornos con condiciones más variables tienden a exhibir una mayor plasticidad fisiológica, lo que podría traducirse en un papel más activo tanto en la promoción del crecimiento vegetal como en la protección frente a patógenos. Esta capacidad adaptativa les permitiría implementar mecanismos defensivos contra organismos con los que coexisten, como *Pewenomyces kalosus*, mediante estrategias bioquímicas y estructurales. Por ejemplo, ciertos hongos formadores de micorrizas pueden tolerar suelos contaminados o producir metabolitos antifúngicos, incluidas enzimas hidrolíticas como quitinasas y β -1,3-glucanasas, que contribuyen a su actividad antagónica frente a patógenos (Verma et al., 2022).

La ausencia de diferencias significativas en la composición de las comunidades de hongos endófitos entre los sitios de Villarrica y Malalcahuello podría deberse a que, pese a las variaciones locales, ambos presentan climas similares y las muestras fueron obtenidas de la misma especie hospedera (*Araucaria araucana*), que además comparte una vegetación dominante en ambos lugares. El tipo de tejido de la especie arbórea influye de manera

determinante en la composición de la comunidad microbiana que alberga (Rodríguez et al., 2009).

Para los ensayos de confrontación dual se seleccionaron las cepas *Alternaria alternata* (1), *Pholiota* sp. (3), *Sydowia polyspora* (7), *Pseudocamarosporium brabeii* (12) y *Cladosporium ramotenellum* (19), basándose en antecedentes de la literatura que señalan su potencial antagónico y su capacidad para producir metabolitos antifúngicos.

Una posible explicación para la mayor diversidad de hongos endófitos observada en Villarrica, según los índices de Shannon ($H = 3.08$) y Margalef (6.2), es que en este sitio se recolectó un número considerablemente mayor de muestras que en Malalcahuello. En Villarrica se obtuvieron 306 discos, frente a 180 en Malalcahuello, debido a que se muestrearon más ramas de *A. araucana*, dada las condiciones climáticas. Este mayor esfuerzo de muestreo podría haber incrementado la probabilidad de detectar un número superior de especies, en concordancia con lo planteado por Chao et al. (2014), quienes señalan que la diversidad observada puede estar directamente relacionada con la intensidad del muestreo.

Los resultados obtenidos, tienen implicancias para el estudio de la ecología microbiana en donde *A. araucana* constituye una especie clave. La variación en la composición fúngica podría influir en aspectos funcionales del hospedador, como la resistencia a fitopatógenos o la tolerancia a estrés abiótico, lo cual abre nuevas oportunidades para el aprovechamiento biotecnológico de estos hongos en estrategias de conservación y manejo forestal sostenible.

VII Conclusión

1. Las comunidades de hongos endófitos en hojas de *Araucaria araucana* en Villarrica y Malalcahuello mostraron composiciones similares, lo que se asocia a la similitud climática y vegetal de ambos sitios.
2. La identificación molecular basada solo en ITS presentó limitaciones, evidenciando la necesidad de incorporar marcadores adicionales y revelando un posible reservorio fúngico no descrito.
3. La presencia de *Pewenomyces kalosus* en tejidos asintomáticos sugiere un estado latente regulado por interacciones con otros endófitos, hipótesis respaldada por ensayos de confrontación dual.
4. *Pseudocamarosporium brabeii* y *Alternaria alternata* destacaron como posibles agentes de biocontrol, aunque con actividad selectiva según el patógeno.
5. Se acepta la hipótesis planteada, dado que existen especies con potencial antifúngico, sin embargo, nuevos estudios son necesarios para describir los posibles compuestos que desencadenan la inhibición del crecimiento de los patógenos.

