



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

**EFFECTOS DE HONGOS ENDÓFITOS EN EL METABOLISMO DEL
NITRÓGENO EN *ARAUCARIA ARAUCANA* (MOLINA) K. KOCH**

POR JOSÉ MANUEL RETAMAL HERNÁNDEZ

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas para
optar al grado académico de Magíster en Ciencias con mención Botánica

Dra. Luisa Bascuñan – Profesora Guía

Dra. Marcia González – Profesora Co-Guía

Junio 2026

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento al Programa de Magíster, por darme la oportunidad de aprender sobre Botánica.

A mi tutora, la Dra. Luisa Bascuñán, le agradezco por aceptarme como estudiante y enseñarme este mundo de la Fisiología Vegetal. Gracias por su confianza, dedicación y paciencia durante todo este proceso.

A mi cotutora, Dra. Marcia González, por ser parte nuevamente en el proceso académico, y apoyar en todo lo necesario para que finalizara con éxito esta etapa.

Agradezco también a los profesores de mi comisión, quienes contribuyeron significativamente con sus valiosos comentarios, colaboraciones y orientación desde el inicio hasta la finalización de esta tesis.

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal, gracias por recibirme con generosidad y por crear un ambiente de trabajo cercano, respetuoso y colaborativo. Un agradecimiento especial a Paz, Eli y Enrique, quienes participaron activamente en el desarrollo de esta investigación.

A mi familia, especialmente a mi madre, Marilyn, por su amor y esfuerzo. A mi pareja, Fernanda, por su apoyo, contención y amor incondicional, junto a Dulce y Darin, quienes fueron una fuente constante de alegría y motivación. A mis amigos de toda la vida, gracias por su cariño y apoyo permanente.

Finalmente, agradezco el financiamiento otorgado por los proyectos FONDECYT 1250741, Beca Magíster Nacional ANID 2025 y Proyecto ANID 20CEIN2-142131, cuyo respaldo hizo posible el desarrollo de esta investigación.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	2
1.1 Metabolismo del N en plantas	4
1.2 Hongos endófitos en el metabolismo de la planta.....	10
1.3 <i>Araucaria araucana</i> (Molina) K. Koch (Araucariaceae).....	13
Hipótesis.....	19
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
2 METODOLOGÍA	21
2.1 Diseño experimental.....	21
2.2 Germinación de piñones de <i>A. araucana</i>	22
2.3 Inoculación de cepas fúngicas.....	22
2.4 Tratamiento nutricional	23
2.6 Condiciones de crecimiento	25
2.7 Mediciones de crecimiento y biomasa	25
2.8 Determinación de azúcares totales, almidón y carbohidratos no estructurales. 26	
2.9 Aminoácidos libres y proteínas solubles totales.	27
2.10 Mediciones de la actividad enzimática de NR, GS y GDH.	30
2.11 Contenido de Nitrógeno, carbono y composiciones isotópicas	32
2.12 Pigmentos fotosintéticos.....	33
2.13 Análisis Metabolómico.....	34
2.14 Amplificación de ADN fúngico en raíces	37
2.15 Análisis estadísticos	39
3 RESULTADOS	40
3.1 Efecto del nivel de N y de los HE en la biomasa aérea y radicular de <i>Araucaria araucana</i>	40
3.3 Efecto del nivel de N y de los HE en aminoácidos libres totales (AAL) y proteínas solubles totales (PST)	44
3.4 Efecto del nivel de N y de los HE en Pigmentos fotosintéticos	45

3.6	Efecto de los HE y nivel de N en el perfil metabolómico del tejido foliar de plántulas de <i>A. araucana</i>	49
3.7	Efecto del nivel de N y de los HE en el contenido de nitrógeno, carbono y relación estequiométrica C/N y N/C	53
3.8	Efecto del nivel de N y de los HE en los isotopos $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ en hoja.....	55
3.9	Colonización fúngica en raíces de <i>Araucaria araucana</i>	56
3.10	Análisis multivariado de los efectos inducidos por los HE en las variables relacionadas con el metabolismo de N y C.	57
3.11	Resumen estadístico de los efectos de HE y nivel de N sobre variables relacionadas con el metabolismo de N y C en <i>A. araucana</i>	60
4	DISCUSIÓN	61
4.1	El incremento de biomasa en condiciones de LN no estuvo asociado a una mayor acumulación de N o C foliar	61
4.2	Los HE aumentaron la eficiencia de utilización de nitrógeno más que su acumulación en tejidos.	63
4.3	La Co-inoculación incrementó la actividad GDH desaminante y redujo metabolitos claves del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).	65
4.4	Los HE modularon rutas asociadas al metabolismo del carbono, aminoácidos y compuestos fenólicos en función de la disponibilidad de nitrógeno.	66
4.5	La respuesta diferencial del $\delta^{15}\text{N}$ en relación con la colonización fúngica ...	71
4.6	Colonización diferencial entre <i>Beauveria</i> y <i>Metarhizium</i> según la disponibilidad de nitrógeno	73
5	CONCLUSION	75
6	BIBLIOGRAFÍA	77
7.	ANEXOS	90

ÍNDICE DE FIGURAS

EN TEXTO

Figura A. Esquema de la Asimilación de Nitrógeno (N) y su relación con el Metabolismo del Carbono.....7

Figura B. Plántulas de *A. araucana* 30 días aproximadamente después del trasplante y tratamiento fúngico.....24

Figura 1. Efecto de la inoculación con HE y nivel de N sobre el crecimiento de las plántulas. (A) Biomasa aérea; (B) Biomasa radicular, en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). Los tratamientos corresponden a plántulas no inoculadas (Ni), inoculadas con *Beauveria sp.* (Bs), *Metarhizium sp.* (Ms) y Co-inoculación (Co-I).....41

Figura 2. Contenido de carbohidratos en plántulas inoculadas con HE en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). (A) azúcares solubles totales en tejido foliar; (B) azúcares solubles totales radiculares; (C) almidón en tejido foliar; (D) almidón en raíces; (E) carbohidratos no estructurales en tejido aéreo; (F) carbohidratos no estructurales en raíces.....43

Figura 3. Concentración compuestos nitrogenados en hojas y raíces de plántulas inoculadas con HE en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). (A) aminoácidos libres en hojas; (B) aminoácidos libres en raíces; (C) proteínas solubles totales en hojas; (D) proteínas solubles totales en raíces.....45

Figura 4. Contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de plántulas inoculadas con HE en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). (A) clorofila a; (B) clorofila b; (C) clorofila total; y (D) carotenoides.....46

Figura 5. Actividad enzimática relacionada con la asimilación de nitrógeno en hojas y raíces de plántulas inoculadas con HE, en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). (A) actividad de nitrato reductasa, NR en hojas; (B) NR en raíces; (C) actividad de glutamina sintetasa, GS en hojas y (D) GS en raíces.....48

Figura 6. Actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) asociada a la asimilación del N en hojas y raíces de plántulas inoculadas con HE, evaluadas en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). (A) actividad GDH en hojas, NADH oxidado; (B) GDH en raíces, NADH oxidado; (C) GDH en hojas, NAD⁺ reducido y (D) GDH en raíces, NAD⁺ reducido.....49

Figura 7. Perfil metabolómico foliar basado en metabolitos anotados de plántulas de *Araucaria araucana* inoculadas con HE en condiciones de alto nitrógeno

(HN) y bajo nitrógeno (LN). Los mapas de calor muestran (A) la abundancia relativa de los 24 metabolitos descritos en HN y; (B) los 23 metabolitos descritos en LN. La barra de escala representa los valores estandarizados de abundancia relativa, desde baja (azul) hasta alta (rojo). Los análisis de componentes principales (PCA) para (C) HN y; (D) para LN, fueron realizados exclusivamente utilizando los metabolitos anotados.....52

Figura 8. Contenido de nitrógeno, carbono en hojas de plántulas inoculadas con HE en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). (A) contenido de N foliar; (B) contenido de carbono foliar.....54

Figura 9. Composición isotópica foliar de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ en plántulas de *Araucaria araucana* inoculadas con HE en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). (A) composición isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ foliar; (B) composición isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ foliar.....55

Figura 10. Colonización radicular de *Beauveria sp.* y *Metarhizium sp.* en plántulas de *Araucaria araucana* determinada mediante qPCR. (A) cuantificación de ADN genómico de *Beauveria*; (B) cuantificación de ADN genómico de *Metarhizium*. Los datos representan ng de ADN fúngico por cada 100 mg de peso fresco de raíces bajo condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN).....56

Figura 11. Análisis de componentes principales (PCA) de las variables fisiológicas y bioquímicas evaluadas en plántulas de *Araucaria araucana* inoculadas con HE bajo condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). (A y B) Ordenación de los tratamientos según los dos primeros componentes principales PC1 y PC2, mostrando las elipses de confianza de los tratamientos. (C y D) Círculo de correlación que muestra la dirección y contribución relativa de las variables a la separación observada en los componentes principales.....59

EN ANEXO

Figura S1. Efecto de la inoculación con HE y nivel de N sobre la biomasa total de las plántulas de *Araucaria araucana*, en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). Los tratamientos corresponden a plántulas no inoculadas (Ni), inoculadas con *Beauveria sp.* (Bs), *Metarhizium sp.* (Ms) y Co-inoculación (Co-I).....90

Figura S2. Análisis global del perfil metabolómico foliar de plántulas de *Araucaria araucana* inoculadas con HE en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). Los mapas de calor muestran (A) la abundancia relativa de los 334 metabolitos detectados en HN y; (B) los 259 metabolitos detectados en LN. Los análisis de componentes principales (PCA) realizados utilizando la totalidad de los metabolitos detectados se presentan para (C) HN y; (D) LN, mostrando la variación global del perfil metabolómico entre tratamientos fúngicos y niveles de nitrógeno.....91

Figura S3. Validación de la especificidad de los cebadores de qPCR para hongos endófitos (HE) utilizando cultivos fúngicos puros. Se obtuvieron productos de amplificación por PCR de 122 pb para *Beauveria spp.* (Bs) y de 127 pb para *Metarhizium spp.* (Ms). (A) Productos de amplificación por PCR de *Beauveria spp.* y *Metarhizium spp.*, junto a un marcador de ADN de 100 pb. (B) Curva de amplificación obtenida con los cebadores de qPCR para *Beauveria spp.* (C) Curva estándar generada con los cebadores de qPCR para *Beauveria spp.* (D) Productos de amplificación por PCR de *Metarhizium spp.* y *Beauveria spp.*, junto a un marcador de ADN de 100 pb. (E) Curva de amplificación obtenida con los cebadores de qPCR para *Metarhizium spp.* (F) Curva estándar generada con los cebadores de qPCR para *Metarhizium spp.*.....92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de p ($p < 0.05$) para los efectos de HE, N y su interacción determinados por análisis ANOVA de dos vías sobre atributos fisiológicos en <i>A. araucana</i> inoculadas con HE y dos niveles de N.....	60
---	----

RESUMEN

Araucaria araucana (Molina) K. Koch es una especie nativa de Chile y Argentina que crece en suelos caracterizados por una baja disponibilidad de nitrógeno (N). Los hongos endófitos (HE) promueven la transferencia de N desde suelos hacia las plantas. En este contexto, se estudió el efecto de los HE: *Beauveria* sp. (Bs), *Metarhizium* sp. (Ms) y su Co-inoculación (Co-I) sobre el metabolismo de N en *A. araucana* crecidas a dos niveles de N: Alto N (HN, 4 mM) y Bajo N (LN, 0,4 mM). Las plántulas inoculadas con HE promovieron el crecimiento, especialmente bajo condiciones de LN, sin incrementar el contenido total de N en hojas. Sin embargo, modificaron la actividad de enzimas clave de la asimilación de N (NR y GS), la acumulación de aminoácidos libres (AAL), proteínas solubles totales (PST), carbohidratos no estructurales (CNE) y metabolitos asociados a las rutas del shikimato y los fenilpropanoides, evidenciando respuestas específicas de cada cepa. *Beauveria* favoreció principalmente respuestas asociadas al metabolismo secundario y a la acumulación de reservas carbonadas a condiciones HN, las plantas Co-inoculadas mostraron respuestas intermedias en ambas condiciones de N, mientras que *Metarhizium* promovió el crecimiento, la actividad enzimática y el metabolismo primario, con mayores abundancias de arginina y triptófano bajo condiciones de LN. Estos resultados demuestran que los HE modulan el metabolismo de *A. araucana* y respaldan la hipótesis de que, bajo condiciones de limitación de nitrógeno, favorecen la asimilación y utilización de este nutriente.

ABSTRACT

Araucaria araucana (Molina) K. Koch is a native conifer of Chile and Argentina that grows in soils characterized by low nitrogen (N) availability. Endophytic fungi (EF) have been shown to facilitate N transfer from the soil to plants. In this context, the effects of *Beauveria* sp. (Bs), *Metarhizium* sp. (Ms), and their co-inoculation (Co-I) on N metabolism were evaluated in *A. araucana* seedlings grown under two contrasting N levels: high N (HN, 4 mM) and low N (LN, 0.4 mM). EF inoculation promoted seedling growth, particularly under LN conditions, without increasing total foliar N content. However, inoculated seedlings exhibited changes in the activity of key N assimilation enzymes (NR and GS) as well as in the accumulation of free amino acids (FAA), total soluble proteins (TSP), non-structural carbohydrates (NSC), and metabolites associated with the shikimate and phenylpropanoid pathways, revealing strain-specific physiological responses. *Beauveria* primarily enhanced responses related to secondary metabolism and carbon reserve accumulation under HN conditions, whereas co-inoculated seedlings displayed intermediate responses under both N levels. In contrast, *Metarhizium* promoted growth, enzymatic activity, and primary metabolism, with higher abundances of arginine and tryptophan under LN. These results demonstrate that endophytic fungi modulate the metabolism of *A. araucana* seedlings and support the hypothesis that, under nitrogen-limiting conditions, they enhance nitrogen assimilation and utilization.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Metabolismo del N en plantas

El nitrógeno (N) es un macronutriente esencial para las plantas, desempeñando un papel crucial en todas las etapas de su crecimiento y desarrollo, junto con el fósforo (P) y el potasio (K) (Krapp, 2015). Entre los macronutrientes necesarios para las plantas el N se requiere en mayor cantidad porque forma parte de los ácidos nucleicos, aminoácidos, metabolitos secundarios y pigmentos que son esenciales para la función y regulación celular (Kishorekumar et al., 2020). Aunque el N es un elemento de gran abundancia en la atmósfera, suele ser un factor limitante en los ecosistemas debido a su baja disponibilidad como moléculas asimilables (Ruan et al., 2000).

