

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



**EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES Y
ENDÓFITOS EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS POR SEQUÍA EN PLÁNTULAS DE
*Araucaria araucana***

**MEMORIA DE TÍTULO PARA
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

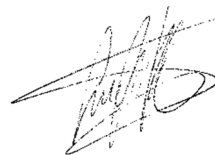
GUSTAVO FERNANDO RIVAS IRIARTE

LOS ÁNGELES-CHILE

2020

“Efecto de la inoculación de hongos micorrícicos arbusculares y endófitos en la tolerancia al estrés por sequía en plántulas de *Araucaria araucana*”

Alumno



**Gustavo Rivas Iriarte
Ingeniero en Biotecnología Vegetal**

Profesor Guía



**Dr. Daniel Chávez Matamala
PROFESOR ASISTENTE
Ingeniero Forestal**

Profesor Co-Guía



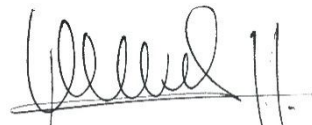
**Dra. Ángela Machuca H.
PROFESOR ASOCIADO
Bioquímico**

Evaluador Externo



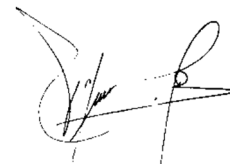
**Dr. Pablo Cornejo Rivas
Profesor Asociado
Ingeniero Agrónomo**

Jefe de Carrera



**Pedro Quiroz Hernández
PROFESOR INSTRUCTOR
Ingeniero (E) Forestal**

Director de Departamento



**MSc. Pablo Novoa Barra
PROFESOR ASISTENTE
Ingeniero (E) Forestal**

AGRADECIMIENTOS

Después de un año lleno de trabajo e investigación puedo mirar hacia atrás a ese camino recorrido, un camino que cruzó por valles y montañas, donde a veces se volvió monótono y agotador, pero también gran parte de ese recorrido me mostro un paisaje grato. Donde tuve la oportunidad de aprender y conocer muchas cosas, tanto a nivel intelectual como personal, ser más consciente de mis fortalezas y debilidades, debilidades que me permitieron volverme más fuerte. Durante estos años de universidad agradezco primeramente a mi madre y padre por el apoyo que me entregaron y mostrarme la confianza de que lograría finalizar con éxito mis estudios. También agradezco a mi profesor guía quien me enseñó y apoyo pacientemente para sacar adelante mi tesis, y con un tema de investigación que fue de un gran agrado haberlo aprendido, internándome en ese mundo de las milenarias araucarias.

Y por último agradecer el financiamiento del proyecto FONDECYT Postdoctoral n° 3170089, el cual hizo posible esta investigación en un tema de gran importancia para nuestro país tanto a nivel medioambiental como cultural.



Tesis Financiada a través del proyecto Fondecyt PotDoctorado N° 3170089



ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULOS	PÁGINA
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCION.....	3
II. MARCO TEORICO.....	5
2.1 <i>Araucaria araucana</i> (MOL.) K. Koch.....	5
2.2 Hongos micorrícicos arbusculares.....	6
2.3 Hongos endófitos.....	9
III. HIPOTESIS.....	11
IV. Objetivos.....	11
4.1 Objetivo general.....	11
4.2 Objetivos específicos.....	11
V. METODOLOGIA.....	12
5.1 Obtención de muestras de suelo.....	12
5.2 Separación de esporas a partir de las muestras de suelo.....	12
5.3 Cultivo de plantas trampas.....	12
5.4 Aislamiento de hongos endófitos.....	13
5.5 Inoculación de plántulas de <i>Araucaria</i> y ensayo de estrés hídrico.....	13
5.6 Evaluación del porcentaje de colonización.....	14
5.7 Eficiencia cuántica máxima del fotosistema II.....	15
5.8 Contenido relativo de agua.....	15
5.9 Concentración de pigmentos fotosintéticos.....	15
6.0 Asimilación de CO ₂	16
6.1 Variables morfológicas y tasa de mortalidad.....	16
6.2 Determinación de prolina foliar.....	16
6.3 Análisis estadísticos.....	17

VII. RESULTADOS.....	18
7.1 Porcentaje colonización	18
7.2 Variables morfológicas y tasa de mortalidad	19
7.3 Eficiencia cuántica máxima del PII Fv/Fm.....	22
7.4 Contenido relativo de agua	23
7.5 Concentración de pigmentos fotosintéticos.....	24
7.6 Asimilación de CO ₂	25
7.7 Determinación de prolina foliar.....	26
7.8 Análisis estadísticos (Correlación de variables)	27
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	28
IX. CONCLUSIÓN	35
X. BIBLIOGRAFÍA	36
XI. ANEXO.....	47



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	5
Figura 2	14
Figura 3	18
Figura 4	18
Figura 5	19
Figura 6	20
Figura 7	21
Figura 8	22
Figura 9	23
Figura 10	24
Figura 11	26
Figura 12	27



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	22
Tabla 2.....	25
Tabla 3.....	28

ANEXO

Figura 1	47
----------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CRA	: Contenido Relativo de Agua
DAC	: Diámetro a la altura del cuello
EMA	: Extracto de Malta Agar
Fv/Fm	: Rendimiento Cuántico Máximo del fotosistema II
HMA	: Hongos micorrícicos Arbusculares
HE	: Hongos Endófitos
Msnm	: metros sobre nivel del mar
PNN	: Parque Nacional Nahuelbuta
PF	: Peso Fresco
PT	: Peso Turgente
PS	: Peso Seco
PII	: Fotosistema II
PPM	: Partes por millón



Resumen

Araucaria araucana (Mol.) K. Koch, especie endémica que solo se encuentra en el sur de Chile y Argentina, es un árbol dioico que tiene un ciclo reproductivo de un año y medio. Esta especie en estado adulto puede alcanzar alturas de 50 m y diámetros de fuste de 2,5 m. Es una especie de lento desarrollo y larga vida, alcanzando aprox. 1300 años. *Araucaria araucana* es una especie de conífera que se encuentra en la Cordillera de los Andes y Cordillera de la Costa, la cual está expuesta a eventos naturales como: viento, vulcanismo, incendios y bajas precipitaciones que se han acentuado en los últimos años debido al cambio climático. Las poblaciones de araucaria presentan una extraordinaria capacidad de adaptación, ya que sobreviven a menudo bajo condiciones extremas, al considerar factores tan complejos como el clima y las características físico-químicas del suelo. Por lo tanto, las araucarias generan asociaciones mutualistas con microorganismos del suelo que les permiten tolerar estos ambientes extremos, dentro de estos organismos se encuentran los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y hongos endófitos (HE). El objetivo de este trabajo es conocer las interacciones de estos microorganismos con *A. araucana* bajo estrés por sequía. Mediante el cultivo de plántulas en invernadero. Esto se realizó inoculando las plántulas con un consorcio de HMA y cuatro especies de HE aislados de araucarias del Parque Nacional Nahuelbuta. Los inóculos se agregaron de tres formas diferentes, un grupo con solo HE, otro con solo HMA y un último grupo con HE y HMA, las plántulas fueron sometidas a sequía durante 2 meses para su posterior evaluación. Los resultados mostraron un impacto positivo por parte de los HMA y su interacción con HE, manteniendo estable variables como: fotosíntesis, asimilación de CO₂ y contenido relativo de agua, además, de una alta concentración del osmolito prolina. Por otra parte, la inoculación de HE tuvo efectos negativos sobre las plántulas, disminuyendo su capacidad fotosintética, asimilación de CO₂ y una alta tasa de mortalidad. Se concluye que la inoculación de HMA por sí solo, o su interacción con HE usados en este estudio, son beneficiosas para las plántulas de *A. araucana*. En cambio los hongos endófitos en ausencia de micorrizas arbusculares, y bajo condiciones abióticas estresantes como sequía, presentan un efecto nulo o neutro en las plántulas de *A. araucana*, sin mejorar la capacidad de tolerar la sequía prolongada.

Abstract

Araucaria araucana (Mol.) K. Koch Endemic species that is only found in southern Chile and Argentina, it is a dioecious tree that has a reproductive cycle of a year and a half. This adult species can reach heights of 50m and shaft diameters of 2.5m. It is a kind of slow development and long life, reaching approx. 1300 years. *Araucaria araucana* is a species of conifer that is found in the Cordillera de Los Andes and Cordillera de la Costa, which is exposed to natural events such as: wind, volcanism, fires and low rainfall that have accentuated in recent years due to climate change. Araucaria populations have an extraordinary capacity to adapt, since they often survive under extreme conditions, considering factors as complex as the climate and the physical-chemical characteristics of the soil. Therefore, araucarias generate mutualistic associations with soil microorganisms that allow them to tolerate these extreme environments, within these organisms are arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and endophytic fungi (EF). The objective of this work is to know the interactions of these microorganisms with *A. araucana* under drought stress. By growing seedlings in the greenhouse. This was done by inoculating the seedlings with a consortium of AMF and four species of EF isolated from araucarias from the Nahuelbuta National Park. The inoculums were added in three different ways, one group with only EF, another with only AMF and last group with EF and AMF, the seedlings were subjected to drought for 2 months for later evaluation. The results showed a positive impact on the part of the AMF and their interaction with EF, maintaining stable variables such as: photosynthesis, CO₂ assimilation and relative water content in addition to a high concentration of proline osmolyte. On the other hand, the inoculation of EF had negative effects on the seedlings, decreasing their photosynthetic capacity, CO₂ assimilation and a high mortality rate. It is concluded that the inoculation of AMF alone, or its interaction with EF used in this study, are beneficial for *A. araucana* seedlings. In contrast, endophytic fungi in the absence of arbuscular mycorrhizae, and under stressful abiotic conditions such as drought, present a null or neutral effect on *A. araucana* seedlings, without improving the ability to tolerate prolonged drought.

I. INTRODUCCIÓN

Araucaria araucana (Mol.) K. Koch (Araucaria, Pehuén) perteneciente a la familia *Araucariaceae* es una especie de importancia científica, cultural, alimenticia y recurso genético único en el mundo por su alto grado de endemismo y longevidad (Herrmann 2006). Su población se encuentra en la Cordillera de los Andes entre el sur de la Región del BioBio 37°20'S y al norte de la Región de los Lagos 40°00'S, y otras dos sub-poblaciones en la Cordillera de Nahuelbuta, ubicada en la zona centro-sur de la Cordillera de la Costa, entre las Regiones del BioBio y la Araucanía entre los 37°40'S y 38°29'S (Hechenleitner et al. 2005). En la actualidad está prohibida la corta o explotación de esta especie, en 1997 fue catalogada como especie "rara" y entre 1998-2000 como especie en "estado vulnerable"; sin embargo, actualmente la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) la ha clasificado en la categoría de especie "En peligro" (Premoli et al. 2013). *Araucaria araucana* ha sido expuesta a una intensa explotación de la tala y extracción de sus semillas. Además, de los eventos naturales como: viento, vulcanismo e incendios (Aagesen 1998; Valderrama et al. 2018). Dentro de los eventos naturales la disminución de precipitaciones se ha convertido en una variable importante a tomar en cuenta, debido a que Chile en los últimos 10 años ha experimentado cambios drásticos a nivel del clima, reduciendo las precipitaciones anuales y aumentando las estaciones cálidas. Todo esto provocado por el cambio climático, que se manifiesta con mayor fuerza en regiones con un clima mediterráneo, como lo es el centro y centro-sur de Chile (IPCC 2013; Boisier et al. 2016). Debido a esta prolongación de las estaciones más cálidas ha existido una mayor recurrencia de incendios forestales los cuales han afectado gravemente diferentes especies nativas del centro-sur de Chile (Conaf 2017; Valderrama et al. 2018). Sin embargo, la falta de precipitaciones no solo promueve incendios forestales, también genera una disminución importante de agua en ríos, lagos y embalses, producto de largos periodos de sequía como el ocurrido entre los años 2010-2015 presentando la mayor sequía registrada hasta ahora en Chile, llamándose a este periodo como la megasequía, provocando toda una serie de dificultades tanto para el área agrícola, forestal y ganadera (Stolpe y Undurraga 2016; Garreaud et al. 2017). Para enero del año 2016 se detectó una enfermedad desconocida en *Araucaria*, afectando a la Reserva Nacional Ralco ubicada en la Región del Biobío y Parque

Nacional Conguillio ubicado en la Región de la Araucanía, presentando síntomas como secado de hojas y copa de árboles de coloración rojo intenso. Se han realizado diversas investigaciones y desarrollado diferentes hipótesis que van desde el cambio climático, régimen de hambre provocado por sequía prolongada o problemas en el genoma de *Araucaria* entre otros (Riess et al. 2016; BCN 2017; CONAF 2017; Besoain et al. 2017; Saavedra y Willhite 2017; Velez et al. 2018). Se ha comprobado que *A. araucana* genera asociaciones mutualistas con otros organismos presentes en el suelo, así como la mayoría de las plantas terrestres, otorgándoles beneficios para su salud, estos organismos son los llamados hongos micorrízicos arbusculares (HMA), y se encuentran en las raíces de *Araucaria* los cuales les permiten una mejor absorción de nutrientes y agua, además de proteger a la planta de ataques de organismos patógenos, a cambio estos hongos reciben los productos fotoasimilados de parte de la planta formando una sociedad mutualista (Diehl y Fontela 2010; Wu y Zou 2017). También están los hongos endófitos (HE) los cuales se encuentran al interior de los tejidos de la planta como: hojas, tallos, raíces, semillas y frutos, estos hongos hasta la fecha se sabe que también pueden mejorar la absorción de nutrientes y el desarrollo de las plantas (Sánchez et al. 2013; Dastogeer y Wylie 2017). Sin embargo, nuevos estudios indicarían que este tipo de beneficios por parte de estos organismos varía según las condiciones ambientales y nutricionales, afectando sus interacciones con las plantas que podrían provocar un cambio de mutualismo a parasitismo, donde los hongos endófitos serían los más sensibles a estos cambios (Ahlholm et al. 2002; Hardoim et al. 2015). Los efectos negativos provocados por algún factor ambiental adverso o por la presencia de hongos endófitos, pueden ser atenuados o regulados por la presencia de hongos micorrízicos arbusculares y ectomicorrízicos como ya se ha descrito en la literatura (Reininger y Sieber 2012; Wezowicz et al. 2017). Por lo tanto, Los avances en el conocimiento de los HMA y HE permitirían mejorar los planes de restauración y conservación de especies nativas, aumentando las probabilidades de supervivencia en *A. araucana*. El objetivo de este trabajo es conocer las interacciones de los HMA y HE en la supervivencia y crecimiento de *Araucaria araucana* sometidas a estrés por sequía.