VII. Bibliografía

- Adeleke BS, Ayilara MS, Akinola SA & Babalola OO (2022) Biocontrol mechanisms of endophytic fungi. *Egypt.J.Biol.Pest Co* 32(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00547-1>
- Alarcón J, Márquez S, Teunisse G, Mendoza C, Meneses C, Baldini A, Parra P, Zamora P, Boehmwald F, & Castro-Nallar E (2020) Sequences of Endophytic Fungal and Bacterial Communities from *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch, 1869 in the Coastal and Andes Mountain Ranges, Chile. *NIH* 9, e00544-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00544-20>
- Araújo WL, Lima ADS, Azevedo JLD, Marcon, J, Sobral JK, & Lacava PT (2002) Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. CALQ
- Balocchi F, Marincowitz S, Wingfield MJ, Ahumada R & Barnes I (2022) Three new species of *Pewenomyces* (Coryneliaceae) from *Araucaria araucana* in Chile. *Mycol. Prog* 21(11), 92. <https://doi.org/10.1007/s11557-022-01840-x>
- Balocchi F, Barnes I, Wingfield MJ, Ahumada R & Visagie CM (2023) New Resinogalea species from *Araucaria araucana* resin in Chile and reclassification of the genus in the Cryptocaliciomycetidae. *IMA* 14, 16. <https://doi.org/10.1186/s43008-023-00122-9>
- Bastías D (2009) Mecanismos de resistencia a insectos en pastos que forman simbiosis con hongos endófitos. Tesis doctoral, Universidad Austral de Chile.
- Bhadra F, Gupta A, Vasundhara M, & Reddy MS (2022) Endophytic fungi: a potential source of industrial enzyme producers. *3 Biotech*, 12(4), 86. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03145-y>
- Carrillo R (2018) Académicos UFRO e instituciones asociadas logran decreto supremo que clasifica a la *Araucaria araucana* (pewen) “en peligro” de extinción. Universidad de La Frontera
- Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, Sander EL, Ma KH, Colwell RK, Ellison AM (2014) Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *ESA* 84(1), 45–67. doi:10.1890/13-0133.1
- Chávez D (2024) Investigación estudia el efecto de los hongos en la adaptación de *Araucaria araucana* en terrenos incendiados. Noticias UdeC. <https://noticias.udec.cl/investigacion->

estudia-el-efecto-de-los-hongos-en-la-adaptacion-de-araucaria-araucana-en-terrenos-incendiados/.

Chávez D, Rivas G, Machuca Á, Santos C, Deramond C, Aroca R, Cornejo P (2023) Contribution of Arbuscular Mycorrhizal and Endophytic Fungi to Drought Tolerance in *Araucaria araucana* Seedlings. *Plants* 12(11), 2116. <https://doi.org/10.3390/plants12112116>

Cheng T, Kolařík M, Quijada L, Stadler M (2022) A re-assessment of *Taxomyces andreanae*, the alleged taxol-producing fungus, using comparative genomics. *BioMed*. <https://doi.org/10.1186/s43008-022-00103-4>

Christian T (2018) *Araucaria araucana*. T&S. treesandshrubsonline.org/articles/araucaria/araucana-araucana/

Cortés J, Ugalde I, Caviedes J, & Ibarra JT (2019) Semillas de montaña: recolección, usos y comercialización del piñón de la araucaria (*Araucaria araucana*) por comunidades Mapuche-Pewenche del sur de los Andes. *Pirineos* 174, 048. <https://doi.org/10.3989/pirineos.2019.174008>

Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond - Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J and Foster GD (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *MPP* 13(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>

Dezzotti A, Sbrancia R, Goicoechea S, Chauchard L, & Mortoro A (2012) Structure and conservation status of *Araucaria araucana* forest outside the natural reserves of Argentina. Facultad de Agronomía, La Plata

Díaz-Valenzuela C, Deramond-Gálvez C, Machuca Á, & Chávez D (2024) Actividad promotora del crecimiento vegetal de cuatro hongos endófitos aislados desde *Araucaria araucana*. *Siembra* 11, e6802.