La actividad microbiana del suelo juega un papel crucial en la transformación del N atmosférico (N_2) hacia formas más accesibles, mediante el ciclo global del N (Sharma et al., 2021). Este ciclo comienza con la fijación biológica, donde bacterias especializadas (diazótrofas) convierten el N_2 atmosférico en amonio (NH_4^+). Luego ocurre el proceso de nitrificación, donde el amonio se oxida a nitrato (NO_3^-) a través de la actividad de bacterias nitrificantes y finalmente se vuelve a reducir a N_2 por parte de bacterias desnitrificantes, en el proceso de desnitrificación, devolviendo el N_2 a la atmósfera (Courty et al., 2015). En consecuencia, la principal fuente de N para la mayoría de las plantas corresponde

a formas inorgánicas presentes en el suelo, principalmente amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-) (Wagner, 2011). No obstante, se ha demostrado que algunas especies de plantas también pueden absorber compuestos nitrogenados orgánicos, tales como urea, aminoácidos y péptidos, aunque esta capacidad depende de factores según su evolución, variabilidad genética y las condiciones edafoclimáticas (Okamoto et al., 2003). Independientemente de la fuente utilizada, el N incorporado debe ser transformado en formas metabólicamente útiles para la planta. Esta serie de procesos coordinados incluyen la absorción desde el suelo, la asimilación en compuestos orgánicos y la posterior translocación hacia los distintos órganos de la planta (Eshel y Beeckman, 2013).

La absorción de nitrógeno constituye la primera etapa del proceso y depende de transportadores especializados de las familias AMT (*ammonium transporter*) y NRT (*nitrate transporter*), responsables de movilizar amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-), respectivamente, desde el suelo hacia las células de la raíz (Guo et al., 2001). Sin embargo, una vez incorporado, el N inorgánico no puede ser utilizado directamente para el crecimiento y desarrollo vegetal, por lo que debe ser transformado en compuestos orgánicos capaces de integrarse al metabolismo celular. Este proceso conocido como asimilación, permite incorporar el N absorbido a moléculas orgánicas esenciales, involucrados en el crecimiento, desarrollo y respuestas al estrés. La ruta de asimilación depende de la forma química del N absorbido. Mientras que el NH_4^+ puede incorporarse directamente al metabolismo vegetal con un menor costo energético, el NO_3^- debe ser reducido

previamente a NH_4^+ mediante una serie de reacciones enzimáticas (Zayed et al., 2023). La primera etapa de este proceso corresponde a la reducción del NO_3^- a nitrito (NO_2^-), catalizada por la enzima nitrato reductasa (NR, EC 1.7.1.2), que utiliza NAD(P)H como fuente de electrones. Esta reacción ocurre en el citosol, y el NO_2^- generado es posteriormente transportado hacia los plastidios, donde la enzima nitrito reductasa (NiR, EC 1.7.1.4) lo reduce a NH_4^+ (Bucher y Kossmann, 2007; Taiz y Zeiger, 2002; Mifflin, 1974). Una vez disponible, ya sea por absorción directa desde el suelo o por la reducción del NO_3^- , el NH_4^+ es incorporado al metabolismo orgánico principalmente mediante el ciclo GS/GOGAT. En esta vía, la glutamina sintetasa (GS, EC 6.3.1.2) cataliza la incorporación de NH_4^+ al glutamato para formar glutamina utilizando ATP. De esta forma, la glutamina se convierte en el principal punto de entrada del nitrógeno al metabolismo vegetal. Posteriormente, la glutamato sintetasa (GOGAT, EC 1.4.7.1) transfiere el grupo amida de la glutamina al 2-oxoglutarato, generando dos moléculas de glutamato, molécula estrechamente involucrada en el ciclo tricarboxílico (TCA) (Lea y Mifflin, 1974; Lea y Forde, 1994).

Además de la vía GS/GOGAT, existen rutas complementarias que contribuyen al metabolismo del nitrógeno. Entre ellas destaca la NADH/NAD⁺-glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2), una enzima capaz de catalizar de forma reversible la interconversión entre glutamato y 2-oxoglutarato, participando en el mantenimiento del balance carbono-nitrógeno celular y en la respuesta a cambios en la disponibilidad de nitrógeno (Skopelitis et al., 2006). Asimismo, la asparagina

sintetasa (AS, EC 6.3.5.4) cataliza la formación de asparagina a partir de glutamina y aspartato, generando uno de los principales compuestos de transporte y almacenamiento de nitrógeno en las plantas (Lam et al., 2003). En conjunto, estas enzimas permiten ajustar el metabolismo nitrogenado frente a variaciones ambientales y condiciones de estrés (Ye et al., 2022).

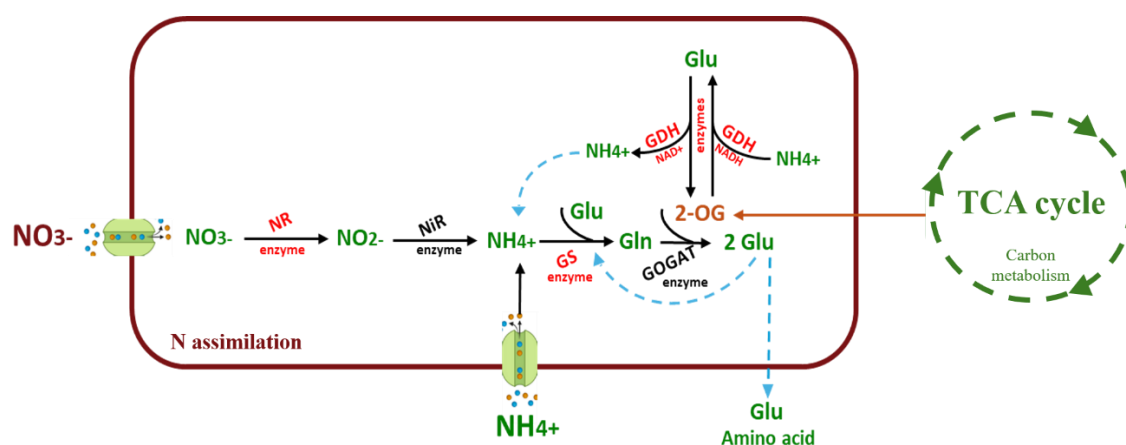


Figura A. Esquema de la Asimilación de Nitrógeno (N) y su relación con el Metabolismo del Carbono

La asimilación de N se encuentra estrechamente acoplada al metabolismo del carbono. Más del 70% del N foliar se destina a la síntesis de biomoléculas esenciales, particularmente de RuBisCO (EC 4.1.1.39), la enzima responsable de la fijación de CO_2 en el ciclo de Calvin y una de las proteínas más abundantes en los tejidos vegetales (Bascuñán-Godoy et al., 2018). A su vez, los carbohidratos generados durante la fotosíntesis son metabolizados mediante la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), una ruta central del metabolismo energético que oxida los compuestos carbonados para producir

ATP, poder reductor (NADH y FADH_2) y diversos intermediarios metabólicos, uno de ellos (2-oxoglutarato) participando activamente en la asimilación de N. Debido a este estrecho acoplamiento, los cambios en la disponibilidad de N repercuten directamente sobre la partición del carbono y la asignación de recursos dentro de la planta.

En condiciones de alta disponibilidad de N, la mayor parte del N asimilado se incorpora al metabolismo primario (Stitt and Krapp, 1999; Foyer et al., 2006; Nunes-Nesi et al., 2010; Ávila et al., 2025), favoreciendo la síntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y clorofilas, compuestos indispensables para la división celular y la acumulación de biomasa. En consecuencia, el crecimiento y fotosíntesis constituyen uno de los principales destinos del nitrógeno absorbido. En contraste, cuando existe limitación de N en las plantas, se induce una reprogramación metabólica que modifica la asignación de carbono y nitrógeno entre distintas rutas metabólicas, favoreciendo la adaptación de la planta a condiciones de baja disponibilidad de este nutriente (Masclaux-Daubresse et al., 2010; Kiba y Krapp, 2016; O'Brien et al., 2016). Esta reorganización favorece la síntesis de metabolitos secundarios, especialmente aquellos derivados de las vías del shikimato y de los fenilpropanoides (Ninkuu et al., 2025). Entre estos compuestos destacan los flavonoides, que actúan como moléculas de señalización durante el establecimiento de asociaciones con microorganismos benéficos del suelo y participan en la respuesta frente a distintos tipos de estrés (López-Ráez et al., 2017; Marro et al., 2022; Urcelay et

al., 2026), Asimismo, la lignina, un polímero derivado de la vía de los fenilpropanoides, fortalece la pared celular, incrementa la resistencia mecánica de los tejidos y constituye una importante barrera frente a condiciones ambientales adversas (Ma., 2024; Peng et al., 2024).

En conjunto, estos ajustes metabólicos permiten optimizar el uso del nitrógeno disponible y mantener el funcionamiento fisiológico de la planta bajo condiciones limitantes. En este contexto, la eficiencia de utilización del nitrógeno (NUE) depende no solo de la disponibilidad de este nutriente en el suelo, sino también de la capacidad de la planta para regular coordinadamente su adquisición, asimilación y redistribución de acuerdo con sus requerimientos fisiológicos. Para hacer frente a estas condiciones de estrés, las plantas han desarrollado diversas estrategias morfológicas, fisiológicas y bioquímicas destinadas a mejorar la adquisición y el uso de este nutriente. Entre ellas, una de las más importantes es el establecimiento de asociaciones simbióticas con microorganismos del suelo, particularmente aquellos que colonizan la rizósfera o los tejidos radicales. Estos microorganismos pueden incrementar la disponibilidad de N, favorecer su absorción y asimilación, modular el metabolismo del carbono y del nitrógeno y, en consecuencia, promover el crecimiento y la adaptación de las plantas en ambientes con baja fertilidad (Newsham, 2011).

1.2 Hongos endófitos en el metabolismo de la planta

Los microorganismos del suelo, particularmente los hongos, desempeñan funciones fundamentales en el mantenimiento de los ecosistemas agrícolas y forestales, participando activamente en la descomposición de materia orgánica, el reciclaje de nutrientes y la promoción del crecimiento vegetal (Vega, 2018). Dentro de esta diversidad microbiana, los hongos endófitos (HE) constituyen un grupo de especial interés debido a su capacidad para colonizar tejidos vegetales sin provocar síntomas aparentes de enfermedad (Wang et al., 2024). Se estima que más del 80% de las plantas terrestres establecen asociaciones con HE, principalmente en sus raíces, desde ecosistemas árticos hasta ambientes tropicales, incluyendo sistemas agrícolas y bosques templados (Sánchez-Fernández et al., 2013).

La amplia distribución de estas asociaciones sugiere un origen evolutivo antiguo, posiblemente vinculado a la colonización inicial del ambiente terrestre por las plantas, contribuyendo a su establecimiento en hábitats con condiciones ambientales limitantes (Taylor et al., 2007). Actualmente, se reconoce que los HE pueden proporcionar numerosos beneficios a sus hospederos, incluyendo una mejora en la adquisición de nutrientes, estimulación del crecimiento, protección frente a patógenos e insectos herbívoros, modulación de rutas hormonales y aumento de la tolerancia frente a diversos estreses abióticos, tales como sequía, salinidad y temperaturas extremas (Mejía et al., 2014; Agbessenou et al., 2020; Pietro-Souza et al., 2020; Gupta et al., 2021; Sui et al., 2023; Muhorakeye et al.,

2024). Estas interacciones se sustentan en un intercambio bidireccional de recursos entre la planta y el hongo. Mientras la planta provee compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis, incluyendo carbohidratos, aminoácidos, proteínas y moléculas señalizadoras, los hongos contribuyen al acceso y utilización de recursos limitantes presentes en el suelo (Huang et al., 2014; Massalha et al., 2017; López-Ráez et al., 2017). Entre estos beneficios, la facilitación de nutrientes destaca como uno de los mecanismos más relevantes, dado que influye directamente en la síntesis de proteínas estructurales, enzimas metabólicas y compuestos asociados a defensa (Christian et al., 2019).

Los efectos de las asociaciones simbióticas con hongos sobre la nutrición vegetal han sido estudiados principalmente en asociaciones micorrícicas. Diversos trabajos han demostrado que los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) incrementan la eficiencia de utilización de nutrientes mediante modificaciones fisiológicas y moleculares en la planta hospedera. Por ejemplo, Zhang et al. (2023) observaron que plántulas de morera (*Morus alba*) inoculadas con *Funneliformis mosseae* y *Rhizophagus irregularis* presentaron una mayor acumulación de N y una reducción en la relación C foliar bajo condiciones de desertificación rocosa, indicando una mejora en la eficiencia de utilización del N (NUE). Del mismo modo, Wu et al. (2023) demostraron que hongos septados oscuros (HSO) incrementaron la expresión del transportador de nitrato NRT2.1 en plántulas de *Gise/a* sometidas a bajas concentraciones de nitrato. Asimismo, Koegel et al. (2013) reportaron la inducción del transportador de amonio AMT3.1

en raíces micorrizadas, mientras que Di Martino et al. (2022) observaron que la inoculación con *F. mosseae*, *R. irregularis* y *Gigaspora coronatum* aumentaron la actividad de nitrato reductasa (NR) y glutamina sintetasa (GS), promoviendo la acumulación de aminoácidos relacionados con el metabolismo del nitrógeno y mejorando el crecimiento vegetal bajo condiciones de limitación nutricional.

Si bien los mecanismos asociados a las micorrizas han sido ampliamente estudiados, durante las últimas décadas ha emergido un creciente interés por otros grupos de hongos endófitos con potencial para modular la nutrición vegetal. Entre ellos destacan los hongos entomopatógenos endófitos (HEE), un grupo que incluye principalmente especies de los géneros *Metarhizium* y *Beauveria*. Los HEE son cosmopolita y de vida libre en el suelo. Tradicionalmente, estos hongos entomopatógenos fueron estudiados en un contexto de control biológico, por su capacidad para infectar insectos mediante la adhesión a la cutícula, la penetración de los tejidos internos y la posterior colonización del huésped, culminando con su muerte y esporulación sobre el cadáver (Wang et al., 2024). Sin embargo, se ha demostrado que estos microorganismos también pueden establecer asociaciones endofíticas con plantas, colonizando raíces, tallos y hojas sin generar síntomas visibles de enfermedad (Hu y Bidochka, 2021). Uno de los hallazgos más relevantes asociados a los HEE es su capacidad para participar activamente en el ciclo del N desde el suelo hacia los tejidos de la planta. Estudios realizados por Behie et al. (2012) y Behie y Bidochka (2014) demostraron que *Metarhizium spp.* pueden transferir N derivado de insectos

hacia las plantas hospederas, estableciendo un vínculo funcional entre los niveles tróficos del suelo y la nutrición vegetal. Posteriormente, Alquichire-Rojas et al. (2024) evidenciaron que cepas de *Metarhizium* y *Beauveria* incrementan la acumulación de N en raíces y el crecimiento de *Chenopodium quinoa* incluso en ausencia de insectos, mejorando parámetros fotosintéticos en condiciones de baja disponibilidad.