II. Marco teórico

2.1 *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch

Especie endémica que solo se encuentra en el sur de Chile y Argentina, en Chile habita desde la Región del Biobío hasta la vertiente sur del Volcán Villarrica, 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 ($37^{\circ}03'$ - $40^{\circ}03'S$) (Donoso 1998). En Chile alrededor del 97% de su población se encuentra en la Cordillera de los Andes conformando bosques desde los 800 hasta los 1.700 msnm. Una segunda área de desarrollo natural se presenta en la Cordillera Costera de Nahuelbuta en dos poblaciones, entre los $37^{\circ}40'$ y $37^{\circ}50'S$, por sobre los 1.000 y hasta los 1.400 msnm, y alrededor del paralelo $38^{\circ}40'S$ a 600 m de altitud (Fig.1) (Hechenleitner et al. 2005).



Fig. 1. Localización de *A. araucana* en la Cordillera de Los Andes y dos poblaciones en la Cordillera de la costa (Nahuelbuta). Ver flechas rojas (adaptado de Zamorano-Elgueta et al. 2012).

Araucaria araucana es un árbol dioico con individuos machos y hembras, los conos masculinos son terminales, ovoides y erectos. Los femeninos también son terminales, pero son esféricos (Donoso et al. 2014). Según Caro (1995), el ciclo reproductivo dura un año y medio, desde la formación de los conos femeninos hasta la diseminación de las semillas. La araucaria es un árbol que en estado adulto puede alcanzar alturas de 50 m y diámetros de fuste de 2,5 m. Es una especie de lento desarrollo y larga vida, alcanzando aprox. 1300

años (González et al. 2006; Aguilera-Betti et al. 2017). Debido a que esta especie crece y se concentran en mayor cantidad hacia la Cordillera de los Andes, las poblaciones de *A. araucana* están asociadas a suelos poco profundos sobre depósitos de cenizas volcánicas, material de escoria y piedra pómez de gran fragilidad y susceptibilidad a la erosión característica de la Cordillera de los Andes. En general, las poblaciones de *A. araucana* presentan una extraordinaria capacidad de adaptación, ya que sobreviven a menudo bajo condiciones extremas, al considerar factores tan complejos como el clima y las características físico-químicas del sustrato (Peralta 1980). La falta de agua predominante en los suelos que crece araucaria es un factor determinante que puede afectar el crecimiento y supervivencia de esta especie, siendo la sequía una de las causas en la disminución a gran escala en los bosques templados (Allen 2009). Donde el efecto del estrés hídrico influye en parámetros como el crecimiento del árbol, la expansión celular, transporte de floema, nutrientes y la función metabólica (Woodruff y Meinzer 2011). Estudios realizados en coníferas de las especies de Cupressaceae muestran como estas especies tienen una mayor resistencia a la cavitación, con un xilema más resistente que les permite soportar mayores tensiones hidráulicas, debido a que la falta de agua pueden generar burbujas de aire en el xilema dificultando el transporte de agua en la planta (Choat et al. 2012; Carnicer et al. 2013; Brodribb et al. 2014). Un estudio realizado por Zimmer et al. (2016), en 4 especies de araucarias, *A. bidwillii*, *A. cunninghamii*, *A. heterophylla* y *Wollemia nobilis* en Australia, mostró que estas especies son predominantemente isohídricas, esto quiere decir un control estricto del potencial hídrico de la hoja, cerrando los estomas y restringiendo el intercambio de gases para evitar un daño en el xilema. Por otra parte el autor Brodribb et al. (2014) realizó estudios en la familia Araucariaceae donde mostraron que el xilema era vulnerable a la sequía, pero producen altos niveles de ácido abscísico manteniendo cerrados los estomas bajo sequía.

2.2 Hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

Los bosques de *A. araucana* que han evolucionado en suelos provenientes de cenizas volcánicas presentan bajas concentraciones de nitrógeno y fósforo (Donoso et al. 2008; Huygens et al. 2008). Bajo este escenario de restricción nutricional esta especie ha desarrollado una estrategia funcional compensatoria, las asociaciones simbióticas con

hongos micorrícicos arbusculares (HMA), que permiten suplir gran parte de estas deficiencias nutritivas en estos ecosistemas (Smith y Read 2008; Diehl y Fontenla 2010). Los HMA confieren beneficios directos a las plantas hospederas, vinculados principalmente con la nutrición mineral, las relaciones con el agua y la resistencia a estrés biótico y abiótico, y a cambio la planta provee al hongo de fotoasimilados (Fernández 2012; Toju y Sato 2018). Los hongos micorrícicos se caracterizan por tener un crecimiento inter e intracelular en la raíz de la planta, generando dos tipos de estructuras, arbusculos y vesículas (Barrer 2009). Los arbusculos son hifas que se dividen dicotómicamente, son invaginados por la membrana plasmática de las células corticales y presentan periodos de vida cortos, mientras que las vesículas son estructuras de almacenamiento, principalmente glicógeno y grasas que se forman en la parte terminal de las hifas (Barker et al. 1998). Además, los HMA producen una glicoproteína insoluble de elevado peso molecular denominada glomalina, que se ha encontrado en suelos de diversos ecosistemas y con relativa abundancia (Borie et al. 2006; Chávez et al. 2020). Esta glicoproteína presenta una fuerte capacidad cementante y alta estabilidad en el suelo (Rillig et al. 2002). Por lo tanto, el comportamiento recalcitrante de la glomalina junto a su naturaleza glicoproteica y, su aparente característica hidrófoba que protege las hifas de las pérdidas de nutrientes y agua, sugieren que es una biomolécula muy estable con una alta capacidad de humectación, permitiendo con esto disminuir la erosión y pérdida de nutrientes, por lo que estas proteínas fúngicas otorgarían gran estabilidad estructural en los suelos (Rillig 2005). Los mecanismos por los cuales los HMA permiten una mayor tolerancia al estrés, es mediante el control de las características morfológicas, fisiológicas, genéticas y bioquímicas de las plantas (Bahadur et al. 2019), a nivel morfológico se produce un desarrollo de raíces adventicias, a nivel fisiológico regulación de fitohormonas, donde la molécula señalizadora de importancia que regula la interacción entre planta y hongo sería la estrigolactona (Ruiz-Lozano et al. 2016). Además, de estimular la expresión de genes de aquaporina en las células corticales de la raíz (Li et al. 2013) y a nivel bioquímico se mejora la producción de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Bahmani et al. 2018). Al respecto, estudios ecofisiológicos han demostrado que los HMA aumentan el ingreso de agua a las plantas (Augé et al. 2001; Ruiz-Lozano 2003). También se ha observado una mayor tolerancia al estrés por sequía en *Cupressus atlántica* inoculada con HMA, la cual fue cultivada en macetas bajo diferentes regímenes de agua donde la inoculación promovió el crecimiento y un mayor contenido relativo de agua

en hojas (Zarick et al. 2016). Otras aplicaciones de los HMA ha sido para procesos de fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados, mejorando la fitoextracción y fitoestabilización de Plomo, Zinc y Cadmio en plantas de *Robinia pseudoacacia* y *Populus simonii*, permitiéndole a la planta tolerar mayores cantidades de metales pesados acumulándolos en hojas y raíces (Yang et al. 2015). Debido a que la asociación más común es la de HMA la cual involucra a más del 80 % de las plantas terrestres incluyendo angiospermas, gimnospermas, pteridofitas, y musgos (Harrier 2001; Wang y Qiu 2006; Pressel et al. 2010), se han podido aplicar y estudiar en diferentes especies de interés comercial, forestal y ornamental. Por ejemplo, en plántulas de *Zea mays* donde se mejoró la tolerancia al estrés salino, manteniendo estable parámetros fisiológicos como capacidad fotosintética, concentración de pigmentos, actividad de la rubisco e intercambio de gases (Yan Lu y Tong 2018). Otros estudios realizados en *Cenostigma pyramidale* y *Zelkova serrata* de interés medicinal y ornamental mostró que la simbiosis con HMA produjo un aumento significativo de la biomasa de brotes y tolerancia al estrés salino (Frosi et al. 2017; Wang et al. 2019). Otras aplicaciones de los HMA de gran interés son los cultivos agrícolas y hortícolas, proporcionando a los cultivos una mayor absorción y traslación de nutrientes minerales más allá de la zona de agotamiento de la rizosfera de la planta con una mejoría en la absorción de nutrientes y agua. Además, de afectar el equilibrio fitohormonal actuando como biorregulador (Rouphael et al. 2015). A parte de los cultivos de interés agrícola y forestal que pueden verse beneficiados por la aplicación de HMA, hay otros potenciales usos que se han propuesto en el área de reforestación, restauración, conservación y paisajismo de especies nativas y endémicas (Sanon et al. 2010; Chen et al. 2018). Sin embargo, los proyectos de restauración y conservación tienen un éxito muy limitado o fracasan (Thomas et al. 2014). Estudios pertinentes al tema se han hecho en *Araucaria angustifolia* micorrizada con *Glomus clarum*, mejorando significativamente el crecimiento de plántulas mostrando esta especie una alta dependencia a la asociación micorrícica, lo que permitiría una reintroducción de plántulas a campo con mayor éxito (Zandavalli et al. 2004). Aunque en su mayoría estos estudios se enfocan en los posibles beneficios aplicados a la restauración y conservación ecológica de especies y mejoramiento de suelos degradados. Hasta el momento los HMA no se han convertido en una herramienta biotecnológica masiva en planes de restauración ecológica (Asmelash et al. 2016; Chen et al. 2018).

2.3 Hongos endófitos (HE)

Las plantas terrestres además de generar asociaciones simbióticas con hongos micorrícicos también presentan en sus tejidos hongos endófitos, organismos que habitan al interior de la planta en cualquiera de sus órganos sin causar daño aparente al huésped (Petrini 1991; Terhonen et al. 2019). Los HE pueden ser beneficiosos para las plantas, aunque esta relación mutualista puede cambiar y convertirse en patógena bajo ciertas condiciones ambientales adversas para el huésped, además las interacciones con otros microorganismos y los diferentes genotipos que presentan las plantas generan variadas respuestas que van desde el mutualismo al parasitismo (Redman et al. 2001; Eaton et al. 2011; Hardoim et al. 2015). Un estudio realizado con *Phialocephala fortinii* en interacción con ectomicorrizas inoculadas en las especies de abeto *Pseudotsuga menziesii* y *Picea abies* mostraron que la presencia de *P. fortinii* reducía el crecimiento de las especies de abeto a medida que aumentaba la temperatura, pero a la vez protegía las raíces de ataques de patógenos (Reininger y Sieber 2012). *Phialocephala fortinii* es una especie que abunda en coníferas donde un estudio realizado en abetos de noruega mostro un efecto virulento que varió de neutro a patógeno y afectaba de manera diferencial al rendimiento de la planta (Tellenbach et al. 2011). Por otra parte, las investigaciones que se han realizado en hongos endófitos tienen múltiples aplicaciones como lo son medicina, agricultura, industria de la madera, minería y conservación ecológica (Tiwari 2015; Yadav et al. 2017; Settu et al. 2018). Por ejemplo, Estudios realizados en cebada inoculadas con endófitos extraídos de parientes silvestre de la cebada, creciendo en hábitats con deficiencia de agua, han demostrado un incremento en el rendimiento y aumento de peso seco en grano (Murphy et al. 2018). Sin embargo, como se ha mencionado las condiciones ambientales adversas influyen en el comportamiento de los endófitos sobre la salud y desarrollo de las plantas. Un estudio realizado en *Festuca rubra* gramínea nativa de Europa, mostro que en condiciones como falta de agua y un suelo pobre en nutrientes provocaban un comportamiento parasito en los HE inoculados, donde se obtuvo una disminución de la biomasa total de la planta (Ahlholm et al. 2002). Debido a las respuestas contradictorias por parte de los endófitos un estudio de meta-análisis demostró que las plantas colonizadas con HE experimentaban una reducción en la tasa de supervivencia y crecimiento con respecto a las plantas no colonizadas, independientemente de los simbioses adicionales que se agregaran al

huésped (Larimer et al. 2010). Al respecto, un trabajo realizado en *Verbascum lychnitis* mostro que la interacción de HMA más HE proporcionaba mayor biomasa en las plantas. Sin embargo, la inoculación de HE en ausencia de HMA afectó negativamente el desarrollo de la planta y disminuyó la tasa de supervivencia, las cuales fueron sometidas a estrés por metales pesados (Wezowicz et al. 2017). Por otra parte, investigaciones realizadas en *A. araucana* en relación a los microorganismos que habitan en esta especie, han tenido diferentes enfoques que van desde encontrar organismos de interés biotecnológico, análisis filogenéticos y posibles organismos que puedan ser la causa de la enfermedad que está presentando *A. araucana*, como lo fue un estudio realizado en argentina en el Parque Nacional Lanín, en este estudio se analizaron diferentes variables como insectos fitófagos, hongos endófitos y análisis de suelos, según los autores la enfermedad de araucaria no se debería a una sola causa, si no que a un proceso de múltiples factores asociados a sequía prolongada, ya que no se encontraron organismos potencialmente patológicos en las araucarias estudiadas (Velez et al. 2018). Otro estudio realizado en araucarias por Besoain et al. (2017) aislaron el endófito *Diplodia mutila*, el cual causa la enfermedad llamado cancro gomoso, consistente en lesiones necróticas de color naranja en las hojas y exudación gomosa blanca. También en otro estudio se encontró una nueva especie asociada *A. araucana* llamado *Ophiostoma pehueninum* basado en análisis filogenéticos de las secuencias ITS, β -tubulina y EF-1 α (Zapata et al. 2018). Además, se han hecho análisis filogenéticos de un hongo parasito llamado *Uleiella chilensis* el cual ocasiona la pudrición de las semillas de araucaria (Riess et al. 2016). Uno de los últimos estudios publicados sobre araucaria, se aisló un hongo a partir de ramas parcialmente muertas del Parque Nacional Conguillio, el cual fue identificado mediante herramientas moleculares, el hongo fue identificado con la especie llamada *Diplodia Africana* el cual es patógeno, la patogenicidad se probó inoculando plántulas de araucaria las cuales presentaron necrosis foliar y lesiones de floema marron (Zapata y Schafer 2019).

III. Hipótesis

H1: La inoculación de un consorcio de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y hongos endófitos (HE) en plántulas de *Araucaria araucana* aumentarán la tolerancia al estrés por sequía.

H2: La inoculación de un consorcio de hongos endófitos (HE) en ausencia de micorrizas arbusculares afectará negativamente las variables morfo-fisiológicas de plántulas de *Araucaria araucana* sometidas a estrés por sequía.

IV. OBJETIVOS



4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y hongos endófitos (HE) en variables morfo-fisiológicas de plántulas de *Araucaria araucana* bajo estrés por sequía

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de HMA y HE en raíces de *A. araucana* previo a la aplicación de estrés por sequía.
- Evaluar el efecto de los HMA y HE en variables morfo-fisiológicas en plántulas de *A. araucana* bajo estrés por sequía.
- Cuantificar diferencias en la producción del osmolito prolina en hojas de plántulas de *A. araucana* posterior al estrés por sequía.

V. Metodología

5.1 Obtención de las muestras de suelo y material vegetal

Para la obtención de micorrizas arbusculares se recolectaron muestras de suelo a partir de la rizosfera de árboles adultos de *Araucaria araucana* del Parque Nacional Nahuelbuta (PNN: 37°47'00"S 72°59'00"O). Las muestras vegetales como hojas y raíces se extrajeron de plantas adultas de araucarias metodología descrita por Chávez et al. (2020). para posteriormente las muestras ser trasladadas al laboratorio de Biotecnología de Hongos de la Universidad de Concepción campus Los Ángeles para su posterior análisis.