Diehl P and Fontenla SB (2010) Arbuscular mycorrhizal infection in two morphological root types of *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch. *AAM* 42(2), 133–137. <https://doi.org/10.1590/S0325-75412010000200014>

Donoso C (1993) Bosques templados de Chile y Argentina: variación, estructura y dinámica. EcoForestal. Santiago, Chile: Editorial Universitaria.

- Donoso C, González ME, Cortés M, González C, Donoso P & Hernández M (2008) Poblaciones de araucaria enana (*Araucaria araucana*) en la Cordillera de Nahuelbuta, Chile. *Bosque* 29(2), 170–175. PMID 173113298010
- Donoso S, Peña-Rojas K, Espinoza C, Galdames E & Pacheco C (2009) Bosques de araucaria, producción de piñones y sustentabilidad. En A. Lizana (Ed.), *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch: un recurso promisorio. Universidad de Chile
- Elvira Sánchez-Fernández R, Sánchez-Ortiz BL, Sandoval-Espinosa M, Ulloa-Benítez Á, Armendáriz-Guillén B, García-Méndez C, & Macías-Rubalcava M (2013) Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP* 16(2), 132–146. [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72084-9)
- El-Sayed ES, Baskaran A, Pomarańska O, Mykhailova D, Dunal A, Dudek A & Boratyński F (2024) Bioprospecting endophytic fungi of forest plants for bioactive metabolites with antibacterial, antifungal, and antioxidant potentials. *MDPI* 29(19), 4746. <https://doi.org/10.3390/molecules29194746>
- Ezziyyani M, Requena ME, Egea-Gilabert C, & Candela ME (2007) Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *J. Phytopathol* 155(6), 342–349
- Fite T, Kebede E, Tefera T (2023) Endophytic fungi: versatile partners for pest biocontrol, growth promotion, and climate change resilience in plants. *Front. Sostener. Food Syst* 7, 1322861. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1322861>
- Gauthier N & Wright S (2021) *Strawberry Anthracnose Fruit & Crown Rot (PPFS-FR-S-05)*. University of Kentucky College of Agriculture
- González-Menéndez V, Crespo G, Diaz C, Martín J, Serrano R, Mackenzie TA, Justicia C, González-Tejero MR, Casares M, Vicente F, Reyes F, Tormo JR, Genilloud O (2018) Fungal endophytes from arid areas of Andalusia: high potential sources for antifungal and antitumoral agents. *Sci.* <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28192-5>
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, & Lorito M (2004) *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev* 2(1), 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>

- Hechenleitner P, Gardner MF, Thomas P, Echeverría C, Escobar B & Brownless P (2005) Distribution of *Araucaria araucana* in Chile: two disjunct populations in the coastal Cordillera de Nahuelbuta (37° 40' – 38° 29' S) and the main Andes range (37° 03' – 40° 03' S). Threatened Plants of Central-South Chile: Distribution, Conservation and Propagation (eds. Gardner M.F. & Hechenleitner P.) *Sibbaldia* 52–57
- Hernández D, Ferrera R, Alarcón F (2019) *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Mdpi*. [mdpi.com/2076-0817/10/10/1242?utm_source=](https://doi.org/10.3390/2076-0817/10/10/1242).
- Hibbett D, Abarenkov K, Kõljalg U, Öpik M, Chai B, Cole J, Wang Q, Crous P, Robert V, Helgason T, Herr JR, Kirk P, Lueschow S, O'Donnell K, Nilsson RH, Oono R, Schoch C, Smyth C, Walker DM, Porras-Alfaro A, Taylor JW, Geiser DM (2016) Sequence-based classification and identification of Fungi. *MIC* 108:1049–1068. <https://doi.org/10.3852/16-130>
- Infor. (2021) infor apuesta por la conservación de la Araucanía con proyecto de migración asistida. Infor. <https://www.infor.cl>
- Ipinza R (2018) Migración Asistida: el nuevo paradigma de la conservación de recursos genéticos forestales para la adaptación al cambio climático. *Infor* 24(3), 69–88.
- Ipinza R, González J, Molina M, Gutiérrez B, Guevara H, Koch L, Hasbún R, Santibáñez F, Saavedra L, Magni C, & Celhay J (2022) Migración asistida de *Araucaria araucana*: un estudio de caso en Chile. *Infor*. 12
- Jaramillo GV (2014) Evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica de *Trichoderma spp.* frente a *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.* y *Phytophthora sp.* Proyecto graduación. Escuela Agrícola Panamericana
- Kembel SW & Mueller RC (2014) Plant traits and taxonomy drive host associations in tropical phyllosphere fungal communities. *Botany* 92, 303–311. <https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0194>
- Kusari S, Hertweck C, & Spiteller M (2012) Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chem. Biol* 19(7), 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.004>