A pesar de estos avances, la mayor parte de la evidencia disponible proviene de especies agrícolas y plantas modelo. Aún se conoce relativamente poco acerca del papel estos géneros de hongos como endófitos en gimnospermas nativas, particularmente coníferas que habitan ecosistemas naturalmente oligotróficos. En este contexto, estudiar los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de las plantas asociados a estas interacciones podría aportar información relevante sobre cómo los microorganismos modulan el metabolismo del N.

1.3 *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch (Araucariaceae)

Araucaria araucana - conocida como “pehuén” por el pueblo Mapuche-Pehuenche - es una conífera nativa exclusiva de Chile y Argentina, que crece predominantemente en la Cordillera de los Andes y en la Cordillera de la Costa (Hechenleitner et al., 2005). Esta especie representa una conexión evolutiva con los períodos Jurásico y Cretácico, cuando la familia Araucariaceae presentaba una diversidad y distribución casi cosmopolita (Kunzmann, 2007). Desde finales

del Cretácico, esta familia redujo paulatinamente su número de especies y su alcance geográfico, quedando actualmente confinada al hemisferio sur, en parte debido a eventos geológicos y climáticos como el Último Máximo Glacial (UMG), que definieron su distribución actual (van der Ham et al., 2010; Villagrán, 2018).

Este árbol perenne y dioica, puede superar los 2.000 años de edad, alcanzar alturas cercanas a 40 m y diámetros de tronco superiores a 2 m (Veblen et al., 1996; Aguilera-Betti et al., 2017). Su crecimiento es notablemente lento, registrándose incrementos medios anuales de 0,43 mm en individuos adultos (>276 años) y de 1,04 mm en ejemplares jóvenes (<120 años) (Drake et al., 2005; Hadad et al., 2014). Se desarrolla principalmente sobre terrenos rocosos y arenosos de origen volcánico, entre los 650 y 1.700 m.s.n.m., donde las condiciones edáficas y climáticas imponen fuertes restricciones al crecimiento vegetal (Lusk, 2001; Reis et al., 2014). En comparación con otros bosques templados de la Patagonia, estos suelos presentan algunos de los contenidos más bajos de nitrógeno total (0,24 %) y carbono orgánico (4,0 %) (Satti et al., 2003). Asimismo, el N disponible se encuentra predominantemente en formas orgánicas disueltas (DON), mientras que las formas minerales son escasas debido a mecanismos conservativos de retención del nutriente, lo que limita su adquisición directa por las plantas y resalta la importancia del reciclaje interno y de las interacciones con la microbiota del suelo para sostener la nutrición vegetal (Diehl et al., 2003; Matus et al., 2025).

La persistencia de *A. araucana* en este ambiente ha sido atribuida a una estrategia funcional conservadora, propia de especies longevas y de crecimiento lento. Entre sus principales adaptaciones destacan hojas perennes, sésiles, de disposición espiralada y consistencia coriácea, provistas de una gruesa capa de cera, hipodermis lignificada, abundantes tejidos de sostén y una elevada masa foliar por unidad de área (*Leaf Mass per Area*, LMA) (Brodribb et al., 2005; Ojeda et al., 2017). Además, presenta estomas tetracíticos distribuidos en ambas superficies de la hoja y organizados en filas paralelas separadas por dos a cuatro hileras de células epidérmicas (Barrera y Meza, 1991). A nivel fisiológico, *A. araucana* conserva rasgos característicos de especies evolutivamente antiguas, como una baja densidad estomática y estomas de gran tamaño. Esta combinación disminuye la conductancia estomática, ralentiza el intercambio gaseoso frente a fluctuaciones ambientales y limita la difusión de CO₂ hacia el mesófilo (Rivera et al., 2022).

En conjunto, estos rasgos morfológicos y fisiológicos favorecen una baja tasa de renovación y descomposición foliar, promoviendo una utilización eficiente de los recursos y una mayor capacidad de persistencia bajo condiciones ambientales adversas (Lambers et al., 2008). La elevada inversión en estructuras foliares de larga duración, reflejada en sus altos valores de LMA, constituye una estrategia funcional estrechamente vinculada a la economía de nutrientes. En especies con estas características, una proporción importante del nitrógeno foliar se destina a componentes estructurales, como las paredes celulares (lignina), en lugar de

proteínas fotosintéticas, reduciendo la concentración de nitrógeno por unidad de masa (Wright et al., 2004; Onoda et al., 2017; Kuusk et al., 2018). De este modo, la combinación de una alta inversión estructural, una lenta dinámica de recambio foliar y una baja demanda nutricional favorece la supervivencia de *A. araucana* en ambientes con disponibilidad limitada de recursos (Berendse, 1994; Wright et al., 2004).

La *Araucaria* está clasificada como “En Peligro” por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) desde 2018, luego de haber sido catalogada como “Vulnerable” desde 2011 (IUCN Red List, 2011). Entre las principales amenazas que enfrenta se encuentran el cambio de uso de suelo, la explotación maderera, los incendios forestales y los efectos del cambio climático, los cuales han favorecido además la aparición y propagación de enfermedades foliares causadas por microorganismos fitopatógenos que anteriormente no afectaban de manera significativa a esta especie (Saavedra y Willhite, 2017; Lignum, 2017; Sanfuentes et al., 2022; Balocchi et al., 2022; Sanguinetti et al., 2023; Balocchi et al., 2023). No obstante, el principal desafío para la persistencia de *A. araucana* no radica únicamente en la supervivencia de los árboles adultos, sino en el establecimiento de nuevas generaciones. En condiciones naturales, solo una pequeña proporción de las semillas producidas logra superar los múltiples filtros ecológicos que actúan durante la regeneración, incluyendo la limitada dispersión, la depredación por fauna nativa y exótica, la disponibilidad de micrositios adecuados para la germinación y la acción de distintos factores

bióticos y abióticos que restringen el establecimiento de las plántulas (Sanguinetti y Kitzberger, 2009; Sanguinetti et al., 2023). Una vez emergidas, estas constituyen la etapa más vulnerable del ciclo de vida, ya que destinan una parte importante de sus recursos metabólicos al crecimiento, reduciendo su capacidad para responder a condiciones de estrés y disminuyendo sus probabilidades de supervivencia (Facelli, 2008).

En este contexto, las interacciones con microorganismos benéficos asociados a las raíces han adquirido un creciente interés, debido a su potencial para favorecer el establecimiento temprano de especies forestales. En *A. araucana*, Chávez et al. (2023) demostraron que la inoculación con un consorcio de hongos micorrícicos arbusculares (*Acaulospora laevis*, *A. scrobiculata*, *A. punctata*, *Scutellospora calospora*, *Claroideoglomus cloroideum*, *C. etunicatum*, *Funneliformis mosseae*, *Paraglomus occultum*, *Glomus badium*, *G. intrarradices* y *Gigaspora margarita*) y hongos endófitos (*Phialocephala fortinii*, *Penicillium melinii*, *Umbelopsis dimorpha* y *Preussia cymatomera*) incrementó significativamente la tolerancia de las plántulas al estrés hídrico. Las plantas inoculadas presentaron una mayor acumulación de biomasa, un mayor contenido relativo de agua, un sistema radical más fino y ramificado, así como una mayor concentración de clorofila y una regulación más eficiente de prolina, evidenciando que la microbiota radicular puede modular procesos fisiológicos clave para la supervivencia durante las primeras etapas del desarrollo.

A pesar de estos avances, todavía se conoce poco sobre otros grupos de microorganismos benéficos asociados a *A. araucana*. Entre ellos, los hongos endófitos (HE) de los géneros *Metarhizium* y *Beauveria* podrían desempeñar un papel importante en el metabolismo del nitrógeno de la planta sin depender de insectos. Por ello, resulta de interés estudiar su efecto sobre procesos como la actividad de enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno, la acumulación de aminoácidos, proteínas y otros metabolitos relacionados con el metabolismo primario y secundario. Comprender estos mecanismos permitirá ampliar el conocimiento sobre el funcionamiento fisiológico de esta conífera relictas y amenazada, además de aportar información útil para desarrollar estrategias que favorezcan el establecimiento de plántulas y fortalezcan los programas de conservación y restauración de *Araucaria araucana*.

Pregunta de investigación

- I) En condiciones de limitación de nitrógeno, ¿pueden los hongos *Beauveria* y *Metarhizium* modificar el metabolismo del nitrógeno en plántulas de *A. araucana*, promoviendo cambios fisiológicos, bioquímicos y metabólicos asociados al crecimiento vegetal?

Hipótesis

En condiciones de limitación de nitrógeno, los HE favorecen la asimilación metabólica y utilización del nitrógeno en plántulas de *Araucaria araucana*.

Objetivo general

Evaluar el efecto de HE de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* sobre la asimilación y utilización metabólica del nitrógeno en *Araucaria araucana* sometidas a diferentes niveles de NH_4NO_3 , como fuente de N.

Objetivos específicos

- I. Evaluar la capacidad de colonización radicular de las distintas cepas de HE y su interacción con la disponibilidad de N
- II. Evaluar el efecto de la inoculación entre los HE y el nivel de N en el crecimiento de *A. araucana*
- III. Evaluar los cambios en el contenido de N, C y compuestos orgánicos asociados al metabolismo nitrógeno y carbono de *Araucaria araucana* y su interacción entre HE y nivel de N.
- IV. Evaluar la actividad de enzimas clave en la asimilación de N en respuesta a la inoculación y disponibilidad de N.
- V. Integrar las respuestas fisiológicas, bioquímicas y metabólicas de *A. araucana* para identificar los mecanismos asociados a la interacción entre HE y nivel de N.

2 METODOLOGÍA

2.1 Diseño experimental

El experimento se realizó en plántulas de 5 meses crecidas en condiciones controladas. El diseño fue completamente al azar y con dos factores principales: (i) Disponibilidad de nitrógeno (N), con dos niveles - alto N (4 mM de NH_4NO_3) y bajo N (0.4 mM de NH_4NO_3) - e (ii) Inoculación con hongos endófitos (HE), considerando cuatro tratamientos fúngicos: Control o No inoculado (Ni), inoculado con *Beauveria sp.* (Bs), inoculado con *Metarhizium sp.* (Ms) y una Co-inoculación con ambas cepas (Co-I). En total fueron 8 tratamientos combinados, cada tratamiento con 15 réplicas sumando 120 plántulas en total.

Al finalizar el experimento, el tejido aéreo y radicular fue cosechado y procesado según análisis. Réplicas biológicas fueron utilizadas para la determinación de biomasa seca, azúcares solubles totales, almidón, contenido elemental e isotópico (N, C, $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$), para lo cual las muestras fueron secadas en estufa hasta peso constante. Fracciones de otras réplicas frescas fueron inmediatamente congeladas para la cuantificación de aminoácidos libres, proteínas solubles, pigmentos fotosintéticos y actividades enzimáticas asociadas al metabolismo del N. Otra fracción fue liofilizada para los análisis de metabolómica. Adicionalmente, se recolectaron muestras radiculares frescas para la cuantificación de ADN genómico fúngico mediante qPCR.

2.2 Germinación de piñones de *A. araucana*

Las semillas de *A. araucana* (piñones) se obtuvieron de la comunidad recolectora Mapuche-Pehuenche desde la comuna de Lonquimay (38°26'00"S 71°14'00"O), región de la Araucanía, Chile.

Antes de germinación, los piñones fueron desinfectados superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5% durante 5 minutos y enjuagados con agua destilada estéril para eliminar residuos de NaClO. Se cortó la punta de la cáscara sin dañar el embrión y se sumergió en agua destilada estéril durante 24 horas para permitir la entrada de agua. Al día siguiente los piñones fueron sembrados en frascos de vidrio estériles de 1 L, que contenían una mezcla también estéril de vermiculita y perlita en proporción 1:1 (v/v). Se enterró la mitad del piñón desde la punta en posición vertical. Para mantener la humedad relativa al 80% y un leve intercambio gaseoso se reemplazó la tapa del frasco con papel aluminio. La temperatura de germinación fue de 25°C durante 30 días en donde aparecieron los primeros cotiledones.

2.3 Inoculación de cepas fúngicas

Los hongos endófitos (HE) *Beauveria sp.* y *Metarhizium sp.* fueron colectados de suelos de Chile Central. Estas cepas fueron aisladas y secuenciadas en el laboratorio de Ecología Química, Pontificia Universidad Católica de Chile. Los HE se replicaron *in vitro* en placas Petri con un medio de cultivo Papa dextrosa agar (PDA) a 22°C y en oscuridad durante 3 semanas, tiempo en que ocurre la

producción de células reproductivas (esporulación) llamadas conidios. Esta parte del experimento se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica, Departamento de Botánica, Universidad de Concepción. Las suspensiones de conidios se obtuvieron raspando la superficie de cultivo y liberadas en una solución esterilizada de Tritón X al 0.05%. Se centrifugó dos veces a 5000 rpm por tres minutos para desechar el micelio y luego se filtró para obtener un inóculo fresco y homogéneo. Se determinó las concentraciones de conidios mediante un hemocitómetro (Fuchs-Rosenthal) y se llevaron a 1×10^7 esporas mL^{-1} . La inoculación fue realizada una sola vez, aplicando 1 mL de la suspensión fúngica directamente en la raíz de cada plántula, al momento del trasplante. Posterior a ello, para asegurar el éxito de la inoculación se mantuvieron 30 días sólo regadas con agua.

2.4 Tratamiento nutricional

Las plántulas germinadas aún adosadas al tejido interno de su semilla fueron trasplantadas a macetas de 300 mL de volumen. Se utilizó arena gruesa estéril como sustrato.



Figura B. Plántulas de *A. araucana* 30 días aproximadamente después del trasplante y tratamiento fúngico.