5.2 Separación de esporas a partir de las muestras de suelo

Para la separación de esporas se procedió según metodología de Brundrett (1996), se preparó 200 ml de una solución de sacarosa al 70% con agua destilada diluyendo en agitador magnético, luego se pesaron 25 g de muestra de suelo en tubos falcon. Las muestras se filtraron a través de cuatro tamices (500, 250, 150 y 53 μ M respectivamente). El material retenido en el tamiz de 53 μ M fue dividido en cuatro tubos de centrifuga más 25 ml de agua destilada. Posteriormente, se agregaron 25 ml de solución de sacarosa en el fondo de los tubos de centrifuga utilizando una jeringa unida a una sonda. Luego se procedió a centrifugar las muestras a 3000 rpm por 10 min. El sobrenadante que contenía las esporas fue vaciado en un tamiz de 53 μ M para lavarlas con agua de grifo y así eliminar el exceso de sacarosa, las esporas fueron colocadas en nuevos tubos de centrifuga más agua destilada con lactoglicerol para su posterior identificación mediante taxonomía (datos no mostrados). Se identificaron especies de *Acaulospora laevis*; *A. scrobiculata*; *A. punctata*; *Scutellospora calospora*; *Claroideoglopus cloroideum*; *C. etunicatum*; *Funneliformis mosseae*; *Paraglopus occultum*; *Glomus badium*; *G. intrarradices*; *Glomus sp.* y *Gigaspora margarita*. . Posteriormente las esporas de estas especies fueron cultivadas en consorcio en plantas trampas.

5.3 Cultivo de plantas trampas

Para la activación de los HMA presentes en las muestras de suelo (identificadas en el punto 5.2) que luego se usarían como inóculo, se utilizaron plantas trampas de la familia Asteraceae (*Tajetes patula*) conocida comúnmente como margarita, cultivadas en sustrato

compuesto por arena, vermiculita y turba en una proporción 2:2:1 más 25 g de suelo nativo más esporas aisladas. Después de 6 meses se evaluó la colonización de las raíces, las cuales fueron cortadas y mezcladas con el sustrato obteniendo así el inóculo para ser aplicado en plántulas de araucaria.

5.4 Aislamiento de hongos endófitos

Para el aislamiento de hongos endófitos se utilizaron acículas (hojas) y raíces de Araucarias obtenidas del Parque Nacional Nahuelbuta, para ello se utilizó la metodología de Vaz et al. (2014). Para ello, las raíces fueron lavadas cuidadosamente para eliminar toda la tierra, luego lavadas con agua destilada estéril, posteriormente se esterilizaron superficialmente utilizando hipoclorito de sodio al 10% por 10 min y etanol al 70% por 1 min, y para las acículas hipoclorito de sodio al 2% por 3 min y etanol 75% por 30 s. Las raíces y acículas al finalizar la esterilización superficial fueron lavadas con abundante agua destilada estéril. Las raíces y acículas ya esterilizadas se cortaron de unos 5 mm aproximadamente y se colocaron en placas Petri con extracto de malta agar (EMA) 1% durante 7 días, luego se aislaron las cepas obteniéndose un total de 37 hongos endófitos, los cuales fueron identificados mediante herramientas moleculares (datos no mostrados) de los 37 endófitos se utilizaron 4 especies para ser inoculadas en *A. araucana*. *Phialocephala fortinii*, *Penicillium melinii*, *Umbelopsis dimorpha* y *Preussia cymatomera*, estas especies fueron cultivadas en 250 ml de medio líquido de extracto de malta 1% durante 1 mes, posteriormente el micelio fue filtrado y la biomasa micelial se mezcló con agua destilada y se trituró durante 5 s. utilizando minipimer para utilizar posteriormente como inóculo.

5.5 Inoculación de plántulas de *A. araucana* y ensayo de estrés hídrico

Se utilizaron 96 plántulas de *A. araucana* obtenidas de semillas (piñones) germinadas en el invernadero de Universidad de Concepción, después de 8 meses desde la germinación las plántulas de *A. araucana* se trasplantaron a bolsas de plásticos con suelo esterilizado compuesto de turba y perlita en proporción 1:1. Para la inoculación de *A. araucana* se utilizaron 25 g de inóculo de HMA (ver 5.3) aplicados directamente en las raíces de las plántulas. Para la inoculación del consorcio de HE las plántulas de Araucarias fueron inoculadas con 10 ml de micelio triturado (1.5792 g de inóculo/planta) aplicadas con un jeringa directamente en el sistema radical de la planta (en tres puntos) dejando colonizar las

raíces durante 5 meses. Las 96 plántulas se organizaron en diferentes tratamientos (Fig.2), siendo distribuidas de manera aleatoria en el invernadero con rotaciones sucesivas. Los ensayos fueron mantenidos a riego 1 a 2 veces por semana durante 5 meses. Posteriormente se sometieron a diferentes tratamientos hídricos al 100%, 75% y 25% según metodología de Zarik et al. (2016). Para ello se pesó una maceta con suelo seco obteniéndose (P1) luego esta maceta se regó hasta saturación dejándola escurrir por 24 h para luego obtener P2, la diferencia entre P2-P1 correspondió al 100% de capacidad de campo, para obtener el volumen de agua para los tratamientos de 75% y 25% se calcularon de la siguiente manera: $0.75 \times (P2 - P1)$, $0.25 \times (P2 - P1)$. Las plántulas fueron regadas 3 veces por semana durante 2 meses bajo estos tratamientos de agua.

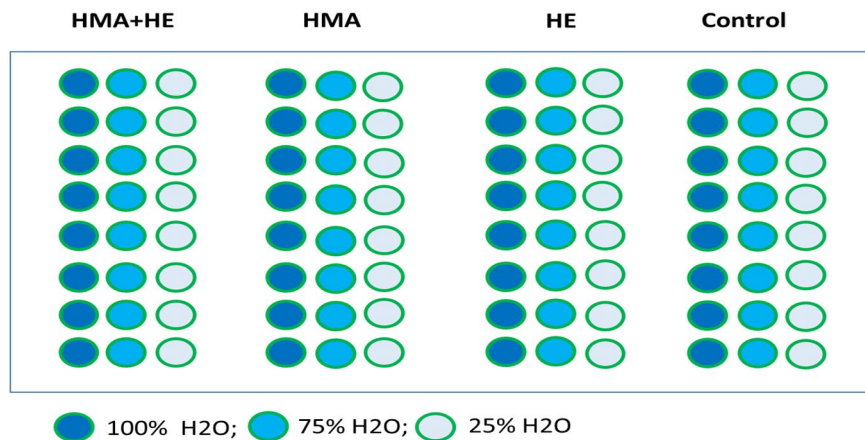


Fig. 2. Esquema de tratamientos hídricos y sus respectivos inóculos. HMA: hongos micorrícicos arbusculares; HE: hongos endófitos.

5.6 Evaluación del porcentaje de colonización de HMA y presencia de endófitos

Terminado los 5 meses de colonización se retiraron muestras de raíces de las plántulas inoculadas con HMA y HMA+HE. Se procedió según la metodología de Padamsee et al. (2016). Las raíces fueron lavadas con agua de grifo y almacenadas con etanol al 70% en tubos de centrifuga, luego se eliminó el etanol para colocar las raíces en KOH al 10% por 1 hr a 95°C en un calefactor, terminado ese tiempo se lavaron tres veces con agua destilada más hipoclorito de sodio para eliminar KOH y se cortaron las raíces dejándolas de 1 cm aprox. Luego se agregó HCl al 10% en las raíces por 3 min, después se eliminó el HCl y se

agregó azul de tripano por 1 h a 95°C en baño de agua. Posteriormente se eliminó el exceso de tinción colocando las raíces en lactoglicerol diluido y finalmente observadas en microscopio óptico motic BA-310. El porcentaje de colonización de HMA y la presencia de HE se estimó observando vesículas, arbusculos y micelio para los HMA y micelio de septo oscuro más microesclerosios para los HE, mediante el método de intercepción de línea (Phillips y Hayman 1970).

5.7 Eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (Fv/Fm)

Finalizada las 8 semanas de estrés hídrico se midió la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (Fv/Fm) de las hojas de Araucaria, usando un fluorímetro Hansatech modelo pocket PEA Chlorophyll fluorimeter. Las mediciones se realizaron en hojas adaptadas a la oscuridad usando clips de hojas durante 20 min. El cálculo fue realizado por el instrumento a partir de la relación de fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) que refleja la eficiencia cuántica máxima del PSII (Aghai et al. 2019).

5.8 Contenido relativo de agua (CRA)

De acuerdo a la metodología de Yamasaki y Dillenburg (1999) con modificaciones para obtener el CRA, las hojas se recolectaron de la sección media de las plántulas, se pesaron inmediatamente obteniendo el peso fresco (PF). El peso fresco obtenido de cada muestra estuvo por encima del mínimo de 0.5 g. Para la obtención del peso turgente (PT) se colocaron las hojas en agua destilada durante 24 h dentro de placas Petri cerrada. Luego se pesaron periódicamente hasta peso constante, finalmente las hojas fueron secadas en horno durante 48 h a 72°C obteniéndose el peso seco (PS). La ecuación utilizada para el cálculo fue:

$$CRA (\%) = [(PF - PS) / (PT - PS)] * 100.$$

5.9 Concentración de pigmentos fotosintéticos

Para la obtención de los pigmentos fotosintéticos se utilizó la metodología de Aroca (2001), se extrajeron 3 discos foliares de 5mm cada uno de la tercera hoja, siendo sumergidos en 1 ml de acetona (80% v / v). Posteriormente, se calentó a 80 ° C durante 10 min para extraer los pigmentos. La absorbancia de los extractos se midió a 470, 646,8 y 663,2 nm con un

espectrofotómetro. Los coeficientes de extinción y las ecuaciones utilizadas fueron reportados por Lictenthaler (1977). Dichos ensayos fueron llevados a cabo en CIMYSA (centro de investigación y sustentabilidad agroambiental) de la Universidad de la Frontera.

6.0 Asimilación de CO₂

Para la asimilación de CO₂ se utilizó el equipo targas-1, las mediciones fueron realizadas durante la mañana (entre las 9:00 y 12:00 h) y se utilizaron 3 réplicas por tratamiento. Para las mediciones de CO₂ de las acículas de araucaria se adaptó uno de los accesorios del equipo, la cámara de respiración de suelo SRC-2 (en modo CPY), obteniendo la asimilación de CO₂ (valores negativos) o respiración (valores positivos). Las condiciones de las medidas fueron 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura 22°C y una concentración de CO₂ de 400 μmol .

6.1 Variables morfológicas y tasa de mortalidad

Para realizar las respectivas mediciones alométricas se utilizó regla métrica y pie de metro, las plantas fueron diseccionadas con bisturí, la raíz fue cortada desde su primera proyección en el tallo, el tallo fue considerado entre el meristema apical y antes de la primera proyección de la raíz. Para la medición del diámetro del tallo (DAC: diámetro a la altura del cuello) se realizó la medida en la zona inferior, antes de la primera proyección de una raíz. Posteriormente las plántulas fueron diseccionadas, separando la parte aérea y radicular las cuales fueron secadas en estufa a 72 °C por 48 horas obteniéndose el peso seco (g). Para obtener la mortalidad de las plántulas se calculó como la frecuencia de plántulas que murieron al finalizar el experimento.

6.2 Determinación de prolina foliar

La determinación colorimétrica de la prolina se realizó de acuerdo a Bates et al. (1973) basado en la reacción de la prolina con la ninhidrina. Se obtuvieron muestras de 0,5 g de hojas de la sección media de la plántula, las cuales fueron molidas usando nitrógeno líquido y almacenadas en tubos de centrifuga. Para comenzar la extracción de prolina se agregaron 10 ml de ácido sulfosalicílico al 3% a cada tubo, luego se agitaron las muestras en shaker a 250 rpm por 60 min. Posteriormente, se filtró cada muestra usando papel filtro Whatman n°1, al filtrado se agregaron 2 ml de ninhidrina más 2 ml ácido acético glacial dejando las muestras durante 1 hora en agua a 100° C. A continuación las muestras se enfriaron en agua con hielo dejando reposar por 15 min, luego se agregaron 4 ml de tolueno y se agitaron

en vortex por 60 s, se colecto fase superior de la reacción y finalmente se midió la absorbancia a 520 nm. La concentración de prolina se calculó utilizando la curva de calibración obtenida previamente (Anexo1).

6.3 Análisis estadísticos

La normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza se evaluaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. La significación estadística se determinó usando el test de tukey ($p < 0.05$), Además, se realizó un ANOVA factorial para evaluar el efecto de la doble inoculación y niveles de riego en las plántulas. Para lo análisis, los valores porcentuales fueron transformados a través de $\text{Arcosin}\sqrt{(x/100)}$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software STATISTICA ver. 10 (Statsoft).



VII. Resultados

7.1 Porcentaje de colonización

Los porcentajes de colonización obtenidos en raíces de araucaria, mostraron una alta colonización por parte de las plantas inoculadas con HE y HMA+HE después de 5 meses de su inoculación (Fig.3) alcanzado un 58% para el grupo HE y 60% para los HMA+HE, siendo estos valores significativamente más altos en comparación con las plantas inoculadas solo con HMA, las cuales presentaron un 33% de colonización. Las raíces inoculadas con HMA presentaron escasa cantidad de arbusculos y vesículas, pero una gran cantidad de micelio en las células. Sin embargo, la colonización por parte de los HE mostro gran cantidad de estructuras como microesclerosios e hifas melanizadas (Fig 4).

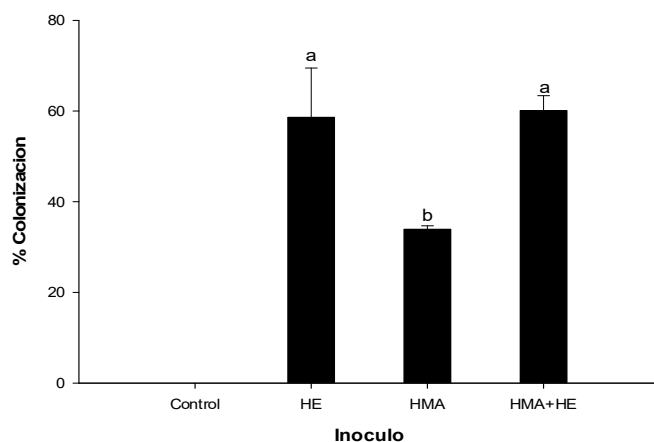


Fig. 3. % Colonización en plántulas de *A. araucana* previo al tratamiento de sequía. Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (ANOVA, test de tukey)

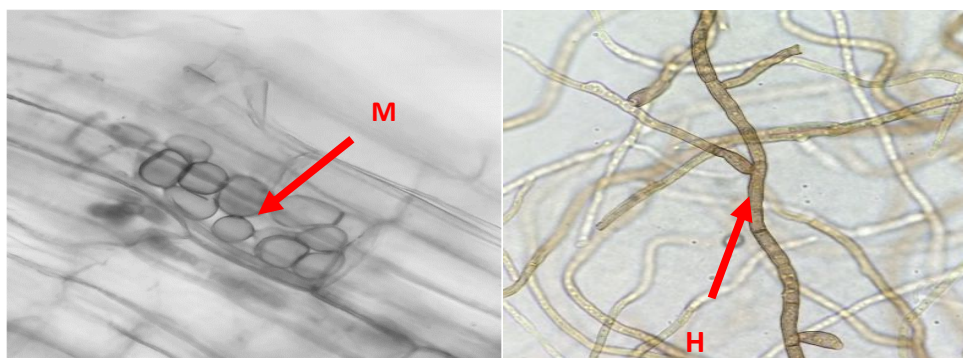


Fig. 4 Estructuras del hongo endófito *Phialocephala fortinii*. M: microesclerocios; H: hifas melanizadas.