- Lamichhane JR, Dürr C, Schwanck AA, Robin MH, Sarthou JP, Cellier V, Messéan A and Aubertot JN (2017) Integrated management of damping-off diseases. *Agron. Sostener.Dev* 37(2), 10. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0417-y>
- Lara A, Villalba R, Urrutia R, Luckman BH and González ME (1999) A 400-year tree-ring record of the Puyehue-Cordón Caulle volcanic eruption (Southern Andes) from *Araucaria araucana*. *Holocene* 9(2), 197–202.
- Li Y, Wang Y, Wang H, Shi T, Wang B (2024) The genus *Cladosporium*: A prospective producer of natural products. *Mol Sci* 25:1652. <https://doi.org/10.3390/ijms25031652>
- Manganyi MC & Ateba CN (2020) Untapped Potentials of Endophytic Fungi: A Review of Novel Bioactive Compounds with Biological Applications. *Microbiol* 8(12), 1934. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121934>
- Molina M, Soto H, Ipinza R and González M (2024) Ficha técnica para plantación de *Araucaria araucana*. *Infor*, 30(1). researchgate.net/publication/381245672_Ficha_tecnica_para_plantacion_de_Araucaria_araucana
- Mora-Delgado J, Argumedo-Delira R & Gómez-Martínez MJ (2022) Plant Growth Promoting Filamentous Fungi and Their Application in the Fertilization of Pastures for Animal Consumption. *Agronomy* 12(12), 3033. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123033>
- Morelli ML, Rolli E & Dini-Andreote F (2020) Role of Endophytes in Plant Health and Defense. *Front Plant Sci* 11, 1312. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01312>
- Moreno CE (2001) Métodos para medir la biodiversidad. Instituto de Ecología. AC México 84 pp
- Muñoz RI (2023) *Araucaria araucana*, a long-lived evergreen conifer with individuals exceeding 1000 years. *Forest Ecosyst* 10(1), 32. <https://doi.org/10.3390/fecosystems20231032>
- Naimuzzaman M, Hasan MM, Kumer A, Hossin AY, Harun-Ur-Rashid M, Roy SK, Ahmmed ANF and Uddin J (2025) Computational and in silico study of novel fungicides against combating root rot, gray mold, *Fusarium* wilt, and cereal rust. *Plos one* 20(1), e0316606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316606>