Luego de 30 días desde el tratamiento fúngico, se inició el tratamiento nutricional con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado sin nitrógeno. Los contenidos del medio MS fueron: Ácido bórico 6.2 mg L^{-1} , Cloruro de calcio anhidro 332.2 mg L^{-1} , Cloruro de cobalto $\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg L^{-1} , Sulfato cúprico $\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg L^{-1} , $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.26 mg L^{-1} , Sulfato ferroso $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.8 mg L^{-1} , Sulfato de magnesio anhidro 180.7 mg L^{-1} , Sulfato de manganeso $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 16.9 mg L^{-1} , Ácido molíbdico $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg L^{-1} , Yoduro de potasio 0.83 mg L^{-1} , Fosfato de potasio monobásico 170 mg L^{-1} , Sulfato de Zinc $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.6 mg L^{-1} . El nitrógeno adicionado fue con nitrato de amonio (NH_4NO_3) en solución 1M, ajustado a niveles de alto nitrógeno (HN - 4mM) y bajo nitrógeno (LN - 0.4 mM) según tratamiento. El tratamiento nutricional con MS modificado y nitrato de amonio se suplementó cada 30 días durante el periodo

experimental, reemplazando un día de riego, con el fin de mantener la disponibilidad de N en el sustrato.

2.6 Condiciones de crecimiento

El experimento se llevó a cabo dentro de una cámara de crecimiento con condiciones controladas equipada con lámparas LED, estableciéndose las siguientes condiciones de crecimiento: intensidad lumínica de 700-800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD), temperatura diurna de 20 °C, temperatura nocturna de 17 °C, un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad, y una humedad relativa constante del 80%. Para el riego se calculó la capacidad de campo del suelo antes del trasplante saturando el sustrato hasta el drenaje, dejándolo drenar durante 24 h y registrando el contenido gravimétrico de agua. Este valor se consideró el 100% de la capacidad de campo. Durante el experimento, las macetas se pesaron periódicamente y para evitar pérdidas de nutrientes, el riego se ajustó al 70% de la capacidad de campo.

2.7 Mediciones de crecimiento y biomasa

La biomasa seca se determinó luego de cosechar todas las plantas y fraccionarlas en parte aérea y radicular. Se utilizaron 4 réplicas por tratamiento que fueron llevadas a la estufa 60°C durante 7 días para medir su peso seco.

2.8 Determinación de azúcares totales, almidón y carbohidratos no estructurales.

Se utilizó el tejido vegetal previamente secado a estufa y se pesó 100 mg en un tubo Eppendorf de 2 mL. Se utilizaron 4 réplicas por tratamiento. Se añadió 1 mL de etanol al 85% en el tubo. Se incubó por 12 h a temperatura ambiente y en agitación a 120 rpm. Luego, se centrifugó a 13000 rpm por 5 min a 4°C y se separó el sobrenadante del pellet. Se usó el sobrenadante para la determinación de azúcares solubles totales (AST) y el pellet para almidón. Del sobrenadante se le extraen 50 µL y se siguieron los pasos de determinación espectrofotométrica.

Se realizó una curva de calibración con Sacarosa en etanol al 85% (40 mg de Sacarosa en 20 mL de etanol al 85%), y se midieron 8 concentraciones [2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 mg/mL más el blanco con etanol al 85% que refleja la concentración de 0.00 mg/mL] y se realizó la determinación espectrofotométrica.

Para la determinación de almidón (gelatinización e hidrólisis) se evaporó completamente el etanol del tubo Eppendorf que contenía el pellet en estufa a 50°C por toda una noche. Completamente seco, al tubo se le adicionó 200 µL de etanol al 85% y 1.2 mL de H₂O destilada. Se mezcló y se incubó a 100°C en estufa por 30 min. Se enfrió en hielo y se preparó dos blancos sin muestras. Se agregó 400 µL de solución Amiloglucosidasa (1.45 mg de enzima por mL de Buffer Acetato de sodio 0.1 M a pH 4.8). Se incubó por la noche a 45°C y luego

de enfriar los tubos en hielo por 5 min y centrifugar a 13000 rpm por 5 min se procedió a seguir los pasos de determinación espectrofotométrica.

Determinación espectrofotométrica: De cada tubo se toman 50uL y se añaden en un nuevo tubo Eppendorf 2 mL. Se añaden 1.5 mL de Reactivo de Antrona (1.5g/L en H₂SO₄ 72% en etanol al 85%) y agita levemente para homogeneizar. Se calienta a 90°C (con la tapa del tubo eppendorf abierta) por 10 min y luego se enfría en hielo por 5 min y se mide la absorbancia a 630 nm (Tecan Infinite 200 PRO multimode microplate reader).

Los carbohidratos no estructurales (CNE) se calcularon como la suma de las cantidades de azúcares solubles totales y almidón. Inicialmente, los resultados se expresaron como concentración de metabolitos en el tejido, en unidades de mg g⁻¹ de peso seco. Adicionalmente, se estimó el contenido total de azúcares, almidón y CNE por tejido (aéreo o radicular) multiplicando las cantidades por peso seco. De esta forma, los resultados fueron expresados como mg por planta, permitiendo evaluar la acumulación total de carbohidratos.

2.9 Aminoácidos libres y proteínas solubles totales.

Los aminoácidos libres (AAL) se cuantificaron siguiendo el método de López-Hidalgo et al. (2021). Para los AAL se utilizaron 4 réplicas por tratamiento. Se pesaron 10 mg de tejido liofilizado en 1 mL de etanol al 80% a 4 °C en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugaron (10 000 × g, 10 min).

Se tomaron 150 μL del sobrenadante y puestos en otros tubos Eppendorf de 1.5mL se le agregaron 75 μL de reactivo de ninhidrina en solución. Los tubos fueron calentados a 100°C por 10 min en un incubador de baño seco (MK200-1 de Allsheng). Se realizó lo mismo para los blancos (control) que consistió en 75 μL de reactivo de ninhidrina en 150 μL de etanol al 80%. Luego, los tubos eppendorf fueron colocados en hielo y se adicionaron 375 μL de etanol al 95% y se agitó levemente para homogeneizar.

Se realizó una curva estándar a partir de 1 mg mL^{-1} de L-prolina y de L-glicina (AAL) en etanol al 80%. Luego se mezcló el mismo volumen de L-prolina y L-glicina (1:1) para preparar diluciones seriadas (1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625 y 0.03125 mg mL^{-1}) en etanol al 80% en agua destilada. También se mantuvo una solución de etanol al 80% en agua destilada que refleja 0.00 mg mL^{-1} de aminoácidos. Los estándares tienen que someterse bajo el mismo procedimiento anterior (adición de ninhidrina, incubación y etanol al 95%)

Se tomaron 200 μL de muestra, estándares y blancos para las mediciones espectrofotométricas en microplacas de 96 pocillos (Tecan Infinite 200 PRO multimode microplate reader). Las concentraciones de AAL se calcularon midiendo la absorbancia a 570 nm y expresados como mg de una cantidad equivalente de L-prolina y L-glicina por mL, utilizando la curva de calibración preparada previamente con soluciones estándar de 1 a 0 mg mL^{-1} .

La determinación de contenido de proteínas solubles totales (PST) se determinó según el ensayo de Bradford (1976) utilizando como estándar proteína Albumina de Suero Bovino (BSA). Para el contenido de proteínas se utilizaron 4 réplicas por tratamiento. Se pesaron 10 mg de material vegetal liofilizado con 1 mL de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 1%PVP, 50mM NaCl y 0.2 β -mercaptoetanol) en tubos eppendorf de 1.5 mL. Las muestras se disrumpieron con un homogeneizador Bioprep-24R (All Sheng) y luego se centrifugó a 11.000 rpm durante 5 min a 4°C. Luego, se tomaron 150 μ L del sobrenadante y se le adicionaron 600 μ L de Bradford diluido 1:3 en agua destilada (v/v). Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y su concentración midió por espectrofotometría a 595 nm.

La concentración de proteínas se cuantificó mediante una curva de calibración elaborada con BSA, utilizando concentraciones de 2 - 1.5 - 1 - 0.5 - 0.3 - 0.2 - 0.1 y 0.05 mg mL⁻¹ del suero. También se mantuvo una solución de agua destilada que refleja 0.00 mg mL⁻¹ de proteínas. Los estándares fueron sometidos al mismo procedimiento descrito para las muestras, mediante la adición del reactivo de Bradford y posterior lectura de absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas de las muestras se calculó a partir de la ecuación de regresión obtenida de la curva estándar y los resultados se expresaron como mg de proteínas solubles totales por g de peso seco.

2.10 Mediciones de la actividad enzimática de NR, GS y GDH.

La asimilación del N en hojas y raíces se midió a través de las enzimas NR, GS y GDH, utilizando 4 réplicas por tratamiento. La actividad de la enzima Nitrato Reductasa (NR; EC 1.6.6.1) se midió de acuerdo con el protocolo descrito por Hageman y Hucklesby, 1971, con modificaciones. Se pesaron 100 mg de tejido foliar y radicular fresco (-80°C) con 1 mL de un Buffer de extracción (50 mM de fosfato, 1 mM de EDTA, 25 mM de L-cisteína, 1 mM de PMSF a pH 8.8). Luego, de homogeneizar con un vortex, la mezcla se centrifugó a 11000 rpm durante 10 minutos a 4°C . Se extrajeron 100 μL del sobrenadante, los cuales se incubaron con 900 μL de un tampón de reacción (50 mM de fosfato, 10 mM de KNO_3 y 0.1 mM de NADH). Se midió la reacción del NO^{-3} a NO^{-2} con la oxidación de NADH a NAD^{+} relacionando la cantidad de NADH consumido por el NO^{-2} formado. Esta se cuantificó a 340 nm utilizando un espectrofotómetro (Tecan Infinite 200 PRO multimode microplate reader), a tiempo 0, 5, 10, 15 y 20 min. Se realizaron dos blancos por muestra, el primero en que el extracto enzimático se incubó con el tampón de reacción sin NADH y otro blanco con el extracto enzimático previamente desnaturalizado (a 90°C) e incubada con NADH. La actividad específica de la enzima NR se expresó como μmol de NO^{-2} formado h^{-1} mg proteína $^{-1}$

La actividad de Glutamina Sintetasa (GS, EC: 6.3.1.2) se realizó siguiendo el protocolo descrito por Lea (1990) basada en la conversión de hidroxamina (NH_2OH) a γ -glutamihidroxamato con el consumo de ATP. Se pesaron 100 mg

de tejido foliar y radicular fresco (-80°C) con 1 mL de un Buffer de extracción (100 mM de Tris-HCl, 3.3mM MgCl_2 , 10mM b-mercaptoetanol, 15% Etilenglicol (v/v) y 1mM DTT a pH 7.8). Luego de homogeneizar con un vortex, se centrifugó a 11.000 rpm por 20 min a 4°C . Se usaron 200 μL del sobrenadante y se agregaron 500 μL de Buffer de reacción (100 mM Tricina, 80mM ácido glutámico, 20 mM MgSO_4 , 8mM ATP, 6mM hidroxilamida, 1mM EDTA a pH 7.8). Se dejaron por 15 min a 25°C con un incubador de baño seco (MK200-1 de Allsheng). Luego la reacción se detuvo con 500 μL de Buffer de detención (0.67M FeCl_3 , 0.37M HCl y 20% TCA). Por último, el γ -glutamihidroxamato se determinó espectrofotométricamente a 540 nm. Se realizaron dos blancos; una con el extracto enzimático y su tampón de reacción, sin la adición de ATP; y otro con la enzima previamente desnaturalizada (a 90°C) e incubada con ATP. La actividad GS se calculó utilizando una curva de calibración de hidroxamato y se expresó como $\mu\text{mol } \gamma\text{-glutamihidroxamato formados h}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

La medición de la actividad enzimática de aminación y desaminación de la enzima Glutamato Deshidrogenasa (GDH, EC: 1.4.1.2) se realizó siguiendo el protocolo descrito por Kumar et al., (2000). Se midió la actividad reductora (aminación) del α -cetoglutarato utilizando NADH y la actividad oxidativa (desaminación) del glutamato utilizando NAD^+ como oxidante para producir α -cetoglutarato y NH_4^+ . Para la reacción de aminación GDH se pesaron 100 mg de tejido foliar y radicular fresco (-80°C) con 1 mL de un Buffer de extracción (100 mM de Tris-HCl, 3.3mM MgCl_2 , 10mM b-mercaptoetanol, 15% Etilenglicol (v/v) y

1mM DTT a pH 7.8). Luego de homogeneizar con un vortex, se centrifugó a 11.000 rpm por 20 min a 4°C. Se usaron 100 μ L del sobrenadante con 900 μ L de buffer de reacción (76mM buffer fosfato, 0.1% b-mercaptoetanol, 0.1mM NADH, 200mM α -cetoglutarato, 200mM NH_4SO_2 a pH 8.1). La oxidación de NADH se siguió mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm a tiempo 0, 5, 10, 15 y 20min. Se realizaron dos blancos por muestra, el primero en que el extracto enzimático se incubó con el tampón de reacción sin NADH y otro con el extracto enzimático previamente desnaturalizado (a 90°C) e incubada con NADH. La actividad específica de GDH aminación se expresó como nmol de NADH oxidado $\text{h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$. Para la reacción de desaminación GDH se pesaron 100 μ L de extracto con 900 μ L del buffer de reacción (76mM buffer fosfato, 0.1% b-mercaptoetanol, 0.1mM NADH, 200mM α -cetoglutarato, 200mM NH_4SO_2 a pH 8.1). La reducción del NAD^+ se siguió mediante el aumento de la absorbancia a 340 nm a tiempo 0, 5, 10, 15 y 20min. Se realizaron dos blancos por muestra, el primero en que el extracto enzimático se incubó con el tampón de reacción sin NAD^+ y otro con el extracto enzimático previamente desnaturalizado (a 90°C) e incubada con NAD^+ . La actividad específica de GDH desaminación se expresó como nmol de NAD^+ reducido $\text{h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

2.11 Contenido de Nitrógeno, carbono y composiciones isotópicas

El contenido relativo de nitrógeno (%N), composición isotópica de nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$), contenido relativo de carbono (%C) y composición isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) en el tejido aéreo fueron determinados utilizando el método de

espectrometría de masas de ratio isotópico (20-20 IRMS-GSL, SERCON Limited, Reino Unido), en el Laboratorio de Investigación de Suelos, Aguas y Bosques, Universidad de Concepción. Para el análisis se emplearon aproximadamente de 2 mg de muestra seca en estufa y finamente molida. Las relaciones isotópicas de N y C fueron expresadas en unidades de ‰ (partes por mil), en relación con estándares internacionales. Los valores obtenidos fueron calibrados utilizando estándares de referencia de Iso-Analytical (Crewe, Cheshire, Reino Unido). Este mismo procedimiento analítico fue aplicado para la determinación del carbono (%C) y nitrógeno (%N).

Para estimar el contenido total de N y C por planta (mg elemento planta⁻¹), los valores porcentuales obtenidos fueron convertidos en cantidades absolutas considerando el peso seco aéreo de cada muestra. Para ello se utilizó la siguiente relación. $\text{Contenido (mg)} = (\% \text{ elemento} / 100) \times \text{peso seco aéreo (mg)}$. Este procedimiento permitió expresar los resultados como acumulación total de N y C por tejido aéreo del individuo.