7.2 Variables morfológicas y tasa de mortalidad

Las plántulas inoculadas con HMA y HMA+HE al 100% de riego, presentaron una altura significativamente mayor en comparación al grupo control. La altura obtenida en plántulas de araucaria no presentó diferencias significativas en ninguno de los tratamientos aplicados al 25 y 75% de riego (Fig.5) (comparado en forma independiente). Sin embargo, al 100% de riego se observó que HMA y HMA+HE presentaron mayor altura siendo esta diferencias significativas. Por otro lado, para el diámetro de las plántulas en general se observó mayores valores al 100 % de riego, siendo estas diferencias significativas si se comparan con el 25 % de riego, a excepción del grupo control que no presento diferencias significativas (Fig.6).

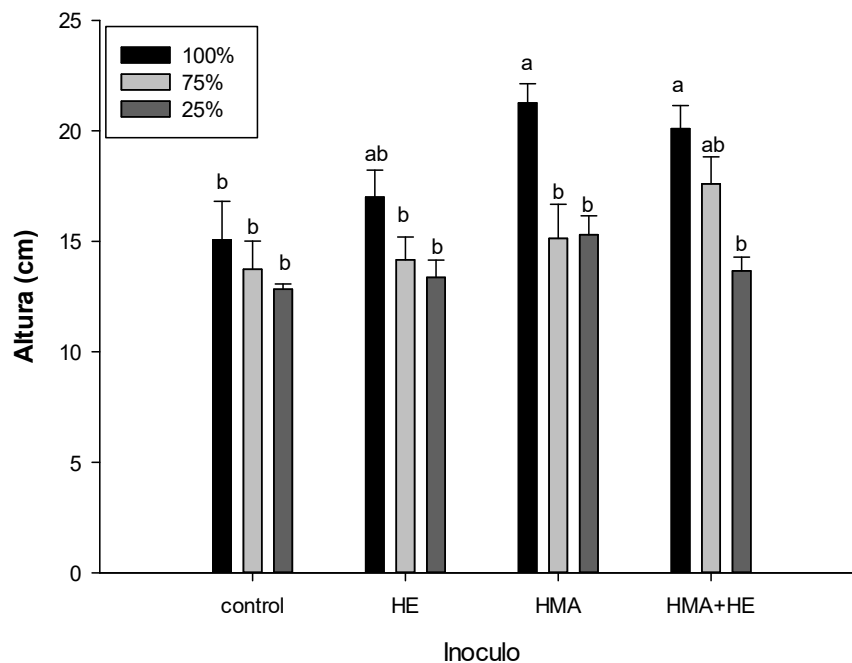


Fig.5. Altura de plántulas de *A. araucana* bajo diferentes tratamientos hídricos e inóculos fúngicos, Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (ANOVA, test de tukey)

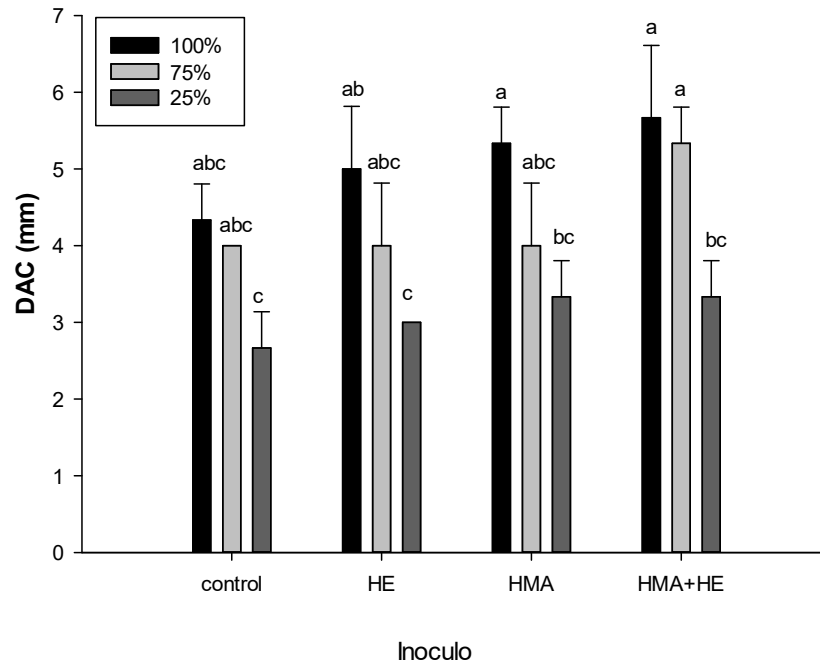
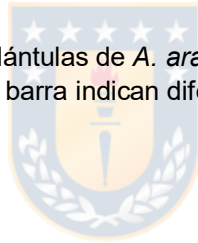


Fig. 6. Diámetro altura de cuello (DAC) en plántulas de *A. araucana* bajo diferentes tratamientos hídricos e inóculos fúngicos, Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (ANOVA, test de tukey)



La biomasa aérea en general mostro mejor respuesta en los tratamientos que contaban con la aplicación de HMA y HMA+HE al 100 y 75% de riego. Sin embargo, el grupo control al 25% de riego se observó la menor producción de biomasa aérea, siendo estas diferencias significativas si se comparan con riego al 25% con los tratamientos de HMA y HMA+HE (Fig.7). Para los resultados de biomasa radical el grupo HE al 25% de riego presento una menor biomasa, siendo esta significativamente más baja en comparación con las plantas inoculadas con HMA y HMA+HE al 25% de riego.

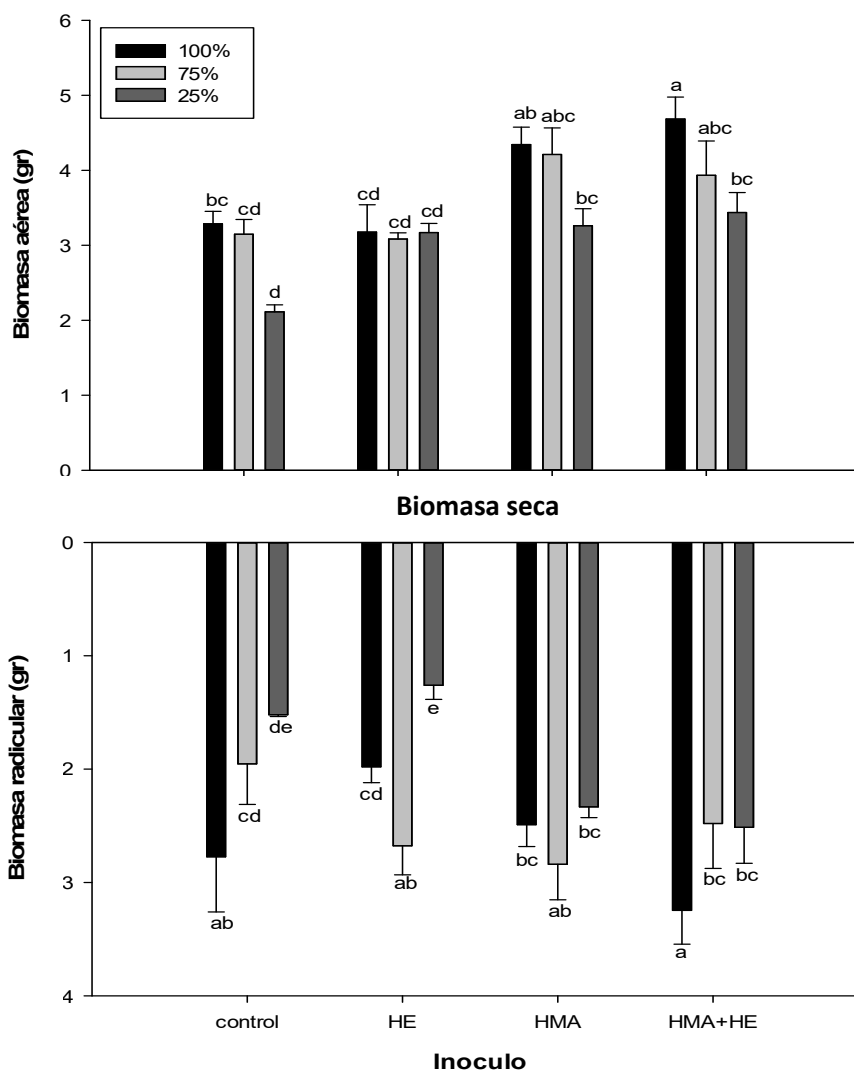


Fig.7. Biomasa de plántulas de araucaria, a: Biomasa aérea; b: Biomasa radicular. Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (ANOVA, test de tukey)

La tasa de mortalidad obtenida al finalizar el experimento mostro que las plántulas inoculadas con HMA+HE, presentaron solo un 25% de mortalidad ante el estrés por sequía seguido del grupo inoculado con HMA alcanzando 50% de mortalidad. En cambio las plántulas inoculadas con HE obtuvieron la mayor tasa de mortalidad de un 87,5% finalizado el experimento (Tabla 1).

Tabla. 1. Tasa de mortalidad en porcentaje para plántulas de *Araucaria araucana* bajo diferentes tratamientos hídricos e inóculos fúngicos,

Tratamiento hídrico	Control	HE	HMA	HMA+HE
100%	0%	0%	0%	0%
75%	0%	0%	0%	0%
25%	75%	87,5%	50%	25%

7.3 Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fv/Fm)

Las mediciones realizadas después de dos meses de tratamiento hídrico con diferentes niveles de riego, mostraron que el grupo de plántulas de *Araucaria* inoculadas con HE y el grupo control a un 25% de riego, obtuvieron el menor rendimiento fotosintético sin diferencias significativas entre estos dos grupos, con un Fv/Fm de 0.39 y 0.44 respectivamente (Fig.8). Sin embargo, los grupos de plántulas inoculadas con HMA y HMA+HE a un 25% de riego, presentaron valores de Fv/Fm dentro del rango óptimo.

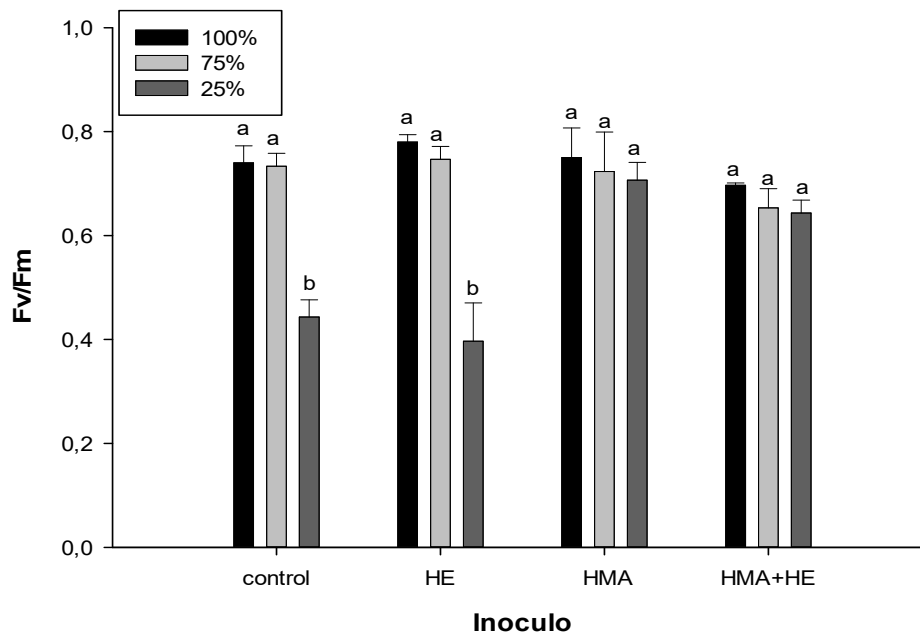


Fig.8. Rendimiento cuántico máximo del PII en plántulas de *A. araucana* bajo diferentes tratamientos hídricos e inóculos fúngicos, Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (ANOVA, test de tukey)

7.4 Contenido relativo de agua

El contenido relativo de agua obtenido de las hojas de araucaria, mostro que las plántulas inoculadas con HE bajo estrés por sequía (25% de riego) presento la mayor pérdida del contenido de agua foliar, siendo estadísticamente significativo con todos los demás tratamientos excepto con el grupo control al 25% de riego. El porcentaje de agua perdida del grupo HE fue del 25% en comparación con las plántulas regadas al 100% usando el mismo inculo, y de un 33% para el grupo control (Fig.9). Sin embargo, las plántulas inoculadas con HMA y HMA+HE regadas con un 25% de agua, mantuvieron un contenido relativo de agua foliar del 61% y 66% respectivamente, en comparación con las plántulas regadas al 100% y 75%, sin mostrar diferencias significativas.

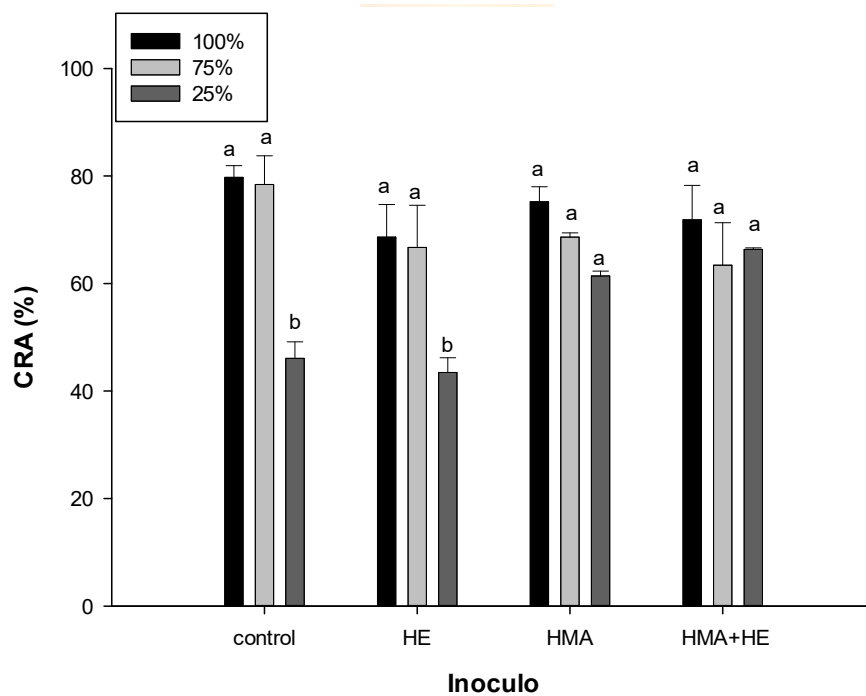


Fig.9. Contenido relativo de agua (CRA) bajo diferentes tratamientos hídricos e inóculos fúngicos, Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (ANOVA, test de tukey)

7.5 Concentración de pigmentos fotosintéticos

Los resultados obtenidos para la concentración de clorofila total, mostro que el grupo control y las plántulas inoculadas con HE y HMA, no presentaron diferencias significativas al 25% de riego. En cambio el grupo inoculado con HMA+HE al 25% de riego, fue significativamente mayor en comparación con los demás tratamientos, alcanzando una concentración de pigmentos totales de 9,5 mg cm² (Fig.10). Por otro lado, el grupo inoculado con HMA al 100% de riego, fue el que obtuvo la menor concentración de pigmentos en comparación con los demás tratamientos al 100% de riego.