- O'Donnell K, Whitaker BK, Laraba I, Proctor RH, Brown DW, Broders K, Kim H-S, McCormick SP, Busman M, Aoki T, Torres-Cruz TJ, Geiser DM (2022) DNA sequence-based identification of *Fusarium*: A work in progress. *Plant Dis* 106:1597–1609. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-2035-SR>
- Olguín FY, Moretti AP, Pinazo MA, Gortari F, Jose VB, & Corina G (2018) Respuestas morfofisiológicas de *Araucaria angustifolia* al establecimiento con y sin cobertura de dosel del Bosque Atlántico. *AsAE* 529-529. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/161613>
- Oliveira RVF, Furlan A & Bacci M (2014). Plant or fungal sequences? An alternative optimized PCR protocol to avoid ITS (nrDNA) misamplification. *BABT* 53(1), 141–152.
- Oliveira RJV, Bezerra JL, Lima TEF, Silva GA & Cavalcanti MADQ (2016) *Phaeosphaeria nodulispora*, a new endophytic coelomycete isolated from *Cocos nucifera* in Brazil. *Nova Hedwigia* 102(1–2), 185–192.
- Palma L (2025) Impacto de los incendios en la diversidad de hongos micorrízicos arbusculares en *Araucaria araucana*. *Ciencia&Norte*. cienciaenchile.cl/impacto-de-los-incendios-en-la-diversidad-de-hongos-micorrizicos-arbusculares-en-araucaria-araucana/
- Pereira JO, Azevedo JL & Petrini O (1993) Endophytic fungi of *Stylosanthes*. *Mycologia*, 85(3), 362–364
- Puchi P, Camarero J, Battipaglia G, Carrer M (2021) Retrospective analysis of wood anatomical traits and tree-ring isotopes suggests site-specific mechanisms triggering *Araucaria araucana* drought-induced dieback. *Glob Chang Biol* 27:6394–6408. DOI: 10.1111/gcb.15881
- Pulido AA (2024) Contribución de la inoculación combinada de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y hongos endófitos (HE) en plantas de *Araucaria araucana* establecidas en suelos con diferentes niveles de afectación por fuego. Tesis de pregrado, Universidad de Concepción
- Raya S (2017) Los hongos entomopatógenos endófitos mejoran la nutrición férrica y el crecimiento vegetal. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba

- Rodriguez RJ, White JF Jr, Arnold AE, Redman RS (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol* 182(2):314–330. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
- Roy SG & Grünwald NJ (2014) The “plant destroyer” *genus Phytophthora*: its vast impact on global agriculture and forestry. *Plant Pathol* 6, 387–412.
- Russell JR, Huang J, Anand P, Kucera K, Sandoval AG, Dantzler KW, Hickman D, Jee J, Kimovec FM, Koppstein D, Marks DH, Mittermiller PA, Núñez SJ, Santiago M, Townes MA, Vishnevetsky M, Williams NE, Vargas MPN, Boulanger L-A, Bascom-Slack C, Strobel SA (2011) Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Appl Environ. Microbiol* 77:6076–6084. <https://doi.org/10.1128/AEM.00521-11>
- SAG (2024) Vigilancia de *Araucaria araucana*. SAG sag.gob.cl/ambitos-de-accion/vigilancia-araucaria-araucana
- Sánchez-Fernández RE & Elvira R (2013) Endophytic fungi: a potential source of bioactive secondary metabolites and their application in agriculture and medicine. *SciELO* 16(2), 132–146
- Sanguinetti J & Kitzberger T (2009) Masting in *Araucaria araucana*: spatial synchrony and variability of cone production across years and sites. *RCHN* 82, 395–402. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2009000300003>
- Sanguinetti J & Kitzberger T (2014) Temporal dynamics and reproductive strategy of *Araucaria araucana*: two-year reproductive cycle and environmental drivers. *RCHN* 87, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13717-024-00497-6>
- Sanguinetti J, Ditgen RS, Donoso-Calderón SR, Hadad MA, Gallo L, González ME, Ibarra JT, Ladio A & Lambertucci SA (2023) Información científica clave para la gestión y conservación del ecosistema biocultural del Pewén en Chile y Argentina. *SciELO* 44(1), 179–190. <https://doi.org/10.4067/s0717-92002023000100179>
- Saxena S, Dufossé L, Deshmukh SK, Chhipa H & Gupta MK (2024) Endophytic fungi: a treasure trove of antifungal metabolites. *Microb. Cell Fact* 23, 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02411-3>
- Shepherd JD and Ditgen RS (2012) Rodent handling of *Araucaria araucana* seeds. *Austral Ecol* 38(1), 23–32. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2012.02366.x>