2.12 Pigmentos fotosintéticos

Se pesaron 10 mg de tejido aéreo liofilizado y homogeneizada para cuantificar la concentración clorofila (a, b y total) y carotenoides. Los pigmentos se extrajeron con etanol al 99.97% en tubos de tapa rosca de 2 mL y se utilizó un homogeneizador Bioprep-24R (All Sheng) con dos ciclos de 90 segundos a 4000 rpm considerando un ciclo de 15 segundos de descanso entre ciclos. Luego se

centrifugó ($10\,000 \times g$, 10 min). Se tomaron 200 μL del sobrenadante para las mediciones espectrofotométricas en microplacas de 96 pocillos. Los análisis de absorbancia (470, 649 y 664 nm) se realizaron con un espectrofotómetro (Tecan Infinite 200 PRO multimode microplate reader). La concentración de clorofila y carotenoides fueron expresados en $\mu\text{g mL}^{-1}$ y se calcularon como como clorofila a (Chl a) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) = $13,36 A_{664} - 5,19 A_{649}$; clorofila b (Chl b) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) = $27,43 A_{649} - 8,12 A_{664}$; clorofila total = (Chl a + Chl b) y; carotenoides ($\mu\text{g mL}^{-1}$) = $(1000 A_{470} - 2,13 \text{ Chl a} - 97,63 \text{ Chl b})/209$ (Lichtenthaler, 1987).

2.13 Análisis Metabólico

La preparación de las muestras y la extracción del Metaboloma para su análisis se realizó según un protocolo previamente descrito (Riquelme et al, 2022). En resumen, se añadieron 800 μL de solvente de extracción que contenía MTBE/Metanol/Agua (5:3:2) a 100 mg de muestra liofilizada y molida en crioviales de 2 mL para la extracción. Se procesaron simultáneamente tres blancos consistentes únicamente en el solvente de extracción. Las muestras se disrumpieron con un homogeneizador Bioprep-24R (All Sheng) con dos ciclos de 90 segundos a 4000 rpm considerando un ciclo de 15 segundos de descanso entre ciclos. Las muestras se centrifugaron a $13,000 \times g$ a 4°C durante 15 minutos y los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos crioviales de 2 mL. Se realizó una extracción líquido-líquido añadiendo 400 μL de agua y 400 μL de MTBE a cada muestra. Las muestras se mezclaron usando un homogeneizador Bioprep-24R (All Sheng) con un ciclo de 60 segundos a 2500 rpm y luego se centrifugó

nuevamente a $13,000\times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Luego de la centrifugación aparecieron 2 fases: fracciones hidrofóbicas (capa superior) y fracciones hidrofílicas (capa inferior), además de una interfase que contenía las proteínas.

Las fracciones hidrofóbicas (capa superior) e hidrofílicas (capa inferior) se transfirieron cuidadosamente a nuevos tubos y se secaron durante la noche usando un Concentrador Refrigerado Centrivap a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los extractos secos e hidrofóbicos se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y serán conservados para un futuro análisis de lipidómica. Por otro lado, los extractos hidrofílicos fueron utilizados para análisis de metabolómica.

El perfil y análisis de metabolitos se realizó en la Unidad de Espectrometría de Masas y Secuenciación (PUC, Santiago, Chile) utilizando una plataforma metabolómica global no dirigida con análisis de Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento - Espectrometría de Masas en Tándem (UPLC-MS). La extracción general se realizó con acetonitrilo frío al 80%, grado LC-MS. Se aplicó vórtex durante 10 seg. Se colocó en baño ultrasonido por 10 min en hielo para posteriormente centrifugar a 10.000 g por 10min y obtener el sobrenadante que fue transferido a un vial de HPLC. La cromatografía se realizó en una columna Kinetex C18 de $2,1\text{ mm} \times 100\text{ mm}$, con partícula de $1.7\mu\text{m}$. Las fases móviles consistieron en (A) agua + 10 mM de formiato de amonio y (B) acetonitrilo. La elución se llevó a cabo mediante un gradiente binario de flujo de $400\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. La temperatura de la columna se mantuvo a 30°C , mientras que las muestras se

conservaron a 8°C durante el análisis. El volumen de inyección fue de 3 µL. El programa de gradiente comenzó con 5% de fase móvil A y 95% de fase móvil B (0–0,2 min), seguido de un aumento progresivo hasta 20% A y 80% B a los 8 min. Posteriormente, la composición se incrementó a 30% A y 70% B entre los 9 y 10 min. Finalmente, las condiciones iniciales (5% A y 95% B) fueron restablecidas a los 10,2 min y mantenidas hasta los 11 min para la re-equilibración de la columna. La detección se realizó mediante espectrometría de masas operando en modos de ionización positivo y negativo. La adquisición de datos se efectuó en tres segmentos: (i) equilibración del sistema, (ii) calibrante, para la recalibración posterior de las mediciones y (iii) adquisición de los datos correspondientes a las muestras. El análisis de datos crudos se llevó a cabo utilizando el software MetaboScape 4.0. Los metabolitos se identificaron usando las librerías espectrales del RIKEN Center for Sustainable Resource Science : Metabolome Informatics Research Team y las librerías Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS). Posteriormente, las matrices de la abundancia metabolómica fueron exportadas y procesadas en RStudio (2025.09.2+418) utilizando scripts personalizados. Los nombres duplicados de metabolitos fueron corregidos mediante la función *make.unique ()*, permitiendo conservar señales repetidas como variables independientes sin pérdida de información. Para la construcción de los mapas de calor, se utilizó el paquete *pheatmap* de R y se calculó inicialmente el promedio de las cuatro réplicas biológicas de cada tratamiento (Ni, Bs, Ms y Co-I). Posteriormente, se eliminaron los metabolitos con

abundancia total nula entre tratamientos. Los datos fueron transformados mediante $\log_2(x+1)$ y posteriormente normalizados mediante auto escalado (Z-score) por metabolito. La normalización se realizó utilizando la matriz completa, conservando la estructura global del Metaboloma.

2.14 Amplificación de ADN fúngico en raíces

El ADN genómico se extrajo a partir de cultivos puros de micelio fresco de *Beauveria sp.* y *Metarhizium sp.*, así como de muestras de raíces de *Araucaria araucana* (100 mg de peso fresco), utilizando el kit NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis.

Para la detección y cuantificación de los hongos se utilizaron cebadores específicos dirigidos a regiones ribosomales de *Beauveria sp.* y *Metarhizium sp.* Para *Beauveria* spp. se empleó el par de cebadores BsF (5'-CAACCCTCGACCTCCCCTTG-3') y BsR (5'-GTCCCGGTGCGAGCTGTATT-3'), que amplifican un fragmento de 122 pb. Para *Metarhizium sp.* se utilizó el par de cebadores MsF (5'-CTTTGAACGCACATTGCGCC-3') y MsR (5'-GACGGCTGTGCTGGAAAACC-3'), que amplifican un fragmento de 127 pb.

Previo al análisis por qPCR, la concentración de ADN genómico de las muestras vegetales fue cuantificada y ajustada para asegurar una cantidad equivalente de ADN molde entre muestras. Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en

un sistema Agilent Mx3000P Real-Time PCR (Agilent Technologies, EE.UU.) utilizando Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies, EE.UU.). Cada reacción tuvo un volumen final de 15 μL , conteniendo 7,5 μL de Master Mix, 5 μL de ADN molde y 10 ng μL^{-1} de cada cebador.

Para *Beauveria sp.*, el programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, seguida de 40 ciclos de 90 °C durante 15 s, 57 °C durante 15 s y 72 °C durante 25 s. Para *Metarhizium sp.*, las condiciones de amplificación fueron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, seguida de 40 ciclos de 90 °C durante 15 s, 60 °C durante 15 s y 72 °C durante 25 s. En ambos casos, al finalizar la amplificación se realizó un análisis de curvas de disociación (melt curve) con las siguientes condiciones: 95 °C durante 30 s, 65 °C durante 30 s y 95 °C durante 30 s.

Las curvas estándar de cuantificación se construyeron a partir de diluciones seriadas de ADN genómico obtenido de cultivos puros de *Beauveria sp.* y *Metarhizium sp.* Los valores de Ct obtenidos para cada muestra fueron interpolados en las respectivas curvas estándar, transformándose posteriormente a cantidad de ADN fúngico siguiendo el procedimiento descrito por Smith y Osborn (2009). Cada muestra fue analizada en triplicado técnico y se utilizaron tres réplicas biológicas independientes para la validación del método.

La especificidad de la amplificación fue verificada mediante el análisis de curvas de fusión y confirmada posteriormente por electroforesis en gel de agarosa. La

colonización fúngica se expresó como nanogramos de ADN fúngico por 100 mg de peso fresco de raíz (ng ADN fúngico 100 mg PF⁻¹), considerando que todas las extracciones se realizaron a partir de una cantidad inicial estandarizada.

2.15 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) usando como factores el nivel de N y la inoculación con HE. Se realizó una prueba HDS de Tukey para identificar las medias con diferencias significativas (nivel de significancia de $p < 0.05$). Los datos fueron transformados según fue necesario para lograr normalidad y homogeneidad y los valores atípicos fueron descartados utilizando los criterios de las pruebas de Rosner (Rosner, 1975) y Dixon (Barnett y Lewis, 1995). Los análisis univariados y los gráficos se realizaron utilizando SigmaPlot para Windows (versión 11.0 Systat Software Inc., San José, CA, USA). Los análisis multivariados, incluyendo análisis de componentes principales (PCA), análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA) y mapas de calor (Heatmaps), fueron realizados en RStudio versión 2025.09.2+418, utilizando paquetes especializados para análisis metabolómico y visualización de datos.

3 RESULTADOS

3.1 Efecto del nivel de N y de los HE en la biomasa aérea y radicular de *Araucaria araucana*

La interacción HE x N (Tabla 1) tuvieron un efecto en la biomasa total de las plántulas de *Araucaria araucana* (Fig. S1, Anexo). Las diferencia significativas entre medias sólo se observó a LN, donde las plántulas inoculadas con los tres tratamientos de HE tuvieron mayor promoción de crecimiento por sobre las no inoculadas (Ni).

En detalle, en el tejido aéreo (Fig. 1A), la biomasa fue afectada únicamente por el nivel de nitrógeno (Tabla 1), observándose una menor acumulación de biomasa en las plantas cultivadas bajo LN en comparación con HN. En contraste, en el tejido radicular (Fig. 1B), la interacción entre el nivel de nitrógeno y los EIPF fue significativa (Tabla 1). Bajo condiciones de LN, las plantas inoculadas presentaron una mayor biomasa radicular que el tratamiento no inoculado (Ni-LN), siendo *Metarhizium* (Ms) el tratamiento con mayor efecto, al incrementar la biomasa radicular en un 38 % respecto del control.

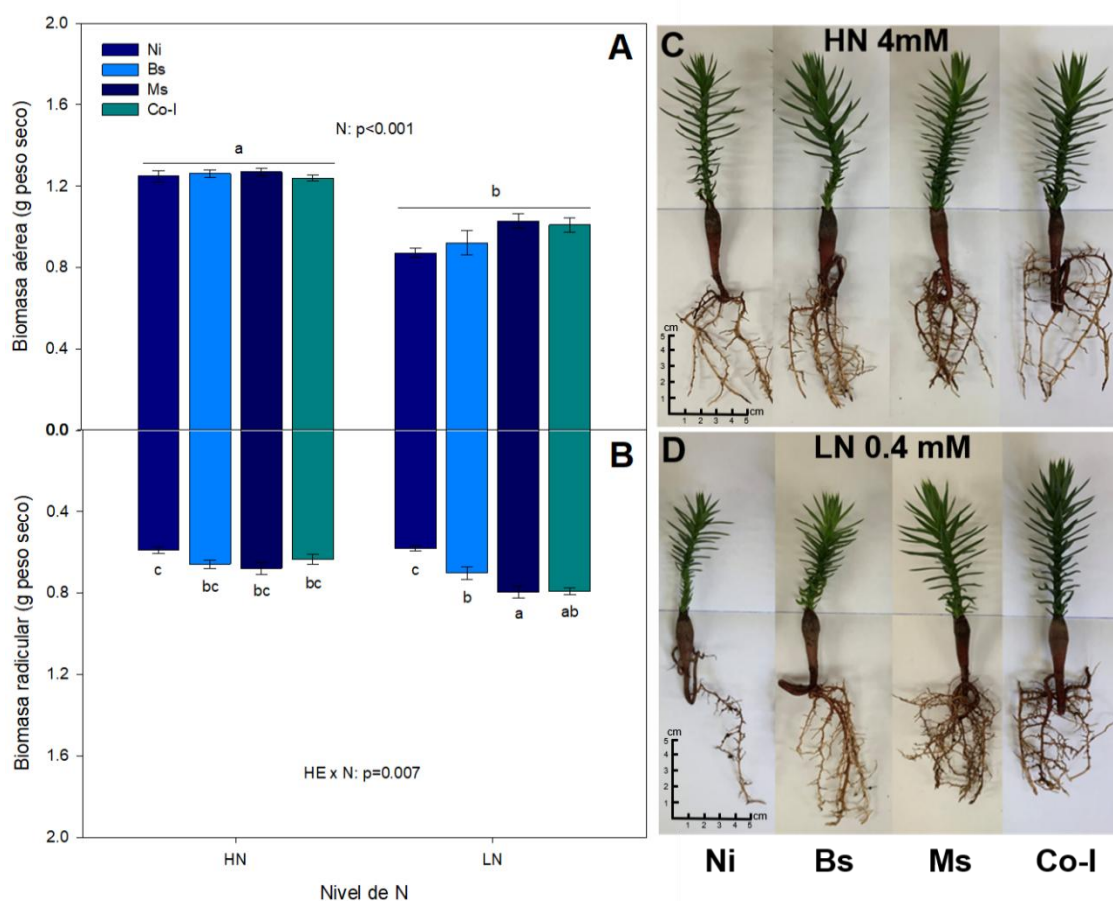


Figura 1. Efecto de la inoculación con HE y nivel de N sobre el crecimiento de las plántulas. (A) Biomasa aérea; (B) Biomasa radicular; (C) Fotografías representativas de plántulas de *A. araucana* cultivada a condiciones de alto nitrógeno (HN) y (D) cultivadas a condiciones de bajo nitrógeno (LN). Los tratamientos corresponden a plántulas no inoculadas (Ni), inoculadas con *Beauveria sp.* (Bs), *Metarhizium sp.* (Ms) y Co-inoculación (Co-I). Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar ($n = 4$). Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey (HSD, $p < 0.05$). Los valores de p para los efectos de inoculación fúngica (HE), nivel de N y su interacción (HE x N) se indican en cada gráfico.