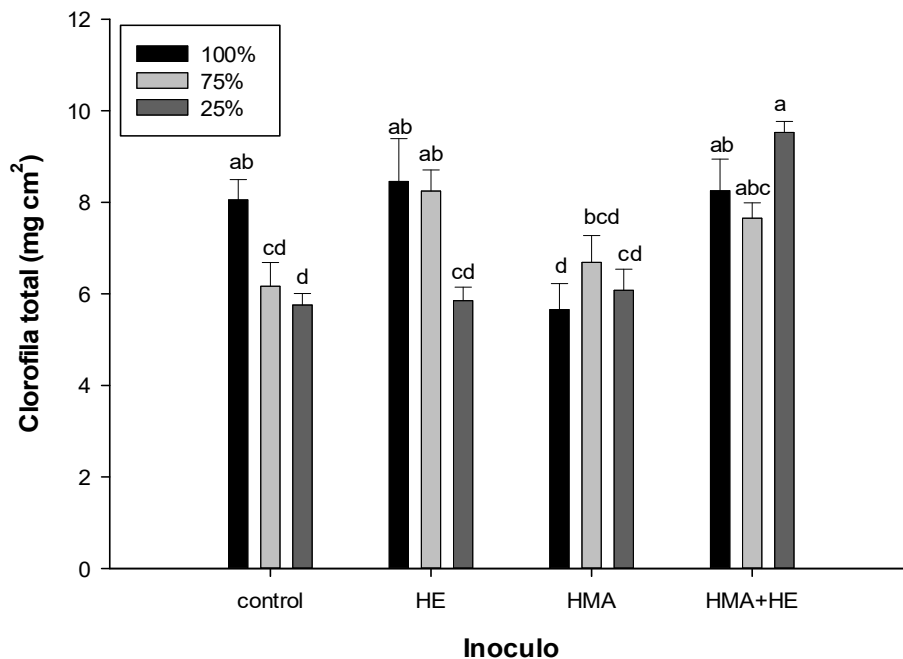


Fig.10. Contenido de clorofila total en acículas de araucaria bajo diferentes tratamientos hídricos e inóculos fúngicos, Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (ANOVA, test de tukey)

Los resultados para la clorofila a, b y carotenoides se muestran en la (Tabla 2). El grupo inoculado con HMA+HE con un 25% de riego, presento la mayor concentración de clorofila a, siendo significativamente mayor a los demás tratamientos. En cambio, para el contenido de clorofila b al 25% de riego no se obtuvieron diferencias significativas entre todos los grupos expuestos a estrés por sequía. Sin embargo, la concentración de carotenoides

obtenida por el grupo HMA+HE fue significativamente mayor a los demás grupos expuestos a estrés por sequía.

Tabla. 2. Efecto de la sequía en plántulas inoculadas con HE y HMA y su incidencia en los pigmentos fotosintéticos de acículas de *A. araucana*.

Inoculo		Clorofila a (mg)	Clorofila b (mg)	Carotenoides (mg)
Control	100%	5.96 ± 0.3 abc	2.62 ± 0.24 ab	2.6 ± 0.15 bc
Control	75%	5.48 ± 0.4 bcde	1.73 ± 0.09 d	2.4 ± 0.17 cde
Control	25%	5.14 ± 0.6 cde	1.84 ± 0.24 cd	1.8 ± 0.06 f
HE	100%	6.04 ± 0.7 abc	2.41 ± 0.25 abcd	2.4 ± 0.19 cd
HE	75%	5.92 ± 0.3 abc	2.33 ± 0.20 abcd	2.5 ± 0.23 cd
HE	25%	4.55 ± 0.6 cde	1.94 ± 0.32 bcd	1.8 ± 0.10 ef
HMA	100%	3.93 ± 0.4 e	1.73 ± 0.14 d	1.7 ± 0.25 f
HMA	75%	4.79 ± 0.5 cde	1.90 ± 0.11 cd	2.1 ± 0.10 cdef
HMA	25%	4.28 ± 0.3 de	1.80 ± 0.18 cd	1.9 ± 0.10 def
HMA+HE	100%	7.12 ± 0.4 a	2.83 ± 0.26 a	3.5 ± 0.16 a
HMA+HE	75%	5.55 ± 0.3 abcd	2.11 ± 0.02 bcd	2.5 ± 0.13 cd
HMA+HE	25%	7.04 ± 0.2 ab	2.49 ± 0.07 abc	3.2 ± 0.21 ab

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (ANOVA, test de tukey)

7.6 Asimilación de CO₂

Las tasas de asimilación de CO₂ para los grupos de plántulas con 75% de riego mostraron la mejor respuesta a la asimilación de CO₂. Por otra parte las plántulas con 25% de riego como el grupo control (32.7 ppm) y HE (16.3 ppm) fueron afectadas por el estrés por sequía presentando fotorrespiración. El grupo inoculado con HMA y HMA+HE al 100% y 25% de

riego presentaron tasas de asimilación de CO₂ similares (-28.0 y -28.6 ppm; -48.3 y -46.0 ppm respectivamente) de estos grupos las plántulas al 25% de riego mostraron asimilación de CO₂ estable ante el estrés por sequía en comparación con los grupos control y HE (Fig.11).

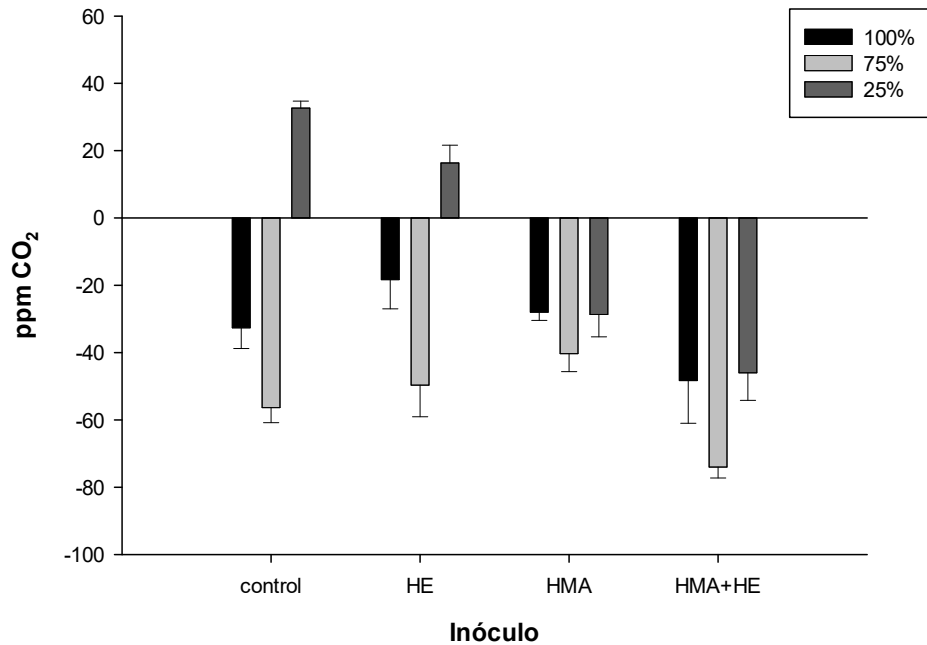


Fig.11. Asimilación de CO₂ en partes por millón de plántulas de Araucaria. Valores negativos indican asimilación de CO₂ y valores positivos liberación de CO₂.

7.7 Determinación de prolina foliar

Las concentraciones de prolina obtenidas después de 2 meses de tratamiento, mostraron que el grupo control, HE y HMA+HE al 25% de riego, obtuvieron las mayores concentraciones de prolina, siendo estas significativamente superiores en comparación a los demás tratamientos (Fig.12). Sin embargo, el grupo de plántulas de araucarias inoculadas con HMA al 25% de riego, presento bajas concentraciones de prolina bajo estrés por sequía. En general los tratamientos hídricos aplicados al 100% y 75% de agua de todos los tratamientos obtuvieron bajas concentraciones de prolina.

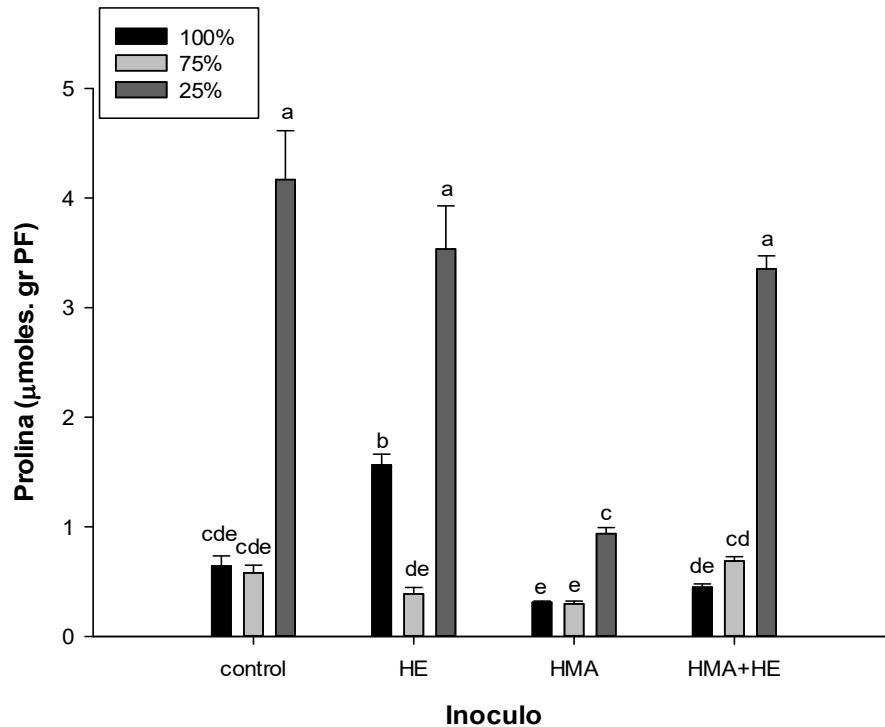


Fig.12. Contenido de prolina de acículas de araucarias bajo diferentes tratamientos hídricos e inóculos fúngicos. Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (ANOVA, test de tukey)

7.8 Análisis correlación de variables

En resumen de todas las variables estudiadas y sus interacciones se realizó un análisis de correlación Tabla 3. Se observaron correlaciones altamente significativas de las cuales se destacan las variables más importantes: Se obtuvieron correlaciones positivas entre rendimiento fotosintético (F_v/F_m), contenido relativo de agua, asimilación de CO_2 , pigmentos totales y variables morfológicas. Por otra parte, las correlaciones negativas obtenidas fueron entre la prolina, rendimiento fotosintético, contenido relativo de agua y diámetro del tallo.

Tabla 3. Análisis de correlación de variables. ns: $P > 0,05$; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$
Valores de p en verde correlación positiva, en amarillo correlación negativa.

	Carot	CloT	Clor a	Clor b	CRA	CO2	Altura	DAC	Bio Aer	Bio Rad	Prolina
Fv/Fm	,2701	,3508	,1450	,1739	,7739	,6536	,4390	,5159	,3479	,5384	-,6262
	ns	*	ns	ns	***	***	***	***	*	***	***
Carot	1,0000	,7917	,8970	,7509	,3825	,5145	,1162	,3876	,3461	,5230	-,0062
		***	***	***	*	***	ns	*	*	***	ns
CloT		1,0000	,8182	,7619	,2505	,3936	,0900	,2416	,1727	,4486	,0995
			***	***	ns	*	ns	ns	ns	**	ns
Clor a			1,0000	,8280	,2029	,3145	-,0358	,2555	,0946	,3500	,1913
				***	ns	Ns	ns	ns	ns	*	ns
Clor b				1,0000	,1558	,2389	,1099	,3181	,1963	,3790	,0468
					ns	ns	ns	ns	ns	*	ns
CRA					1,0000	,6313	,3586	,5274	,4167	,5876	-,5825
						***	*	***	*	***	***
CO2						1,0000	,2745	,4977	,5080	,5737	-,4844
							ns	**	**	***	**
Altura							1,0000	,6365	,6194	,4847	-,4662
								***	***	**	**
DAC								1,0000	,6173	,4245	-,5413
									***	**	***
Bio Aer									1,0000	,6062	-,4601
										***	**
Bio Rad										1,0000	-,4887
											**

VIII. Discusión

El estrés hídrico es un factor predominante de los suelos donde crece *Araucaria araucana*, con suelos poco profundos y material de escoria volcánica, dichas características edáficas están más expuestas a la actual sequía (Garreaud et al. 2017). Se sabe que las diferentes especies de Araucarias son altamente resistentes a la sequía, con mecanismos que involucran altos niveles de ácido abscísico (ABA) convirtiéndolas en especies fuertemente isohídricas, con un eficiente cierre estomático (Brodrigg et al. 2014; Zimmer et al. 2016). Además de generar asociaciones simbióticas con microorganismos del suelo, que les permiten tolerar episodios de sequía prolongada (Wu y Zou 2017). Para esto se realizó

una investigación con plántulas de araucaria sometiéndolas a estrés por sequía durante 2 meses. Los porcentajes de colonización de HMA obtenidos fueron bajos en comparación con los hongos endófitos, esto podría explicarse debido a que los porcentajes de colonización por parte de los HMA están sujetos a múltiples factores ambientales, fisiológicos y fenológicos de las plantas (Bueno et al. 2018), uno de esos factores es el aumento de humedad en el suelo y una disminución del oxígeno inhibiendo el desarrollo de micorrizas en raíces (Xue 2004; Wu et al. 2013), este factor podría explicar la baja colonización presentada en raíces de araucaria, debido a que fueron inoculadas en otoño pasando por la temporada de invierno con riego de 1 a 2 veces por semana lo que podría haber provocado un exceso de retención de humedad en el suelo.