- Shepherd JD, Ditgen RS & Sanguinetti J (2008) *Araucaria araucana* and the Austral parakeet: pre-dispersal seed predation on a masting species. *Scielo* 81(3), 395–401. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2008000300008>
- Shi X, Qin T, Liu H, Wu M, Li J, Shi Y, Gao Y & Ren A (2020) Endophytic Fungi Activated Similar Defense Strategies of *Achnatherum sibiricum* Host to Different Trophic Types of Pathogens. *Front. Microbiol* 11, 611649. doi:10.3389/fmicb.2020.611649
- Singh VK and Kumar A (2023) Secondary metabolites from endophytic fungi: production, methods of analysis, and diverse pharmaceutical potential. *Symbiosis* 90, 111–125. <https://doi.org/10.1007/s13199-023-00925-9>
- Sinno M, Ranesi M, Lelio, Lacomino G, Becchimanzi A, Barra E, Moliss D, Pennachio F, Digilio M, Vitale S, Turra D, Harizanova V, Lorito M (2021) Selection of Endophytic *Beauveria bassiana* as a Dual Biocontrol Agent of Tomato Pathogens and Pests. *Mdpi* 10(10), 1242. mdpi.com/2076-0817/10/10/1242?utm_source=.
- Speziale KL, Lambertucci SA, Gleiser G, Tella JL, Hiraldo F and Aizen MA (2018) An overlooked plant–parakeet mutualism counteracts human overharvesting on an endangered tree. *R.Soc* 5(1), 171456. <https://doi.org/10.1098/rsos.171456>
- Strobel G, & Daisy B (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *MMBR* 67(4), 491–502. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003>
- Tan RX, Zou WX (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep* 18:448–459. <https://doi.org/10.1039/b100918o>
- Tabilo PA (2024) Patogenicidad de especies ribereñas de *Phytophthora* en plantas de *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Tesis profesional. Universidad de Concepción
- Tedersoo L, Tooming-Klunderud A, Anslan S (2018) PacBio metabarcoding of Fungi and other eukaryotes: errors, biases and perspectives. *New Phytol* 217:1370–1385. <https://doi.org/10.1111/nph.14776>
- Tiwari P & Bae H (2022) Endophytic fungi: Key insights, emerging prospects, and challenges in natural product drug discovery. *Microorganisms* 10(2), 360. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020360>

- Tondreau N (2024) Chile: *Araucaria*, el árbol sagrado que es memoria viva y se resiste a desaparecer. CR2 cr2.cl/chile-araucaria-el-arbol-sagradoque-es-memoria-viva-y-se-resiste-a-desaparecer-ladera-sur/
- Varas-Myrik A, Sepúlveda F, Fajardo A, Alarcón D, Toro O, Castro E, Hasbún R (2022) Predicting climate change-related genetic offset for the endangered southern South American conifer *Araucaria araucana*. SD 504, 119856. DOI: 10.1016/j.foreco.2021.119856.
- Verma KK, Song X, Joshi RK, Chauhan PS, Verma CL, Li D, Singh M and Singh Y (2022) Critical plant-associated microorganisms like endophytes: key drivers toward soil sustainability and plant resilience. Front. Plant Sci 13, 953836. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.953836>
- Vilches D (2024) *Araucaria araucana*. Vilches altos de Lircay. vilchesdelircay.cl/attractivos-naturales/flora/araucaria-araucaria-araucana/
- Villar IA (2024) Hongos endófitos en Chile, una fuente natural de metabolitos secundarios bioactivos para uso en medicina y agricultura. Habilitación profesional de Concepción.
- Viteri P, Vásquez W, Martínez AV, Sotomayor A, Mejía P, Viera W, Jácome R, Ayala G & Noboa M (2016) Características generales de la planta, variedades cultivadas y clones promisorios de mora. El cultivo de mora en el Ecuador. INIAP
- Weigl F, Ghirardo A, Schnitzler JP and Pritsch K (2016) Sesquiterpene emissions from *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*: effects of age, nutrient availability and co-cultivation. Sci Rep 6, 22152. <https://doi.org/10.1038/srep22152>
- Wen J, Okyere SK, Wang S, Wang J, Xie L, Ran Y, & Hu Y (2022) Endophytic fungi: An effective alternative source of plant-derived bioactive compounds for pharmacological studies. JoF 8(2), 205. <https://doi.org/10.3390/jof8020205>
- White TJ, Bruns T, Lee SJW T, & Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. NIH 18, 315–322.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P and Van J (2007) *Botrytis cinerea* – the cause of grey mould disease. Mol. Plant 8(5), 561–580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>