3.2 Efecto del nivel de N y de los HE en el contenido de Azúcares solubles totales (AST), almidón y carbohidratos no estructurales (CNE)

Para el contenido de azúcares solubles totales (AST) en hojas (Fig. 2A), únicamente el nivel de nitrógeno tuvo un efecto significativo (Tabla 1). Las plántulas cultivadas bajo condiciones de LN presentaron un menor contenido de AST que aquellas mantenidas en HN. En el contenido de azúcares solubles totales (AST) en raíces (Fig. 2B), tanto la inoculación con HE como el nivel de N afectaron significativamente esta variable, aunque sin interacción entre ambos factores (Tabla 1). Las plantas cultivadas bajo condiciones de LN presentaron un mayor contenido de AST que aquellas mantenidas en HN. Además, los tratamientos con Ms y la Co-I mostraron mayores concentraciones de AST que el tratamiento no inoculado y Bs.

Para el contenido de almidón foliar (Fig. 2C), la interacción entre HE y el nivel de N fue significativa (Tabla 1). Bajo condiciones de HN, las plántulas inoculadas con Bs presentaron mayores concentraciones de almidón que las plantas Ni. En cambio, bajo condiciones de LN, las mayores concentraciones se observaron en las plántulas inoculadas con Ms y en la Co-I en comparación con el tratamiento no inoculado. El contenido de almidón en raíces (Fig. 2D) también fue afectado significativamente por la interacción entre los HE y el nivel de N (Tabla 1). Bajo condiciones de HN, las plántulas inoculadas con Bs presentaron las mayores concentraciones de almidón, mientras que en LN el mayor contenido se registró

en las plántulas inoculadas con Ms, en comparación con el tratamiento no inoculado (Ni).

Los carbohidratos no estructurales (CNE) en el tejido foliar (Fig. 2E) fueron afectados por la interacción entre HE x N (Tabla 1). Las diferencias se observaron sólo a HN, donde todos los tratamientos fúngicos presentaron mayores cantidades de CNE respecto a Ni. En las raíces (Fig. 2F) los CNE fueron significativamente afectados la interacción entre HE x N (Tabla 1). En HN, las plántulas inoculadas con Bs presentaron mayores CNE que Ni. En cambio a LN, fueron las plántulas inoculadas con Ms quienes tuvieron mayores concentraciones de CNE frente a las Ni.

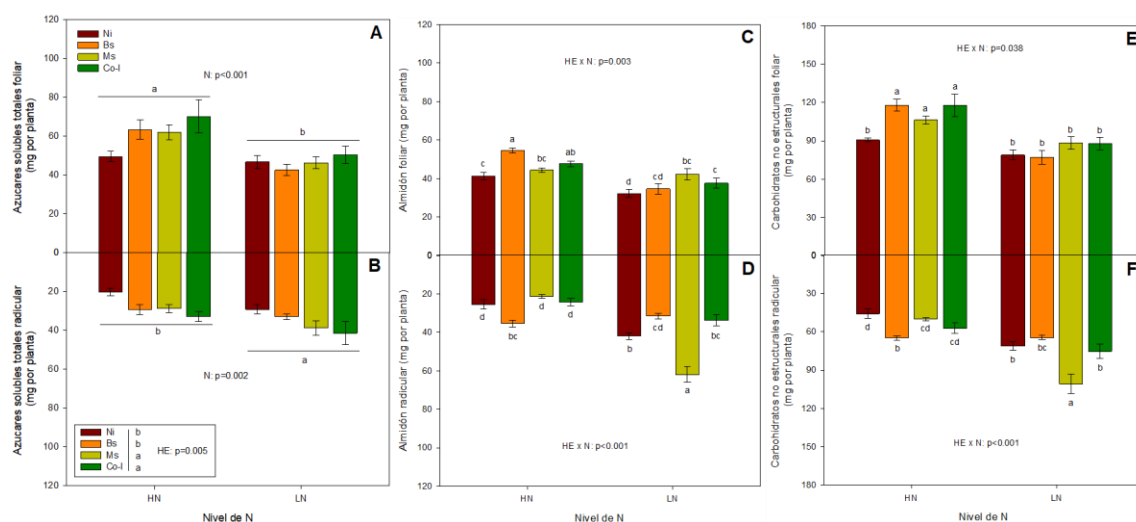


Figura 2. Contenido de carbohidratos en plántulas inoculadas con HE en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). (A) azúcares solubles totales en tejido foliar; (B) azúcares solubles totales radiculares; (C) almidón en tejido foliar; (D) almidón en raíces; (E) carbohidratos no estructurales en tejido aéreo; (F) carbohidratos no estructurales en raíces. Los tratamientos corresponden a plántulas no inoculadas (Ni), inoculadas con *Beauveria* sp. (Bs), *Metarhizium* sp. (Ms) y Co-inoculación (Co-I). Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar ($n = 4$). Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey (HSD, $p < 0.05$). Los valores de p para los efectos de inoculación fúngica (HE), nivel de N y su interacción (HE x N) se indican en cada gráfico.

3.3 Efecto del nivel de N y de los HE en aminoácidos libres totales (AAL) y proteínas solubles totales (PST)

La concentración de aminoácidos libres (AAL) en el tejido foliar (Fig. 3A) fue significativamente afectada por la interacción entre HE y N (Tabla 1). Las diferencias entre tratamientos fúngicos se observaron únicamente bajo HN, donde las plántulas inoculadas con Bs y Co-I presentaron mayores concentraciones de AAL respecto a las plántulas Ni. En raíces (Fig. 3B), el contenido de AAL fue afectado significativamente por la interacción entre HE y N (Tabla 1). A condiciones de HN, Bs y Co-I también presentaron mayores AAL respecto a Ni, siguiendo lo observado en el tejido aéreo. En contraste, a LN todos los inoculados superaron significativamente a Ni, destacando Ms con el mayor incremento de AAL radicales ($47.54 \mu\text{g mg peso seco}^{-1}$) en comparación con Ni ($7.08 \mu\text{g mg peso seco}^{-1}$).

La concentración de proteínas solubles totales (PST) en el tejido foliar (Fig. 3C) fue significativamente afectada sólo por niveles de N (Tabla 1). Se observó una mayor concentración en tratamientos LN por sobre HN. En raíces la concentración de PST (Fig. 3D) fueron afectadas significativamente sólo por la

inoculación HE (Tabla 1). Las plántulas inoculadas con Ms contuvieron mayores concentraciones de PST que las plántulas no inoculadas (Ni).

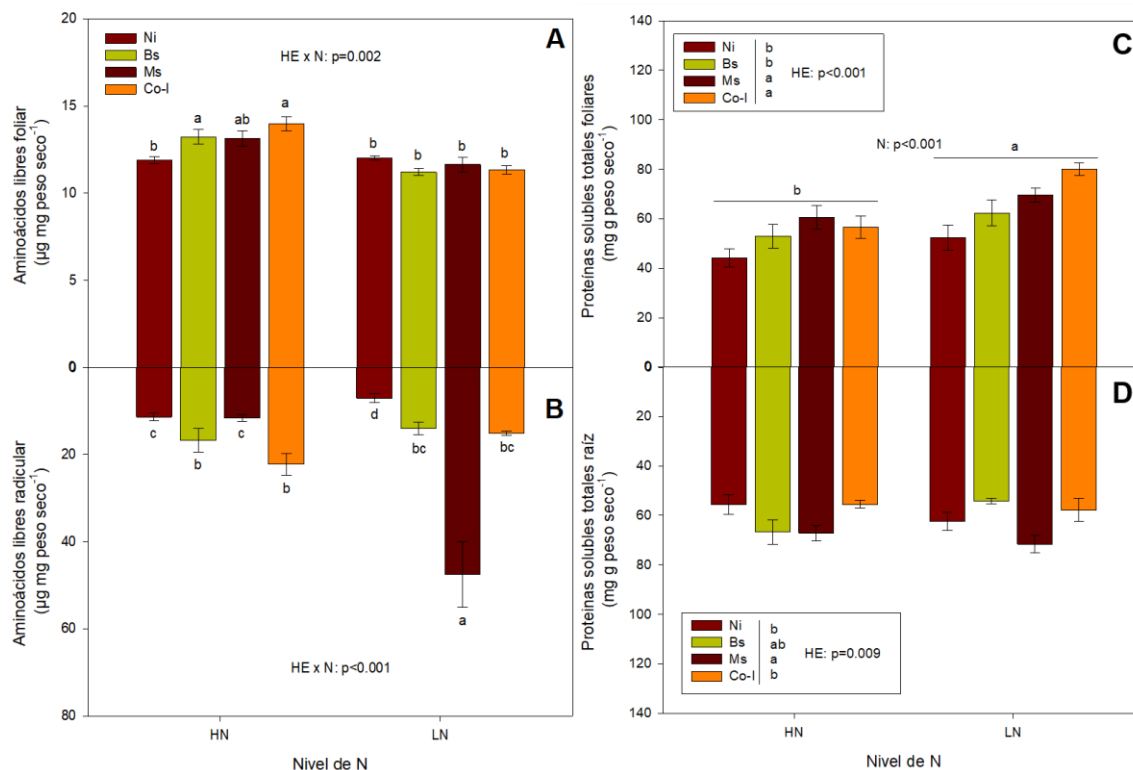


Figura 3. Concentración compuestos nitrogenados en hojas y raíces de plántulas inoculadas con HE en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). (A) aminoácidos libres en hojas; (B) aminoácidos libres en raíces; (C) proteínas solubles totales en hojas; (D) proteínas solubles totales en raíces. Los tratamientos corresponden a plántulas no inoculadas (Ni), inoculadas con *Beauveria sp.* (Bs), *Metarhizium sp.* (Ms) y Co-inoculación (Co-I). Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar ($n = 4$). Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey (HSD, $p < 0.05$). Los valores de p para los efectos de inoculación fúngica (HE), nivel de N y su interacción (HE x N) se indican en cada gráfico

3.4 Efecto del nivel de N y de los HE en Pigmentos fotosintéticos

La concentración de clorofila *a* (Fig. 4A) no presentó diferencias significativas entre tratamientos fúngicos ni entre niveles de N (Tabla 1). Para clorofila *b* (Fig. 4B), la interacción HE x N afectaron significativamente (Tabla 1), pero entre

tratamientos fúngicos no hubo diferencias con el control (Ni). La clorofila total (Fig. 4C) no presentó sólo diferencias entre HE y N (Tabla 1). Los carotenoides (Fig. 4D) fueron afectados por la interacción HE x N (Tabla 1). Pero al igual que en la clorofila B, no se observaron diferencias entre plantas inoculadas con las no inoculadas.

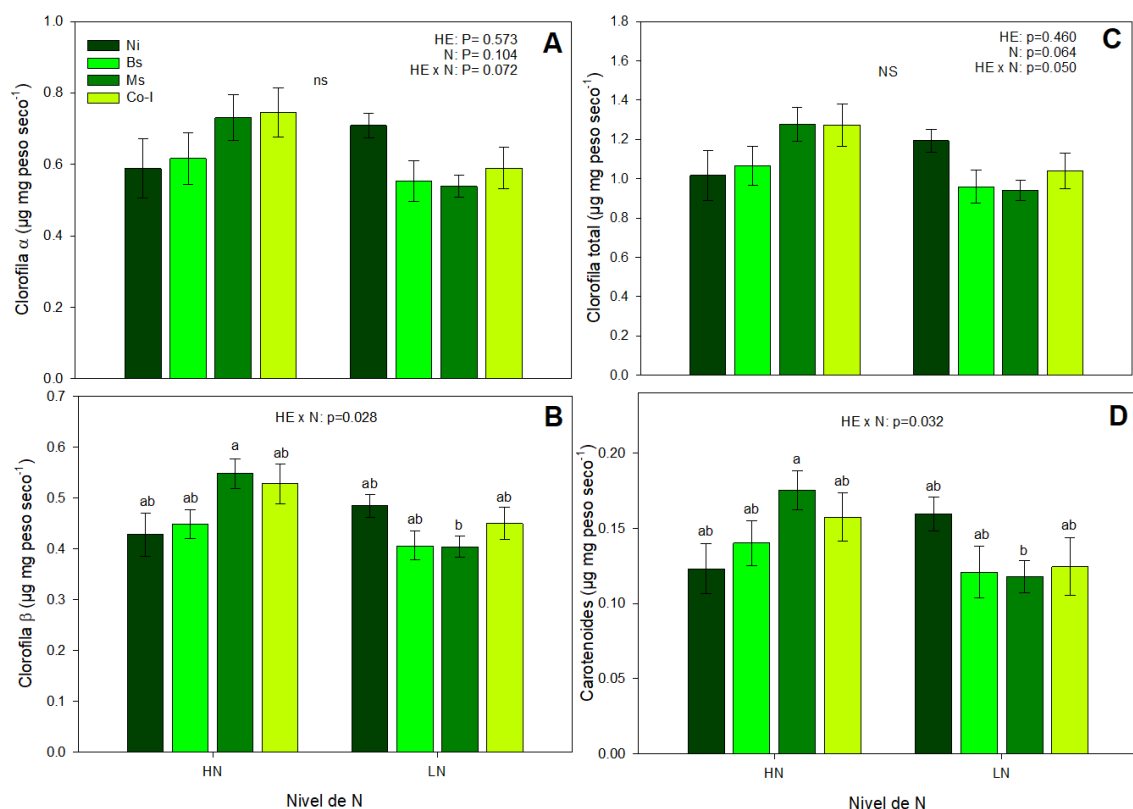


Figura 4. Contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de plántulas inoculadas con HE en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). (A) clorofila a; (B) clorofila b; (C) clorofila total; y (D) carotenoides. Los tratamientos corresponden a plántulas no inoculadas (Ni), inoculadas con *Beauveria sp.* (Bs), *Metarhizium sp.* (Ms) y Co-inoculación (Co-I). Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar ($n = 4$). Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey (HSD, $p < 0.05$); NS, indica ausencia de diferencias significativas ($p > 0.05$). Los valores de p para los efectos de inoculación fúngica (HE), nivel de N y su interacción (HE x N) se indican en cada gráfico

3.5 Efecto del nivel de N y de los HE en la Actividad de enzimas clave asociadas al metabolismo de N

La actividad nitrato reductasa (NR) en hojas (Fig. 5A) fue significativamente afectada sólo por la inoculación con HE (Tabla 1), los mayores cambios se observaron en tratamientos de inoculación especialmente Co-I y Ms con mayor actividad respecto a Ni. En raíces la NR, se vió afectada por la interacción entre HE y N (Tabla 1), donde las plántulas inoculadas con Co-I y Ms mostraron consistentemente las mayores actividades de NR, diferenciándose significativamente de Ni y Bs.