Las plántulas inoculadas con HE, HMA y HMA+HE presentaron el mayor incremento en altura bajo condiciones óptimas de riego (100%), en comparación con los controles, en cambio, las plántulas expuestas al 25 % de riego (independiente del inóculo aplicado) no presentaron ningún efecto significativo en la altura y el diámetro de las plantas, esto podría deberse a que *A. araucana* es una especie de lento crecimiento donde se ha reportado un crecimiento en altura entre 3.10 y 3.55 cm al año (Gonzales 1998). Sumado a ello, los 7 meses que duro el estudio (5 meses de colonización y 2 meses de estrés hídrico) no fue tiempo suficiente para observar cambios morfológicos importantes en los grupos sometidos a estrés (entendiendo el lento crecimiento de Araucaria).

La biomasa aérea presentó mayor incremento en las plántulas de araucaria inoculadas con HMA y HMA+HE al 100% de riego e incluso al 25% de riego presentaron mayor producción de biomasa en comparación al grupo control, esto puede estar dado por el efecto beneficioso que pudiese generar la asociación con HMA en una mayor captura de agua y de nutrientes que estimulen su crecimiento (Toju y Sato 2018), esto no se observó para el grupo de los HE los cuales no presentaron diferencias con el control. Situación similar se observó con la producción de biomasa radicular donde los tratamientos que contemplaron aplicación de HMA independiente del tipo de riego presentaron la mayor producción de biomasa radicular. Los efectos de un consorcio de hongos endófitos, sobre la biomasa de las plántulas sometidas a estrés (25% de riego) fueron negativos, afectando principalmente a las raíces (Fig.7). Pero en situación de riego óptimo (100% y 75%) los HE no tuvieron efectos negativos sobre las plántulas de araucaria. Sin embargo, los efectos de los endófitos

mejoraron al interactuar con los HMA, obteniéndose diferencias significativas sobre la biomasa en comparación con el grupo control. Los estudios realizados en endófitos fúngicos como *P. fortinii*, han mostrado una disminución en la biomasa de las plantas relacionada con el aumento de temperatura y la sequía. Sin embargo esta cepa protege las raíces de ataques de patógenos e incrementa el nivel de cera en las acículas, debido a una regulación de los diferentes nutrientes necesarios para la planta (Tellenbach et al. 2011; Reininger y Sieber 2012;). Otras cepas fúngicas que se han aislado de coníferas son las especies de *Penicillium* spp, estas cepas son dominantes en las raíces de las coníferas junto a las especies de *Phialocephala* spp, según el estudio realizado por Ridout et al. (2017), estas especies serían xerotolerantes soportando ambientes secos, pero se desconoce si esta capacidad de tolerar ambientes secos, puede ser otorgada vía simbiosis a la planta. Estudios al respecto se han realizado solo en gramíneas, donde se ha obtenido esta tolerancia vía simbiosis utilizando HE del grupo clavicipitaceous, que solo pueden colonizar pastos y no especies leñosas (Rodríguez et al. 2008; Redman et al. 2011). Por otro lado los estudios realizados en especies de *Umbelopsis* spp. reportan que es un endófito que crece en tejidos del xilema de la raíz frecuentemente en especies de coníferas, con resistencia al calor, aunque los roles ecológicos de *Umbelopsis* aún son indeterminados (Hoff et al. 2004). Los resultados obtenidos en plántulas de araucaria sometidas a sequía sugieren que los HE no le otorgaron una mayor biomasa radicular y tolerancia a dicho estrés. Sin embargo, Los análisis realizados en la eficiencia del fotosistema II (Fig.8) mostraron que las plántulas de araucaria, son altamente dependientes de la simbiosis micorrícicas. Estas asociaciones han mostrado en diferentes estudios que las plantas toleran el estrés por sequía, al aumentar la biosíntesis de componentes antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa, protegiendo del daño oxidativo a los centros de reacción fotoquímico (Zhang et al. 2010; Abbaspour et al. 2012; Zarik et al. 2016). Como se pudo observar en los grupos que contenían HMA y HMA+HE bajo un estrés por sequía, mantuvieron estable el rendimiento fotosintético (Fv/Fm) mejorando la tolerancia al estrés, resultados similares se han obtenido en *Robinia pseudoacacia* inoculada con *Rizofagus irregularis*, la cual obtuvo valores estables de Fv/Fm sometida a estrés por sequía (He et al. 2017). Por otro lado, los efectos de la sequía en los grupos de plántulas inoculadas con HE redujeron drásticamente el Fv/Fm, a pesar de tener una alta colonización en raíces. Según Murata y Takahashi (2008) al producirse una disminución de la fotoquímica aumenta la absorción de la energía

fotónica, la cual desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno, dificultando la síntesis de la proteína D1 fundamental para el funcionamiento del fotosistema II. En este caso se sugiere que los hongos endófitos no presentaron función protectora para la plántula, aumentando la evidencia que los hongos endófitos que colonizan plantas sometidas a estrés abióticos, pueden actuar como parásitos oportunistas o en este caso como hongos comensalistas (efecto neutro) incrementando la carga metabólica de la planta (Ahlholm et al. 2002; Kogel et al. 2006). Este tipo de comportamiento disminuiría la tolerancia de las plantas al estrés abiótico como se ha verificado en el estudio realizado con HE y HMA por Wężowicz et al. (2017).

Los resultados con respecto al contenido relativo de agua, mostraron que las plántulas inoculadas con HMA y HMA+HE presentaron mayor porcentaje de agua bajo estrés por sequía, en comparación con el grupo control y HE (Fig. 9). Resultados similares se han obtenido en trabajos realizados en *Cupressus atlántica*, *Casuarina equisetifolia* y *Citrus tangerine* (Wu y Xia. 2006; Ouahmane et al. 2007; Zhang et al. 2010) los cuales muestran porcentajes de agua estables ante el estrés por sequía. Estos resultados son debido a que las micorrizas mejoran la adsorción de agua a través de la red de hifas, que se extienden más allá de la propia raíz de la planta, además de generar cambios morfológicos en las raíces de las plantas (Liu et al. 2017). También un mayor contenido de agua foliar podría explicarse mediante la producción de glomalina como se ha descrito por Chávez et al. (2020) en suelos donde se desarrolla *A. araucana*, sustancia que podría retener una mayor humedad favoreciendo el status hídrico de la planta (Zou et al. 2013). Además, un estudio indica que la inoculación con HMA muestran una producción mejorada de ABA (ácido abscísico), fitohormona relacionada con el cierre de estomas, regulando de manera eficiente la evapotranspiración (Calvo et al. 2013).

Las concentraciones de pigmentos fotosintéticos que se obtuvieron no mostraron diferencias significativas entre los grupos control, HE y HMA bajo estrés por sequía (25% de riego), donde el efecto del inoculo no tuvo ningún impacto sobre el contenido de clorofila a, b y carotenoides (Tabla 2). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en un estudio en citrus, donde el contenido de pigmentos no aumenta en presencia de HMA bajo estrés por sequía (Wu y Xia 2006). En otro estudio realizado en abeto y cedro inoculados con consorcio de endófitos bajo estrés por sequía, no mostro diferencias significativas entre

tratamientos con y sin inoculo después de 180 días de tratamiento (Aghai et al. 2019). Por otro lado, las plántulas de araucaria inoculadas con HMA+HE tuvo un impacto significativo bajo estrés por sequía (riego 25%), obteniéndose las mayores concentraciones de clorofila a y carotenoides. Resultados similares se encontraron al inocular plantas de *Verbascum lychnitis* con HMA y HE, en este estudio se verifico que el aumento en los pigmentos depende con qué tipo de endófito interaccionan los HMA, ya que otras interacciones no obtuvieron concentraciones de pigmentos significativas (Weźowicz et al. 2017). Se sabe que mayores concentraciones de carotenoides permiten a las plantas mejorar la capacidad antioxidante bajo un estrés abiótico, además, de proporcionar precursores para la síntesis de ABA y estrigolactonas, fitohormonas esenciales para tolerar un estrés abiótico y mejorar la colonización de HMA en las raíces de las plantas (Al-Babili y Bouwmeester 2015; Pandey et al. 2016).

La capacidad de asimilación de CO₂ por parte de las plantas está influenciada por diferentes factores ambientales que les rodea. Donde altas temperaturas, sequía y salinidad pueden provocar una reducción en la tasa de asimilación de CO₂ (Qaderi et al. 2019). El estrés por sequía induce el cierre de estomas para minimizar la pérdida de agua, provocando una disminución en la asimilación de CO₂ (Hamim 2004). Los porcentajes de agua foliar encontrados en los grupos control y HE bajo sequía, se correlacionan con una baja eficiencia fotosintética y reducida asimilación de CO₂ (Fig. 11), se sabe que una reducción en la fotosíntesis es provocada por la limitación estomática, como cierre de estomas o limitación no estomática, basado en alteraciones bioquímicas como regeneración de la rubisco y proteína D1 del PII (Signarbieux y Feller 2011). Una investigación realizada en *Robinia pseudoacacia* sometidas a salinidad mostraron que las plantas inoculadas con *Rizofagus irregularis* mantuvieron una asimilación de CO₂ estable sometidas a altas concentraciones de NaCl (Chen et al. 2017) estos resultados concuerdan con los obtenidos en araucaria inoculada con HMA, debido a que el estrés por sal y sequia provoca el mismo efecto, una disminución en la entrada de agua a la planta (Sanchez-Blanco et al. 2014). Por otro lado, estudios realizados por Manter et al. (2000) en Abeto Douglas colonizados con el hongo endófito *Phaeocryptopus gaeumannii* encontraron una disminución en la asimilación de CO₂, afectando el crecimiento de la planta, esto debido a que las estructuras del hongo como hifas y cuerpos fructíferos se alojaban en los estomas bloqueando el ingreso del CO₂. Además, Kimberley et al. (2010) encontraron una relación entre la patogenicidad del hongo

con el aumento de humedad y temperatura. Estos estudios podrían correlacionarse con los resultados obtenidos en este trabajo, donde las cepas de endófitos no mostraron una simbiosis mutualista para mejorar la asimilación de CO₂ en plántulas de araucaria, las cuales fueron sometidas a altas temperaturas (25°C a 37°C) además de la restricción hídrica.

Las interacciones entre plántulas de araucaria con HE y HMA sometidas a un 25% de agua, presentaron altas concentraciones de prolina. Se sabe que las plantas bajo condiciones estresantes acumulan diferentes tipos de osmolitos (Serraj y Sinclair 2002). La prolina es uno de los osmolitos que aumentan bajo condiciones de sequía o salinidad, esto permite utilizarlo como biomarcador indicativo de estrés abiótico (Schiop et al. 2015), este osmolito mantiene la turgencia celular y el equilibrio osmótico evitando la fuga de electrolitos (Hayat et al. 2012). En este estudio las plántulas del grupo control y HE fueron las más afectadas bajo un tratamiento de 25% de agua, presentando altas concentraciones de prolina (Fig.12), resultados similares se obtuvieron en un estudio realizado en la conífera *Picea abies* sometida a sequía sin inoculación de HMA o HE, presentando un importante incremento de prolina a los 48 días de tratamiento (Ditmarová et al. 2009). Por otra parte el grupo inoculado con HE también presentó una alta concentración de prolina, pero con una alta tasa de mortalidad, estos resultados podrían indicar que los HE solo aumentaron el estrés en las plántulas, como se observó en un trabajo realizado por Kia et al. (2018) en *Arabidopsis thaliana* y *Hordeum vulgare* usando un consorcio de endófitos bajo diferentes condiciones abióticas, en este estudio los HE competían por los nutrientes y agua presentando dependencia trófica, afectando la aptitud del huésped. Sin embargo, se observó que el grupo de plántulas de araucaria inoculado con HMA presentó la menor concentración de prolina. Resultados similares se obtuvieron en plantas de ciprés inoculadas con HMA regadas con 25% de agua mostrando un bajo contenido de prolina (Zarik et al. 2016). Estudios al respecto han encontrado que las plantas inoculadas con HMA inhiben la síntesis de prolina, disminuyendo la actividad de la 1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa, a la vez que aumenta la actividad de la prolina deshidrogenasa (Zou et al. 2013; Wu et al. 2017). Aunque estudios al respecto muestran resultados contradictorios, donde se indica que al tener plantas inoculadas con HMA bajo estrés por sequía, aumentaría los niveles de prolina en comparación con las plantas no inoculadas (Zhang et al. 2014;

Hazzoumi et al. 2015), en cambio otros estudios muestran una disminución de prolina en plantas inoculadas con HMA bajo estrés por sequía o salinidad y un incremento de prolina en plantas no inoculadas (Fan y Liu. 2011; Abbaspour et al. 2012). En este caso, los resultados que se obtuvieron en las plántulas de araucaria mostraron una baja concentración de prolina inoculadas con HMA, mostrándose como un buen indicador de que las plantas mejoraron su tolerancia al estrés por sequía según los resultados obtenidos para este tratamiento. Por otro lado la inoculación de HMA+HE presento la mayor concentración de prolina a un 25% de riego, siendo este grupo el que obtuvo la menor tasa de mortalidad, y variables fisiológicas estables ante el estrés por sequía. Estos resultados sugieren que la interacción entre estos microorganismos son beneficiosas para las plántulas de araucaria, debido a que los HE estimulan la síntesis de prolina (Saddique et al. 2018) y los HMA atenúan los posibles efectos negativos de los endófitos bajo estrés abiotico (Mrnka et al. 2009; Larimer et al. 2010; Reininger y Sieber 2012) manteniendo altos porcentajes de agua en las hojas, además de nutrientes importantes para el desarrollo de las plantas, mejorando notablemente la tolerancia al estrés por sequía (Begum et al. 2019). Estos resultados sugieren la importancia de las interacciones entre microorganismos simbioses, presentes tanto en la rizosfera como en los órganos de las plantas, mejorando la tolerancia ante un estrés abiótico.

Para finalizar, los análisis realizados en las diferentes variables mostraron una correlación positiva entre las variables morfo-fisiológicas y el rendimiento fotosintético (Fv/Fm) siendo altamente significativo, mostrando con esto que al haber un aumento en el rendimiento fotosintético se produce un aumento de biomasa, lo mismo para el contenido de agua foliar el cual aumenta a medida que mejora el Fv/Fm y la asimilación de CO₂, mostrando con esto una relación directa en estas variables. Sin embargo la concentración de prolina presento una correlación negativa la cual al aumentar provoco en la mayoría de los tratamientos una disminución en la biomasa, Fv/Fm, contenido de agua foliar, DAC y altura, bajo estos resultados la prolina sería un buen bioindicador de estrés en plántulas de araucaria. Aunque el grupo HMA+HE no mostro esta tendencia de correlación negativa en las variables, mostrando con esto una interacción positiva entre ambos inóculos y sus efectos en las diferentes variables morfo-fisiológicas de las plántulas de araucaria, mejorando la tolerancia al estrés por sequía.