- Zapata M, Palma MA & Piontelli E (2018) *Ophiostoma pehueninum*, a new species associated with *Araucaria araucana* in Chile. *Biotaxa* 346(1), 93–103. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.346.1.5>
- Zapata M, Palma MA, Aninat MJ & Piontelli E (2020) Polyphasic studies of new species of *Diaporthe* from native forest in Chile, with descriptions of *Diaporthe araucanorum* sp. nov., *Diaporthe foikelawen* sp. nov. and *Diaporthe patagonica* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 70, 3379–3390. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004183>
- Zhang J, Lu J, Zhu Y, Shen X, Zhu B & Qin L (2024) Roles of endophytic fungi in medicinal plant abiotic stress response and TCM quality development. *CHM* 16(2), 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2023.02.006>
- Xu K, Li X-Q, Zhao D-L, Zhang P (2021) Antifungal secondary metabolites produced by the fungal endophytes: Chemical diversity and potential use in the development of biopesticides. *Front Microbiol* 12:689527. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.689527>

ANEXO 1



Figura1. Evaluación antagonica entre hongos endófitos y hongos fitopatógenos. Izquierda *Pewenomyces kalosus*. Derecha hongos endófitos aislados de *Araucaria araucana*. Las cepas que fueron evaluadas en el correspondiente orden; 1. *Alternaria alternata* (cepa 1), 2. *Pholiota* sp. (cepa 3), 3. *Sydowia polyspora* (cepa 7), 4. *Pseudocamarosporium brabeii* (cepa 12) y 5. *Cladosporium ramotenellum* (cepa 19). Los ensayos fueron medidos durante 14 días.

Se evaluó la actividad antagonista de cinco cepas de hongos endófitos aislados de *Araucaria araucana* frente al patógeno *Pewenomyces kalosus*, mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR%). Los resultados mostraron variaciones marcadas entre las cepas evaluadas. La mayor inhibición fue registrada por *Alternaria alternata* (cepa N°1), con un PICR promedio de 45,4%, seguida por *Pholiota* sp. (cepa N°3) con 26,1%. En contraste, *Sydowia polyspora* (cepa N°7) y *Pseudocamarosporium brabeii* (cepa N°12) presentaron valores reducidos de inhibición, con 2,8% y 7,2%, respectivamente. Finalmente, *Cladosporium ramotenellum* (cepa N°19) no mostró actividad antagonista detectable (PICR% = 0). Estos resultados indican que la capacidad inhibitoria frente a *P. kalosus* es específica de cepa y especie, destacando el potencial de ciertos endófitos como agentes de biocontrol.

Tabla 1. PICR% de la actividad antagonica de hongos endófitos aislados de *Araucaria araucana* contra *Pewenomyces kalosus*.

N° cepa	Nombre especie o género	Patógeno	PICR% (Promedio con duplicado)
1	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Pewenomyces kalosus</i>	45,4
3	<i>Pholiota</i>		26,1
7	<i>Sydowia polyspora</i>		2,8
12	<i>Pseudocamarosporium brabeii</i>		7,2
19	<i>Cladosporium ramotenellum</i>		0

Tabla 2. Identificación de cantidad de especies obtenidas por sitio individual de muestreo.