La actividad de glutamina sintetasa (GS) en hojas se vió afectada por la interacción entre HE y N (Tabla 1). En HN, todos los tratamientos inoculados presentaron una mayor actividad de GS que el tratamiento Ni. Asimismo en LN, este efecto se observó únicamente en las plántulas inoculadas con Ms y Co-I.

La actividad aminante de GDH (GDH-NADH; Fig. 6A y 6B) fue significativamente afectada por la interacción entre HE y N tanto en el tejido foliar como radicular (Tabla 1). En hojas, las diferencias entre tratamientos se observaron únicamente a HN, donde las plántulas inoculadas con Ms presentaron la mayor actividad enzimática, superando significativamente a los demás tratamientos. En raíces, Bs presentó consistentemente la mayor actividad aminante en ambos niveles de N, diferenciándose ampliamente de Ni. Por otro lado, la actividad desaminante

de la glutamato deshidrogenasa (GDH-NAD⁺; Fig. 6C y 6D) fue afectada significativamente por la interacción entre HE y N (Tabla 1). En hojas, la Co-I presentó una mayor actividad de GDH-NAD⁺ que el tratamiento Ni tanto en HN como en LN. Asimismo, las plántulas inoculadas con Bs también mostraron una mayor actividad enzimática que el control, aunque este efecto se observó únicamente bajo condiciones de LN. En raíces, sólo se observó que los tratamientos fúngicos Ms y Co-I incrementaron la actividad enzimática sólo a HN siendo diferentes a los Ni.

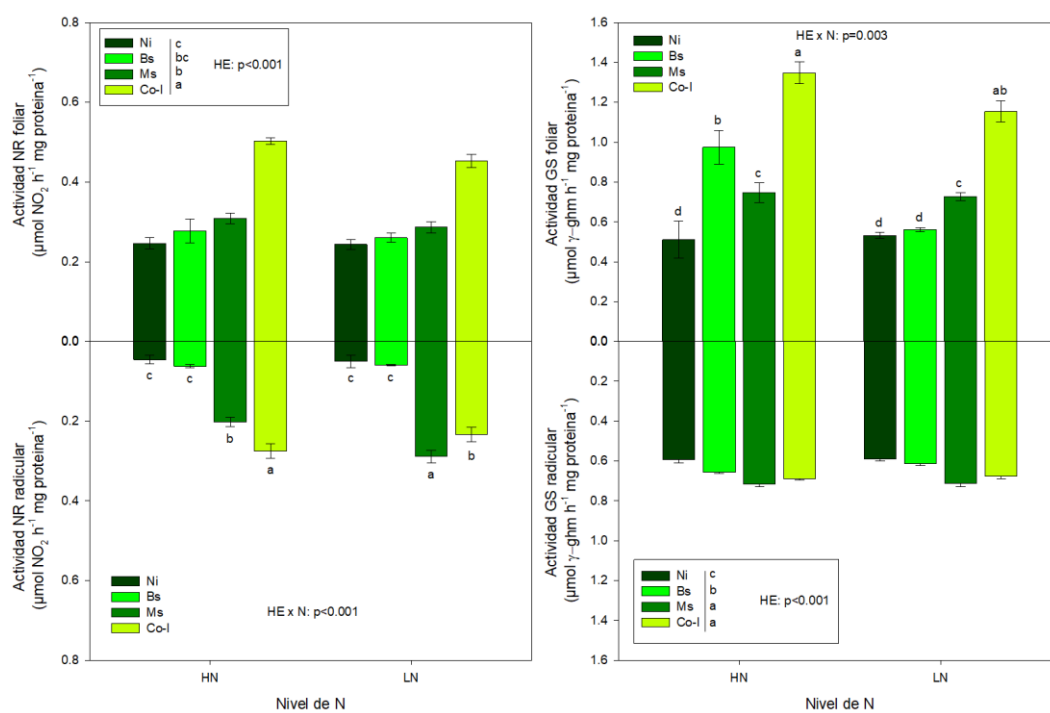


Figura 5. Actividad enzimática relacionada con la asimilación de nitrógeno en hojas y raíces de plántulas inoculadas con HE, en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). (A) actividad de nitrato reductasa, NR en hojas; (B) NR en raíces; (C) actividad de glutamina sintetasa, GS en hojas y (D) GS en raíces. Los tratamientos corresponden a plántulas no inoculadas (Ni), inoculadas con *Beauveria sp.* (Bs), *Metarhizium sp.* (Ms) y Co-inoculación (Co-I). Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar (n = 4). Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey (HSD, p < 0.05). Los valores de p para los efectos de inoculación fúngica (HE), nivel de N y su interacción (HE x N) se indican en cada gráfico.

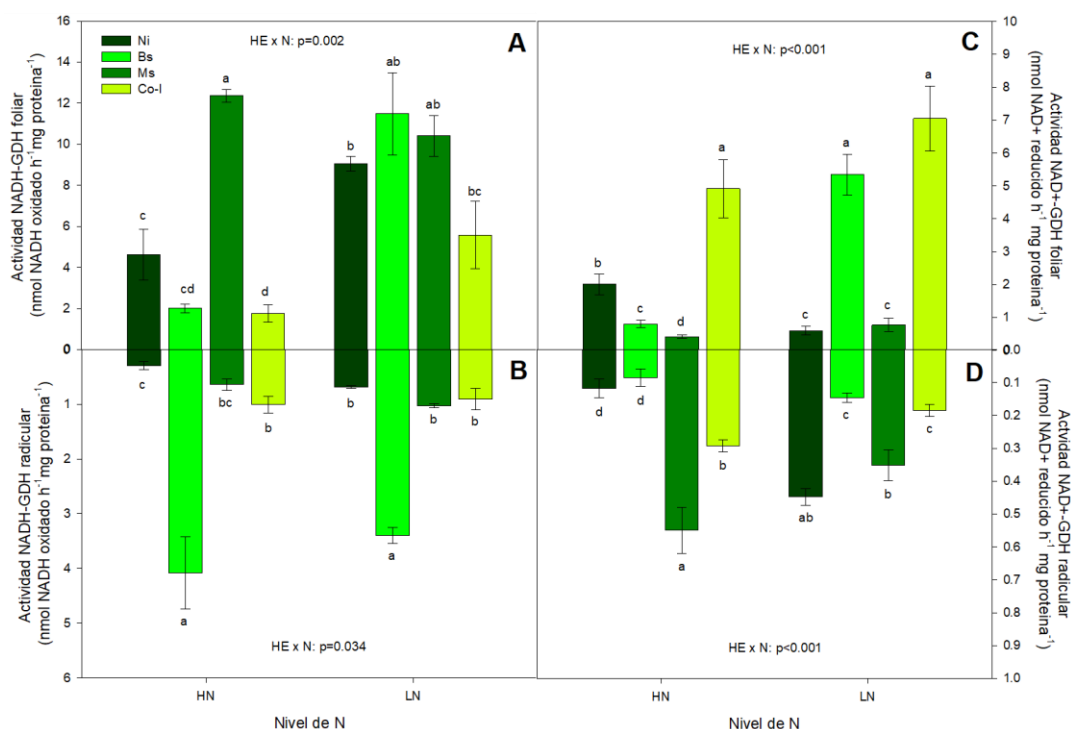


Figura 6. Actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) asociada a la asimilación del N en hojas y raíces de plántulas inoculadas con HE, evaluadas en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). (A) actividad GDH en hojas, NADH oxidado (aminación); (B) GDH en raíces, NADH oxidado; (C) GDH en hojas, NAD⁺ reducido (desaminación) y (D) GDH en raíces, NAD⁺ reducido. Los tratamientos corresponden a plántulas no inoculadas (Ni), inoculadas con *Beauveria sp.* (Bs), *Metarhizium sp.* (Ms) y Co-inoculación (Co-I). Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar (n = 4). Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey (HSD, p < 0.05). Los valores de p para los efectos de inoculación fúngica (HE), nivel de N y su interacción (HE x N) se indican en cada gráfico

3.6 Efecto de los HE y nivel de N en el perfil metabólico del tejido foliar de plántulas de *A. araucana*

El análisis metabólico permitió detectar un total de 334 metabolitos en condiciones de HN (Fig. S2A, ANEXO) y 259 metabolitos en condiciones de LN (Fig. S2B, ANEXO). De estos compuestos 24 metabolitos en HN y 23 metabolitos

en LN pudieron ser anotados mediante asignación de identificadores de las bases de datos PubChem y/o KEGG.

Los mapas de calor revelaron que la respuesta metabolómica foliar a la inoculación con HE dependió del nivel de nitrógeno disponible (Fig. 7A y 7B). En condiciones de HN, los tratamientos inoculados presentaron patrones de acumulación de metabolitos distintos al tratamiento no inoculado (Ni). Los tres tratamientos inoculados compartieron mayores abundancias relativas de metabolitos secundarios respecto a las No inoculadas, como Shikimato, Fenilalanina, Ácido Cumárico, Catequina, Galocatequina y Afzelequina. Sin embargo, también se observaron diferencias entre tratamientos fúngicos. Las plántulas inoculadas con *Beauveria sp.* (Bs) se caracterizaron por una mayor acumulación de ácido quínico, ácido málico y ácido 5-p-cumaroilquínico. Las plántulas inoculadas con *Metarhizium sp.* (Ms) presentaron mayores abundancias relativas de galocatequina, catequina y arginina. Las plántulas Co-I presentaron mayores abundancias de Shikimato, Ácido dodecilbencenosulfónico y Canrenona, pero no muy diferente que Ms y también del metabolito Hipaforina (Lenticina), pero no muy diferente que Ni.

A condiciones de LN, la inoculación con HE también modificó el perfil de metabolitos en hojas (Fig. 7B). En comparación con las plántulas no inoculadas (Ni), los tratamientos inoculados presentaron menores abundancias relativas de timol beta-D-glucósido, ácido quínico, ácido málico, ácido 2-isopropilmálico,

ácido cítrico y triptófano. En contraste, varios compuestos fenólicos y aminoácidos mostraron incrementos relativos dependiendo del tratamiento fúngico. Las plántulas inoculadas con Ms presentaron mayores abundancias relativas de afzelequina, leucósido, gentibiosa y derivados del ácido cumaroilquínico, mientras que las plántulas inoculadas con Bs mostraron mayores niveles de shikimato y derivados del ácido cumaroilquínico. Por su parte, la Co-inoculación presentó mayores abundancias relativas de epigallocatequina, catequina, epicatequina, lenticina, 5- β -glucosilpiridoxina y picróside respecto a los demás tratamientos fúngicos, pero no diferente a Ni.

El análisis de componentes principales (PCA) realizado sobre los metabolitos anotados mostró que los componentes PC1 y PC2 explicaron el 23,4 % y 11,5 % de la variación total en HN (Fig. 7C), y el 17,7 % y 9,9 % en LN (Fig. 7D), respectivamente. En condiciones de HN se observó una tendencia a una mayor separación espacial entre las plántulas no inoculadas (Ni) y los tratamientos inoculados, mientras que en LN los grupos presentaron un mayor grado de solapamiento. El análisis PERMANOVA no detectó diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$), indicando que las variaciones observadas en la ordenación multivariada no fueron suficientes para evidenciar una diferenciación del perfil metabolómico foliar. Este mismo patrón fue observado al realizar el PCA utilizando la totalidad de los metabolitos detectados para cada condición de N (Fig. S2C y Fig. S2D, ANEXO), donde las tendencias de agrupamiento fueron similares estadísticamente para cada tratamiento fúngico.

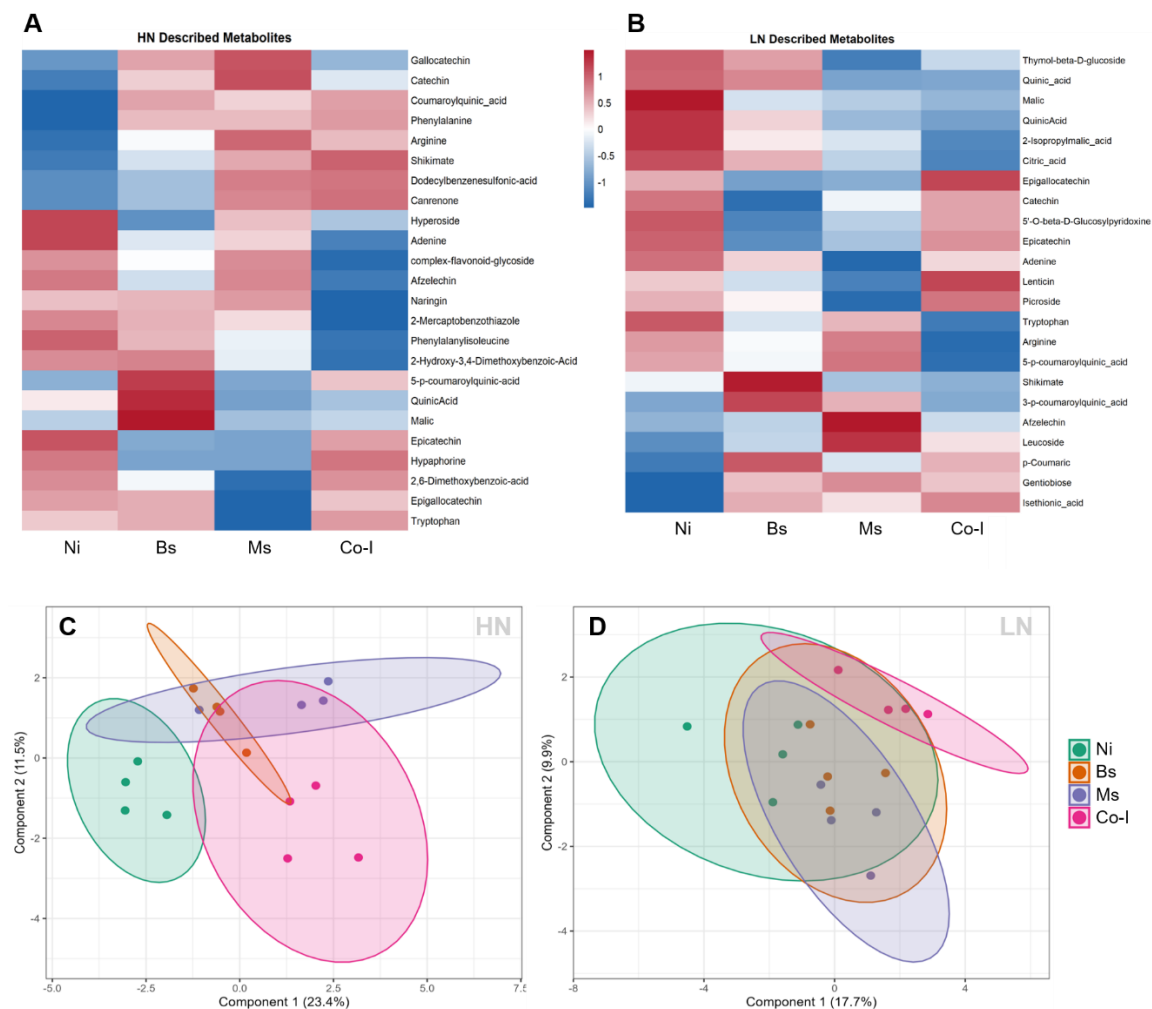


Figura 7. Perfil metabolómico foliar basado en metabolitos anotados de plántulas de *Araucaria araucana* inoculadas con HE en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). Los tratamientos corresponden a plántulas no inoculadas (Ni), inoculadas con *Beauveria sp.* (Bs), *Metarhizium sp.* (Ms) y Co-inoculación (Co-I). Los mapas de calor muestran (A) la abundancia relativa de los 24 metabolitos descritos en HN y; (B) los 23 metabolitos descritos en LN. La barra de escala representa los valores estandarizados de abundancia relativa, desde baja (azul) hasta alta (rojo). Los análisis de componentes principales (PCA) para (C) HN y; (D) para LN, fueron realizados exclusivamente utilizando los metabolitos anotados.