IX. Conclusión

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los efectos de la sequía prolongada en plántulas de *Araucaria araucana* sin inoculación de HMA, afecta seriamente las variables fisiológicas con una alta tasa de mortalidad. Sin embargo, la inoculación de HMA y HMA+HE, presenta efectos positivos en *Araucaria araucana*, manteniendo estable variables fisiológicas tan esenciales como fotosíntesis, asimilación de CO₂ y contenido de agua foliar, mejorando notablemente la tolerancia ante el estrés producido por sequía prolongada.

En cambio la inoculación de un consorcio de HE en plántulas de araucaria, no presentaron un aumento en la tolerancia al estrés por sequía, teniendo las plantas un comportamiento muy similar al grupo control, donde se vieron afectadas variables fisiológicas de importancia para las plantas. En este estudio la inoculación de HE produjo una alta tasa de mortalidad, al igual que el grupo control, sugiriendo con estos resultados, que este tipo de microorganismos no mejorarían la tolerancia de las plantas de *Araucaria* al estrés por sequía.

Se concluye que la inoculación de HMA por sí solo, o su interacción con HE usados en este estudio, son beneficiosas para las plántulas de *A. araucana*. Bajo estos resultados no se rechaza la hipótesis 1. En cambio los hongos endófitos en ausencia de micorrizas arbusculares, y bajo condiciones abióticas estresantes como sequía, presentan un efecto nulo o neutro en las plántulas de *A. araucana*. Bajo estos resultados se rechaza la hipótesis 2.

X. Bibliografía

Aagesen DL (1998) on the northern fringe of the South American temperate forest. The history and conservation of the monkeypuzzle Tree. *Environ Hist* 3: 64–85.

Abbaspour H, Saeid-Sar S, Afshari H (2011) Improving drought tolerance of *Pistacia vera* L. seedlings by arbuscular mycorrhiza under greenhouse condition. *J. Med. Plant Res* 5: 7065–7072.

Abbaspoura H, Saeidi-Sarb S, Afsharia H, Abdel-Wahhabc MA (2012) Tolerance of Mycorrhiza infected Pistachio (*Pistacia vera* L.) seedling to drought stress under glasshouse conditions. *J. Plant Physiol* 169: 704-709.

Aghai MM, Khan Z, Joseph MR, Stoda AM, Sher AW, Ettl GJ, Doty SL (2019) The Effect of Microbial Endophyte Consortia on *Pseudotsuga menziesii* and *Thuja plicata* Survival, Growth, and Physiology across Edaphic Gradients. *Front. Microbiol.* 10:1353.

Aguilera-Betti I, Muñoz A.A, Stahle D, Figueroa G, Duarte F, González-Reyes Á, Fernández A (2017) The first millennium-age *Araucaria Araucana* in Patagonia. *Tree-Ring Res.* 73 (1): 53–56.

Ahlholm, J. U, Helander, M, Lehtimäki, S., Wälili, P. and Saikkonen, K (2002) Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions. – *Oikos* 99: 173 – 183.

Allen C.D (2009) Climate-induced forest dieback: an escalating global phenomenon. *Unasylva* 231/232 60: 43–49.

Al-Babili S, Bouwmeester H (2015) Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66: 161-186.

Aroca, R, Irigoyen J, Sanchez-dia M (2001) Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against oxidative stress during chilling and subsequent recovery in two maize varieties differing in chilling sensitivity. *Plant Sci* 161: 719–726.

Asmelash F, Bekele T, Birhane E (2016) the Potential Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Restoration of Degraded Lands. *Front. Microbiol.* 7:1095.

Augé R.M, Stodola A.J.W, Tims J.E, Saxton A.M (2001) Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant Soil.* 230: 87–97.

BCN Biblioteca Nacional de Chile (2017) Enfermedad que afecta a la *Araucaria (Araucaria araucana)* (Molina) K. Koch). Departamento de estudios, extencion y publicaciones, Asesoría técnica parlamentaria paginas 1-3.

- Bahadur A, Batool A, Nasir F, Jiang S, Mingsen Q, Zhang Q, Feng H (2019) Mechanistic Insights into Arbuscular Mycorrhizal Fungi-Mediated Drought Stress Tolerance in Plants. *Int J Mol Sci*, 20(17): 4199.
- Bahmani M, Naghdi R, Kartoolinejad D (2018) Milkweed seedlings tolerance against water stress: Comparison of inoculations with *Rhizophagus irregularis* and *Pseudomonas putida*. *Environ. Technol.* 10: 111–121.
- Bates L.S, Waldren R.P, Teare I.D (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*. 39: 205–207.
- Barrer, S (2009) El uso de hongos micorrizicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Facultad de ciencias agropecuarias*. Vol 7 no. 1.
- Barker S. J, Stummer B, Gao L, Dispain I, Oconnor P. J, Smith S. E (1998) a mutant in *Lycopersicon esculentum* Mill. with highly reduced VA mycorrhizal colonization - isolation and preliminary characterisation. *The Plant J*. 15: 791–797.
- Besoain X, Guajardo J, Camps R (2017) First Report of *Diplodia mutila* Causing Gummy Canker in *Araucaria araucana* in Chile. *Plant disease* 101: No.7.
- Behera B, Sethi B, Mishra R, Dutta S, Thatoi H (2016) Microbial cellulases–Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *J Genet Eng Biotech*. 15: 197-210.
- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia L.M (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol*, 35: 1044–1051.
- Begum N, Qin C, Ahanger M. A, Raza S, Khan M. I, Ashraf M, et al (2019) Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Front. Plant Sci*. 10:1068.
- Boisier J.P, Rondanelli R, Garreaud R.D, Muñoz F (2016) Anthropogenic and natural contributions to the Southeast Pacific precipitation decline and recent megadrought in central Chile. *Geophys. Res. Lett*, 43: 413-421.
- Borie F, Rubio R, Rouanet J, Morales A, Borie G, Rojas C (2006) Effect of tillage systems on soil characteristics, glomalin and mycorrhizal propagules in a Chilean Ultisol. *Soil & Tillage Res*. 88: 253-261.
- Bueno de Mesquita C. P, Martinez Del Río C M, Suding K N, Schmidt S K (2018) Rapid temporal changes in root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and fine root endophytes, not dark septate endophytes, track plant activity and environment in an alpine ecosystem. *Mycorrhiza* 28: 717–726.
- Brodribb T. J, McAdam S A M, Jordan G J, Martins S C V (2014) Conifer species adapt to low-rainfall climates by following one of two divergent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(40): 14489–14493.

- Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grave, N. Malajczuc, (1996) Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research Monograph 32, Canberra.
- Carnicer J, Barbeta A, Sperlich D, Coll M, Peñuelas J (2013) Contrasting trait syndromes in angiosperms and conifers are associated with different responses of tree growth to temperature on a large scale. *Front. Plant Sci* 4: 1–19.
- Caro M (1995) Producción y Dispersión de Semillas de *Araucaria araucana* (Mol.) C. Koch., en Lonquimay. Memoria. Ingeniería Forestal. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 55 pp.
- Calvo-Polanco M, Sánchez-Romera B, Aroca R (2013) Arbuscular Mycorrhizal Fungi and the Tolerance of Plants to Drought and Salinity. *Symbiotic Endophytes* pp 271-288.
- Corporación Nacional Forestal (CONAF) (2017) Determinación del daño sanitario de *Araucaria araucana* y medidas de acción. Comisión de Agricultura del Senado. <http://www.lib.udec.cl/wp-content/uploads/2018/05/Vargasetal2017.pdf>.
- Chávez D, Machuca A, Fuentes-Ramirez A, et al (2020) Shifts in soil traits and arbuscular mycorrhizal symbiosis represent the conservation status of *Araucaria araucana* forests and the effects after fire events. *For. Ecol. Manag* 458: 117806.
- Chen M, Arato M, Borghi L, Nouri E and Reinhardt D (2018) Beneficial Services of Arbuscular Mycorrhizal Fungi – From Ecology to Application. *Front. Plant Sci.* 9:1270.
- Chen J, Zhang H, Zhang X and Tang M (2017) Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis Alleviates Salt Stress in *Black Locust* through Improved Photosynthesis, Water Status, and K⁺/Na⁺ Homeostasis. *Front. Plant Sci*, 8:1739.
- Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R, et al (2012) Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature*, 491: 752– 755.
- Crowley D.A (2006) Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*. Barton, L.L and Abadía, J. (eds). Netherlands: Springer, pp. 169–189.
- Dastogeer K.M.G, Wylie S.J (2017) Plant-Fungi Association: Role of Fungal Endophytes in Improving Plant Tolerance to Drought Stress. In: Singh D., Singh H., Prabha R. (eds) *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. Springer, Singapore
- Diehl P, Fontenla SB (2010) Arbuscular mycorrhizal infection in two morphological root types of *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch. *Rev Argent Microbiol* 42: 133-137.
- Ditmarová L, Kurjak D, Palmroth S, Kmet' J, Štřelcová K (2010) Physiological responses of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings to drought stress. *Tree Physiol.* 30:205–213.
- Donoso C (1998) Bosques templados de Chile y Argentina. Variación, Estructura y dinámica. Santiago: Editorial Universitaria.

Donoso C (2014) Producción, permanencia y germinación de semillas de *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch en bosques naturales, aprovechados por comunidades indígenas del sur de Chile. *Interciencia*, 338-343.

Donoso C, a*, González M, Cortés M, et al (2008) Populations of dwarf araucaria (*Araucaria araucana*) in the Nahuelbuta coastal range, Chile. *Bosque* 29(2): 170-175.

Eaton C, Cox M, Scott B (2011) What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? *Plant Sci Volume 180, Issue 2: 190-195.*

Fan Q J, Liu J H (2011) Colonization with arbuscular mycorrhizal fungus affects growth, drought tolerance and expression of stress-responsive genes in *Poncirus trifoliata*. *Acta Physiol. Plant* 33: 1533–1542.

Fernandez K (2012) Los sistemas de cultivo in vitro aplicados al estudio de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA). *Cul trop*, 33-43.

Fouda AH, Hassan SED, Eid AM, Ewais EED (2015) Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Annals Agricultural Sci.* 95-104.

Frosi G, Barros V A, Oliveira M T, Santos M, Ramos D G, Maia L C, Santos M G (2017) Arbuscular mycorrhizal fungi and foliar phosphorus inorganic supply alleviate salt stress effects in physiological attributes, but only arbuscular mycorrhizal fungi increase biomass in woody species of a semiarid environment. *Tree Physiol*, 38: 25–36.

Garreaud R, Alvarez-Garreton C, Barichivich J, Boisier J, Christie D (2017) The 2010–2015 megadrought in central Chile: impacts on regional hydroclimate and vegetation. *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 21: 6307–6327.

González A H (1998) Análisis de la densidad y crecimiento de la regeneración de un bosque de *Araucaria* bajo distintas intensidades de corta de selección. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 79 pp.

Gonzalez et al. (2006). *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch.; *Araucaria*, *Pehuen*, *Piñonero*, *Pino Araucaria*, *Pino chileno*, *Pino del Neuquen* *Monkey puzzle Tree*. Valdivia: En Donoso C (Ed).

Gonzalez V, Martin J, Siles J, Gonzalez M, Reyes F, Platas G, Tormo J, Genilloud O (2017) Biodiversity and chemotaxonomy of *Preussia* isolates from the Iberian Peninsula. *Mycol Progress* 16:713–728.

Hamim H (2004) Underlying drought stress effect on plant: Inhibition of photosynthesis. *Hayati* vol. 11:164-169.

Harrier L. A. (2001) The arbuscular mycorrhizal symbiosis: a molecular review of the fungal dimension. *Exp Bot* vol. 52: 469-478.

Hardoim P, Overbeek L, Berg G, Pirttilä A, Compant S (2015) The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes *Microbiol Mol Biol Rev.*; 79 (3): 293–320.

Hazzoumi Z, Moustakime Y, Elharchli E H, Joutei K A (2015) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and water stress on growth, phenolic compounds, glandular hairs, and yield of essential oil in basil (*Ocimum gratissimum*. L) *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2: 1–11.

Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A (2012). "Role of proline under changing environments: A review ", *Plant Signal Behav*, vol. 7, no. 11: 1456–1466.

He F, Sheng M, Tang M (2017) Effects of *Rhizophagus irregularis* on Photosynthesis and Antioxidative Enzymatic System in *Robinia pseudoacacia* L. under Drought Stress. *Front. Plant Sci.* 8:183.

Hechenleitner et al (2005) Plantas Amenazadas del Centro-Sur de Chile. Distribución, Conservación y Propagación. Valdivia: Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edimburgo.

Herrmann TM (2006) Indigenous knowledge and management of *Araucaria araucana* forest in the Chilean Andes: implications for native forest conservation. *Biodivers Conserv.* 15:647–662.

Hoff J A, Klopfenstein, Ned B, McDonald, Geral I (2004) fungal endophytes in woody roots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). *For. Path.* 34(4): 255-271.

Huygens D, P Boeckx, P Templer, L Paulino, O Van Cleemput, et al (2008) Mechanisms for retention of bioavailable nitrogen in volcanic rainforest soils. *Nature Geosci.* 1(8): 543-548.

IPCC (2013) Summary for Policymakers. In *Climate Change (2013) The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Kia S H, Jurkechova M, Glynou K, Piepenbring M, Macia-Vicente J G (2018) The effects of fungal root endophytes on plant growth are stable along gradients of abiotic habitat conditions. *FEMS Microbiol Ecol.* 94(2).

Kimberley M. Hood I. Knowles R (2010) Impact of Swiss Needle-Cast on Growth of Douglas-Fir. *Phytopathology.* 101:583-593.

Kogel K, Franken P, ckelhoven R (2006) Endophyte or parasite – what decides? *Curr Opin Plant Biol.* 9:358–363.

Larimer AL, Bever JD, Clay K (2010) The interactive effects of plant microbial symbionts: a review and meta-analysis. *Symbiosis.* 51:139–148.

- Li T, Hu Y J, Hao Z P, Li H, Wang Y S, Chen B D (2013) First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol*, 197(2): 617–630.
- Li Y, Liu C, Zhang J, Yao H, Xu L, Wang Q, Lawren S, et al (2018) Variation in leaf chlorophyll concentration from tropical to cold-temperate forests: association with gross primary productivity. *Ecol. Indic.* 85:383–389.
- Lichtenthaler K (1987) Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods Enzymol* 350-382.
- Liu C Y, Srivastava A K, Wu Q S (2017) Mycorrhizal fungi regulate root responses and leaf physiological activities in trifoliolate orange. *Not Bot Horti Agrobo* 45(1): 17–21.
- Manter D, Bond B, Kavanagh K, Rosso P, Filip M (2000) *Pseudothecia* of Swiss needle cast fungus, *Phaeocryptopus gaeumannii*, physically block stomata of Douglas fir, reducing CO₂ assimilation. *New Phytol.* 148: 481–491.
- Menendez E, Garcia-Fraile P, Rivas R (2015) Biotechnological applications of bacterial cellulases. *AIMS Bioeng*, 2: 163-182.
- Murphy M, Doohan F, Hodkinson T (2018) Matching source and sink: An environmentally tailored fungal endophyte consortium increases yield in three field-grown barley cultivars, *Cogent Food & Agric* 4: 1484599.
- Murata N. and Takahashi S (2008) how do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci.* 4: 178-182.
- Mrnka L, Tokarova H, Vosatka M, Matejka P (2009) Interaction of soil filamentous fungi affects needle composition and nutrition of Norway spruce seedlings. *Trees.* 23:887–897.
- Ouahmane, L., Hafidi, M., Thioulouse, J., Ducouso, M., Kisa, M. et al (2007) Improvement of *Cupressus atlantica* Gaussen growth by inoculation with native arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Appl. Microbiol*, 103(3): 683–690.
- Pandey A, Sharma M and Pandey GK (2016) Emerging Roles of Strigolactones in Plant Responses to Stress and Development. *Front. Plant Sci.* 7:434.
- Padamsee M, Johansen R B, Stuckey S A, Williams S E, Hooker J E, Burns B R, et al (2016) The arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots and root nodules of New Zealand kauri *Agathis australis*. *Fungal Biol.* 120: 807–817.
- Petrini O (1991) Fungal Endophytes of Tree Leaves. In *Microbial Ecology of Leaves*. eds Andrews, J. H. & Hirano, S. S. 179–197.
- Peralta M (1980) Geomorfología, clima y suelos del tipo forestal araucaria en Lonquimay. Santiago: Boletín Técnico de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile.
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit.*, 55: 158-160.