					Sitios	
Cepa	% Id	N° Acceso GenBlank	Blast Match (Numero acceso GenBlank y nombre especie)	Orden	Villa	Malal
1	100	ATCC34957	<i>Alternaria alternata</i>	Coryneliales		
2	100	OM937772	<i>Pewenomyces kalosus</i>	Coryneliales		
3	99,7	KC589021	<i>Pholiota sp</i>	Agaricales		
4	99,5	OR800200	<i>Nigrospora sp</i>	Amphisphaeriales		
5			DESCONOCIDO 1			
6	99,7	FR846476	<i>Phoma sp.</i>	Pleosporales		
7	93	TXID64499	<i>Sydowia polyspora</i>	Dothideales		
8			DESCONOCIDO 2			
9	98,4	PP523940	<i>Coniochaeta sp.</i>	Coniochaetales		
10	100	KY643763	<i>Cladosporium sp</i>	Capnodiales		
11			DESCONOCIDO 3			
12	100	MG098280	<i>Pseudocamarosporium brabeji</i>	Pleosporales		
13			DESCONOCIDO 4			
14			DESCONOCIDO 5			
15			DESCONOCIDO 6			
16			DESCONOCIDO 7			
17	100	MZ493102	<i>Chromelosporium sp.</i>	Pezizales		
18			DESCONOCIDO 8			
19	99,3	TXID470174	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	Capnodiales		
20			DESCONOCIDO 9			
21			DESCONOCIDO 10			
22	99,6	TXID3294362	<i>Preussia apgarae</i>	Pleosporales		
23	100	TXID1354946	<i>Penicillium sp.</i>	Eurotiales		
24			DESCONOCIDO 11			
25			DESCONOCIDO 12			
26	100	TXID1970644	<i>Cladosporium subcinereum</i>	Capnodiales		
27			DESCONOCIDO 13			
28	100	TXID1338630	<i>Cladosporium allcinum</i>	Capnodiales		
29	99,8		<i>Fungal endophyte 1</i>			

*DESCONOCIDO 1-13: No fue posible su identificación molecular.

Cuestionario de Auto-Reporte de Contribución a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

Bloques	Objetivos	1 °	2 °
Personas	1. Poner fin a la pobreza en todas sus formas y en el mundo.		
	2. Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible		
	3. Garantizar una vida sana y promover el bienestar de todos y todas las edades.		
	4. Garantizar una educación inclusiva y equitativa de calidad y promover oportunidades de aprendizaje permanente para todos.		
	5. Lograr la igualdad de género y empoderar a todas las mujeres y las niñas.		
Planeta	6. Garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y el saneamiento para todos.		
	12. Garantizar modalidades de consumo y producción sostenible.		x
	13. Adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos.		
	14. Conservar y utilizar sosteniblemente los océanos, los mares y los recursos marinos para el desarrollo sostenible.		
	15. Proteger, restablecer y promover el uso sostenible de los ecosistemas terrestres, gestionar sosteniblemente los bosques, luchar contra la desertificación, detener e invertir la degradación de las tierras y detener la pérdida de biodiversidad.	x	
Prosperidad	7. Garantizar el acceso a una energía asequible, fiable, sostenible y moderna para todos.		
	8. Promover el crecimiento económico sostenido, inclusivo y sostenible, el empleo pleno y productivo y el trabajo decente para todos.		
	9. Construir infraestructuras resilientes, promover la industrialización inclusiva y sostenible y fomentar la innovación.		
	10. Reducir la desigualdad en los países y entre ellos.		
	11. Lograr que las ciudades y los asentamientos humanos sean inclusivos, seguros, resilientes y sostenibles.		
Paz	16. Promover sociedades pacíficas e inclusivas para el desarrollo sostenible, facilitar el acceso a la justicia para todos y construir a todos los niveles institucionales eficaces e inclusivas que rindan cuentas.		
Asociaciones	17. Fortalecer los medios de implementación y revitalizar la Alianza Mundial para el Desarrollo Sostenible		