- Premoli, A., Quiroga, P. & Gardner, M. 2013. *Araucaria araucana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T31355A2805113. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T31355A2805113>.
- Pressel S, Bidartondo MI, Ligrone R, Duckett JG (2010) Fungal symbioses in bryophytes: New insights in the Twenty First Century. *Nat Hist.* 253:238–253.
- Qaderi MM, Martel AB, Dixon SL (2019) Environmental factors influence plant vascular system and water regulation. *Plants.* 8:65.
- Qin D, Wang L, Han M, Wang J, Song H, Yan X, Duan X and Dong J (2018) Effects of an Endophytic Fungus *Umbelopsis dimorpha* on the Secondary Metabolites of Host-Plant *Kadsura angustifolia*. *Front Microbiol.* 9:2845.
- Qin X, Zhang J, Zhang X, Yang Y (2014) Induction, Purification and Characterization of a Novel Manganese Peroxidase from *Irpex lacteus* CD2 and Its Application in the Decolorization of Different Types of Dye. *PLoS ONE.* 9: 11.
- Reininger V, Sieber TN (2012) Mycorrhiza Reduces Adverse Effects of Dark Septate Endophytes (DSE) on Growth of Conifers. *PLoS ONE.* 7: 8.
- Redman R, Dunigan D, Rodriguez R (2001) Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytol* 151: 705–716.
- Redman RS, Kim YO, Woodward CJDA, Greer C, Espino L, et al (2011) Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: a strategy for mitigating impacts of climate change. *PLoS ONE.* 6:14823–14823.
- Riess K, Schön ME, Lutz M, Butin H, Oberwinkler F, Garnica S (2016) On the Evolutionary History of *Uleiella chilensis*, a Smut Fungus Parasite of *Araucaria araucana* in South America: *Uleiellales* ord. nov. in *Ustilaginomycetes*. *PLoS ONE.* 11: 1.
- Ridout M, Houbraken J, Newcombe G (2017) Xerotolerance of *Penicillium* and *Phialocephala* fungi, dominant taxa of fine lateral roots of woody plants in the intermountain Pacific Northwest, USA. *Rhizosphere,* 4: 94-103.
- Rillig m.c, wright s f, eviner v t (2002) The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant Soil.* 238: 325-333.
- Rillig M (2005) A connection between fungal hydrofobins and soil water repellency? *Pedobiología* 49: 395-399.
- Rodriguez RJ, Henson J, Van Volkenburgh E, Hoy M, Wright L, Beckwith F, Kim Y-O, Redman RS (2008) Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME J* 2:404 –416.
- Rouphael Y, Franken P, Schneider C, Schwarz D, Giovannetti M, Agnolucci M et al (2015) Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. *Sci Hortic* 196: 91–108.

Ruiz-Lozano J M, Aroca R, Zamarreño Á M, Molina S, Andreo-Jiménez B, Porcel R, López-Ráez J A (2016) Arbuscular mycorrhizal symbiosis induces strigolactone biosynthesis under drought and improves drought tolerance in lettuce and tomato. *Plant Cell Environ* 39(2):441–452.

Ruiz-Lozano J M (2003) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. *New Perspect. Mol. Stud. Mycorrhiza*. 13: 309–317.

Santos JM, Vrandečić K, Ćosić J, Duvnjak T, Phillips AJL (2011) Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. *Persoonia* 27:9–19.

Sánchez-Blanco M J, Álvarez S, Ortuño M F, Ruiz-Sánchez M C (2014) Root system response to drought and salinity: Root distribution and water transport. In: A. Morte & A. Root Engineering. *Soil Biology*, vol 40. Springer, Berlin, Heidelberg

Saavedra A, Willhite E (2017) Observations and Recommendations Regarding *Araucaria araucana* Branch and Foliage Mortality (Daño Foliar de la Araucaria) in the National Parks of South-Central Chile. USDA Forest Service. Varma (Eds.), *Root engineering, Soil Biol* 40: 325–352.

Sánchez R, Sánchez B, Sandoval Y, Ulloa A, Armendáriz B (2013) Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *D.R. TIP* 16(2):132-146.

Sanon A, Ndoye F, Baudoin E, Prin Y, Galiana A, Duponnois R (2010) “Management of the mycorrhizal soil infectivity to improve reforestation programs’ achievements in Sahelian ecosystems,” in *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* Vol. 2 ed. Méndez-Vilas A., editor. (Badajoz: FORMATEX Research Center), 230–238.

Saddique M, Ali Z, Khan A, Rana I, Shamsi I (2018) “Inoculation with the endophyte *Piriformospora indica* significantly affects mechanisms involved in osmotic stress in rice,” *Rice* 11: 1.

Serraj R, Sinclair TR. (2002) Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ* 25:333-41.

Signarbieux C. Feller U. (2011). Non-stomatal limitations of photosynthesis in grassland species under artificial drought in the field. *Environ Exp Bot* 71: 192–197.

Schiop ST, Al Hassan M, Sestras AF, Boscaiu M, Sestras RE, Vicente O (2015) Identification of Salt Stress Biomarkers in Romanian Carpathian Populations of *Picea abies* (L.) Karst. *PLoS ONE* 10: 8.

Stolpe N, Undurraga P (2016) Long term climatic trends in Chile and effects on soil moisture and temperature regimes. *Chil. J. Agric. Res* 76: 4.

Smith SE, DJ Read. (2008). the roles of mycorrhizas in ecosystems. In Smith SE, DJ Read eds. *Mycorrhizal Symbiosis*. London, UK. Academic Press 409-452.

- Tellenbach C, Grunig CR, Sieber TN (2011) Negative effects on survival and performance of Norway spruce seedlings colonized by dark septate root endophytes are primarily isolate-dependent. *Environ Microbiol* 13:2508–2517.
- Terhonen E., Blumenstein K., Kovalchuk A. and Asiegbu F.O (2019) Forest tree microbiomes and associated fungal endophytes: Functional roles and impact on forest health. *Forests* 10(1):1–32.
- Tiwari, k (2015) The Future Products: Endophytic Fungal Metabolites. *J Biodivers Biopros Dev* 2:1.
- Toju H, Sato H (2018) Root-associated fungi shared between arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal conifers in a temperate forest. *Front. Microbiol.* 9:433.
- Thomas E, Jalonen R, Loo J, Boshier D, Gallo L, Cavers S et al (2014) Genetic considerations in ecosystem restoration using native tree Species. *For. Ecol. Manag* 333: 66–75.
- Vaz A B M, Fontenla S, Rocha F S, Brandão L R, Vieira M L, De Garcia V, Góes-Neto A, et al (2014) Fungal endophyte β -diversity associated with *Myrtaceae* species in an Andean Patagonian forest (Argentina) and an Atlantic forest (Brazil). *Fungal Ecol* 8: 28– 36.
- Valderrama L, Contreras-Reyes J, Carrasco R (2018) Ecological Impact of Forest Fires and Subsequent Restoration in Chile. *Resources* 7(2), 26.
- Velez M, Marfetan,A, Salgado M, Sanguinetti J (2018) Caracterización de la desecación del dosel y sanidad de *Araucaria Araucana* en Argentina. Tech Report
- Wang B, Qiu YL (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*.16:299–363.
- Wezowicz K, Rozp adek P, and Turnau K (2017) Interactions of arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi improve seedling survival and growth in post-mining waste. *Mycorrhiza*, 27, 499–511.
- Woodruff D R, Meinzer F C (2011) Water stress, shoot growth and storage of non-structural carbohydrates along a tree height gradient in a tall conifer. *Plant Cell Environ.* 34:1920–1930.
- Wu QS, Srivastava AK, Zou YN (2013) AMF-induced tolerance to drought stress in citrus: a review. *Sci Hort* 164:77–87.
- Wu H, Zou Y, Rahman M (2017) Mycorrhizas alter sucrose and proline metabolism in trifoliolate orange exposed to drought stress. *Sci Rep* 7, 42389.
- Wu QS., Zou YN. (2017) Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Tolerance of Drought Stress in Plants. In: Wu QS. (eds) *Arbuscular Mycorrhizas and Stress Tolerance of Plants*. Springer, Singapore

- Wu Q.-S, Xia R X (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *J. Plant Physiol* 163(4), 417–425.
- Xue HQ (2004) Water ecophysiology effects of arbuscular mycorrhizal fungi on *Citrus grandis* L. Osbeck cv. Shatianyou in Changshou. Dissertation, Southwest Agriculture University, Changshou
- Yan Lu H X, Tong S (2018). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthesis and chlorophyll fluorescence of maize seedlings under salt stress. *Emir J Food Agr* 199-204.
- Yadav AN, Verma P, Sachan SG, Saxena AK (2017) Biodiversity and biotechnological applications of psychrotrophic microbes isolated from Indian Himalayan regions. *EC Microbiol ECO* 01:48–54.
- Yamasaki S, Dillenburg L (1999) “Measurements of leaf relative water content in *Araucaria angustifolia*,” *Rev. Bras. Fisiol. Veg* vol. 11, no. 5, pp. 69–75.
- Yang Y, Liang Y, Ghosh A, Song Y, Chen H, Tang M (2015) Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi status and heavy metal accumulation characteristics of tree species in a lead-zinc mine area: *Environ Sci Pollut Res Int* 22:13179–13193.
- Zamorano-Elgueta C, Cayuela L, González-Espinosa M, Lara A, Parra-Vázquez MR (2012) Impacts of cattle on the South American temperate forests: Challenges for the conservation of the endangered monkey puzzle tree (*Araucaria araucana*) in Chile. *Biol. Conserv* 152 110–118.
- Zarik L, Meddich A, Hijri M, Hafidi M, Ouahmou A, Ouahmane L, Duponnois R, Boumezzough A. (2016). Use of arbuscular mycorrhizal fungi to improve the drought tolerance of *Cupressus atlantica*. *G C. R. Biol* 339 pp. 185-196.
- Zandavalli RB, Dillenburg LR, de Souza PVD (2004) Growth responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*. *Appl Soil Ecol* 25:245–255.
- Zapata M, Palma MA, Piontelli E (2018) *Ophiostoma pehueninum*, a new species associated with *Araucaria araucana* in Chile. *Phytotaxa*. 346(1):93-103.
- Zapata M, Schafer M (2019) *Diplodia africana* causing twig death on *Araucaria araucana*, a new host and first record for Chile. *New Dis. Rep* 40: 2.
- Zimmer HC, Brodribb TJ, Delzon S, Baker PJ (2016) Drought avoidance and vulnerability in the Australian Araucariaceae. *Tree Physiol*. 36: 218– 228.
- Zou Y-N, Srivastava A K, Wu Q-S, Huang Y-M (2014). Glomalin-related soil protein and water relations in mycorrhizal citrus (*Citrus tangerina*) during soil water deficit. *Arch. Agron. Soil Sci* 60:8: 1103-1114.

Zou Y-N, Wu Q-S, Huang Y-M, Ni Q-D, He X-H (2013) Mycorrhizal-Mediated Lower Proline Accumulation in *Poncirus trifoliata* under Water Deficit Derives from the Integration of Inhibition of Proline Synthesis with Increase of Proline Degradation. PLoS ONE 8(11): 80568.

Zhang Y, Zhong C L, Chen Y, Chen Z, Jiang Q B, Wu C, Pinyopusarek, K (2010) Improving drought tolerance of *Casuarina equisetifolia* seedlings by arbuscular mycorrhizas under glasshouse conditions. New For 40(3): 261–271.

Zhang Z F, Zhang J C, Huang Y Q (2014) Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the drought tolerance of *Cyclobalanopsis glauca* seedlings under greenhouse conditions. New For 45: 545–556.

Zheng C, Xu L, Li Y, Han T, Zhang Q, Ming Q, Rahman K, Qin L (2013) Cytotoxic metabolites from the cultures of endophytic fungi from *Panax ginseng*. Appl Microbiol Biotechnol 97:7617–7625.



XI. Anexo

Anexo 1.

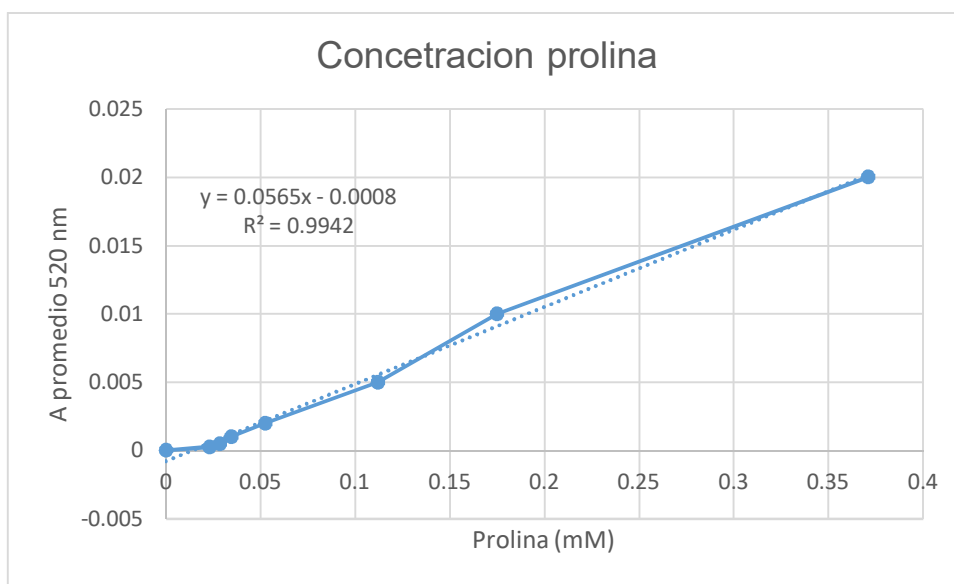


Fig. 1. Curva de calibración para prolina mediante el método de Bates et ál. (1973)