3.7 Efecto del nivel de N y de los HE en el contenido de nitrógeno, carbono y relación estequiométrica C/N y N/C

El contenido de nitrógeno relativo (%N; Fig. 8A) fue significativamente afectada por la interacción entre HE y N (Tabla 1). Sólo en LN se detectaron diferencias significativas, donde las plántulas no inoculadas (Ni) acumularon mayores de N, pero sólo diferente de Ms. De la misma forma el contenido total de nitrógeno foliar (mg N planta⁻¹; Fig. 8C) fue igualmente afectada por la interacción HE x N (Tabla 1), pero sólo se encontraron diferencias por suministro de N acumulándose mayores cantidades en HN igual para todos los HE. Por otro lado el contenido de carbono foliar (%C; Fig. 8B) no presentó diferencias significativas en ningún factor ni interacción (Tabla 1), manteniéndose relativamente constante. El contenido total de carbono foliar (Fig. 8D) fue afectado significativamente sólo por la inoculación con HE y por el nivel de N (Tabla 1). En general, las plántulas a HN acumularon mayores cantidades de C que LN. Y las plántulas inoculadas con Ms tuvieron mayor cantidad de C en sus tejidos y diferente que Ni.

La relación estequiométrica N/C (Fig. 8E) fue afectada por la interacción HE x N (Tabla 1). Las plántulas cultivadas a LN presentaron una disminución de la relación N:C, y los tratamientos fúngicos Bs y Ms exhibieron valores más bajos de N respecto a Ni. La relación C: N foliar (Fig. 8F) fue afectada significativamente por la interacción HE x N (Tabla 1). Consistentemente a LN, se registró un

aumento significativo de la relación C: N en comparación con HN, y las plántulas inoculadas con Bs y Ms presentaron los valores más alto respecto a Ni y Co-I.

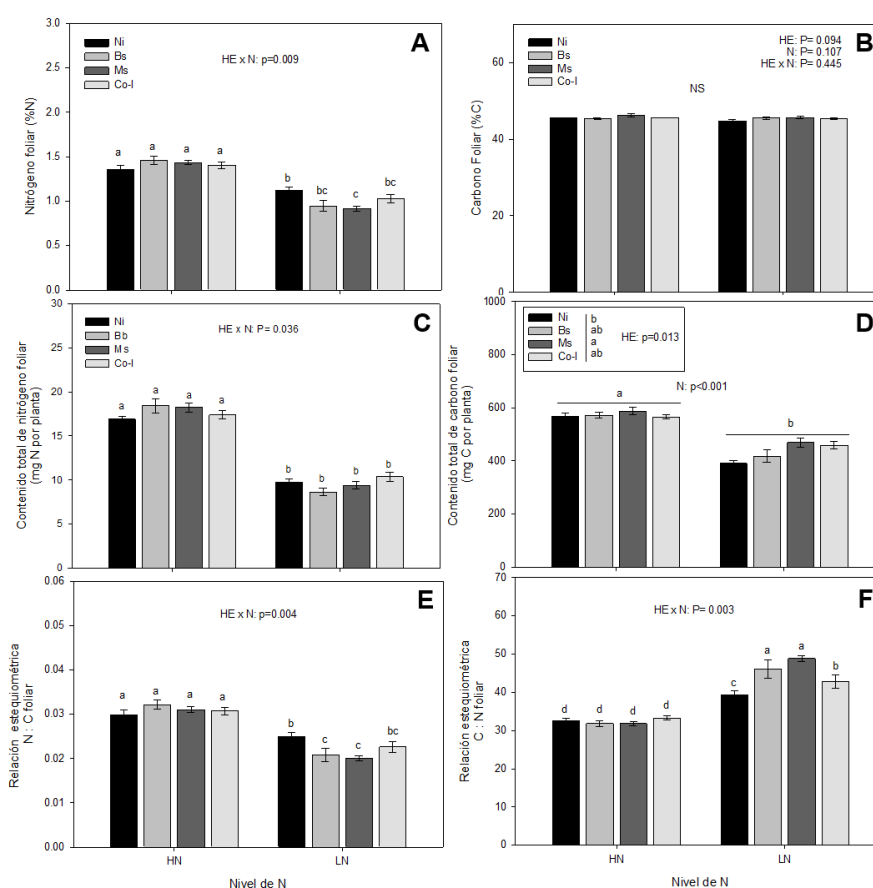


Figura 8. Contenido relativo, total y estequiometría foliar de carbono y nitrógeno en plántulas de *A. araucana*. (A) Contenido relativo foliar de nitrógeno (%N); (B) contenido relativo de carbono (%C); (C) contenido total de nitrógeno foliar (mg N planta⁻¹); (D) contenido total de carbono (mg C planta⁻¹); (E) relación estequiométrica N:C foliar; y (F) relación estequiométrica C:N foliar. Los tratamientos corresponden a plántulas no inoculadas (Ni), inoculadas con *Beauverria* sp. (Bs), *Metarhizium* sp. (Ms) y Co-inoculación (Co-I). Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar ($n = 4$ para todas las variables, excepto la relación C: N (F), donde $n = 3$). Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey (HSD, $p < 0.05$). Los valores de p para los efectos de inoculación fúngica (HE), nivel de N y su interacción (HE x N) se indican en cada gráfico.

3.8 Efecto del nivel de N y de los HE en los isotopos $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ en hoja

La composición isotópica foliar de $\delta^{15}\text{N}$ (Fig. 9A) fue afectada significativamente por la interacción HE x N (Tabla 1). A condiciones de HN, todos los tratamientos presentaron valores positivos, pero sin diferencias significativas. En contraste, a condiciones LN se observaron cambios marcados en la señal isotópica. Las plántulas no inoculadas (Ni), incrementaron significativamente su composición con valores cercanos a 3.49 ‰, mientras que las plántulas inoculadas con Bs, Ms y Co-I presentaron valores negativos entre -2.51 ‰ y -0.95 ‰ siendo diferentes muy diferentes a Ni. Por otro lado, la composición isotópica foliar de $\delta^{13}\text{C}$ (Fig. 9B) sólo el nivel de N mostró un efecto significativo (Tabla 1). En general, a LN se encontró una señal isotópica más negativa que a HN de $\delta^{13}\text{C}$.

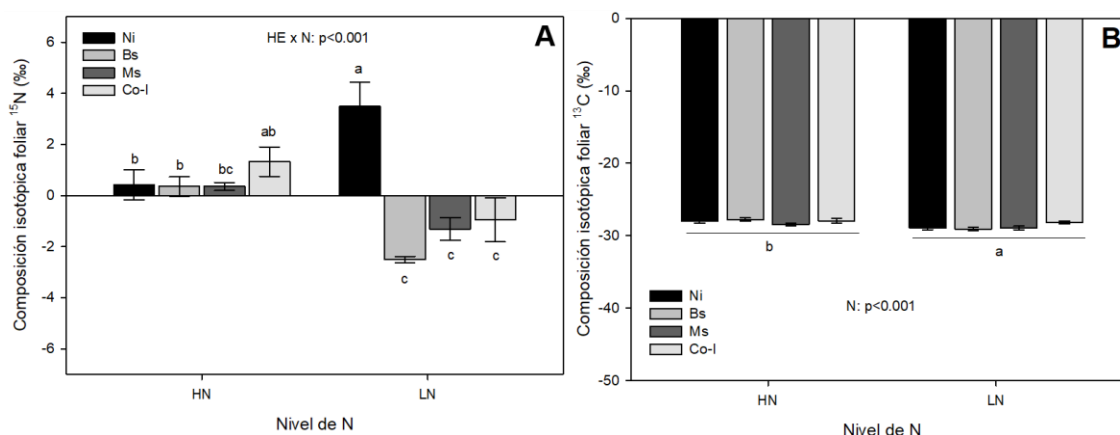


Figura 9. Composición isotópica foliar de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ en plántulas de *Araucaria araucana* inoculadas con HE en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). (A) composición isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ foliar ($n = 3$); (B) composición isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ foliar ($n = 4$). Los tratamientos corresponden a plántulas no inoculadas (Ni), inoculadas con *Beauveria* sp. (Bs), *Metarhizium* sp. (Ms) y Co-inoculación (Co-I). Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey (HSD, $p < 0.05$). Los valores de p para los efectos de inoculación fúngica (HE), nivel de N y su interacción (HE x N) se indican en cada gráfico

3.9 Colonización fúngica en raíces de *Araucaria araucana*

La cuantificación molecular mediante qPCR mostró una colonización exitosa por ambos HE en raíces de *A. araucana* (Fig. 10A y B). La cantidad de ADN genómico de *Beauveria* (Fig. 10A) fue afectada significativamente sólo por la inoculación con HE (Tabla 1). Los tratamientos inoculados únicamente con Bs tuvieron mayor colonización radicular que en los tratamientos Co-I, tanto en HN como en LN. Las plántulas Ni y aquellas inoculadas sólo con Ms, no presentaron amplificación detectable con los primer específicos de *Beauveria sp.* (Fig. S4; ANEXO). Por otro lado, la cuantificación de ADN genómico de *Metarhizium* (Fig. 10B) fue influenciada significativamente por la inoculación con HE y por el nivel de N (Tabla 1). Las plántulas inoculadas únicamente con Ms mostraron una mayor colonización que aquellas Co-I. Asimismo, la colonización fue mayor bajo condiciones de LN que en HN. Además, Ni y Bs no presentaron señal detectable con los primers específicos de *Metarhizium spp.* (Fig. S4; ANEXO).

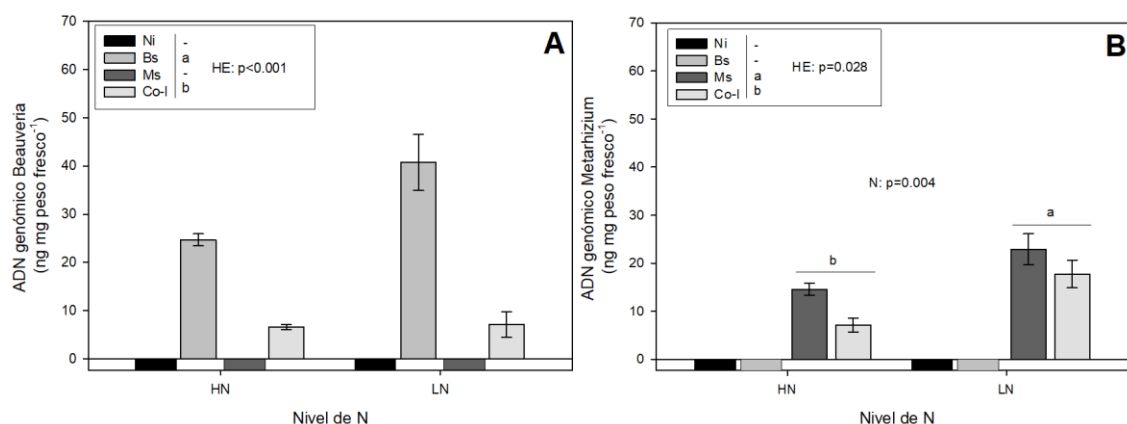


Figura 10. Colonización radicular de *Beauveria sp.* y *Metarhizium sp.* en plántulas de *Araucaria araucana* determinada mediante qPCR. (A) cuantificación de ADN genómico de *Beauveria*; (B) cuantificación de ADN genómico de *Metarhizium*. Los datos representan ng de ADN fúngico por mg de peso fresco de raíces bajo condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). Los tratamientos corresponden a plántulas no inoculadas (Ni), inoculadas con *B. bassiana* (Bs), *Metarhizium sp.* (Ms) y Co-inoculación (Co-I). Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey (HSD, $p < 0.05$). Los valores de p para los efectos de inoculación fúngica (HE), nivel de N y su interacción (HE x N) se indican en cada gráfico.

3.10 Análisis multivariado de los efectos inducidos por los HE en las variables relacionadas con el metabolismo de N y C.

El análisis de componentes principales (PCA) mostraron diferencias entre tratamientos fúngicos tanto bajo condiciones de HN (Fig. 11A y C) como de LN (Fig. 11B y D). Esta separación fue confirmada mediante el análisis de PERMANOVA, detectándose diferencias significativas entre tratamientos en HN ($p = 0.039$) y LN ($p=0.038$).

En condiciones de HN (Fig. 11A), los componentes PC1 y PC2 explicaron el 25.3% y 18.8% de la variación total, respectivamente. Los tratamientos inoculados se separaron algo de Ni, donde Bs y Ms poseen un grado de solapamiento, pero especialmente Co-I fue el tratamiento con más distancia entre los demás HE y Ni. Las variables con mayor contribución en PC1 (Fig. 11 C) destacaron las actividades NR (Hoja y raíz) y GS (hoja), Azúcares solubles totales (Hoja y raíz) y aminoácidos libres totales (Hoja y raíz). En cambio, para PC2, las variables que tuvieron mayor contribución fueron Almidón (Raíz), actividades GDH-NADH (Hoja) y GDH-NAD⁺ (Raíz). En conjunto, estos resultados indican que bajo alta disponibilidad de nitrógeno los HE modificaron simultáneamente

procesos asociados a la asimilación de N y a la acumulación de reservas carbonadas.

En condiciones de LN (Fig. 11B), los componentes PC1 y PC2 explicaron el 28.7% y 18.1% de la variación total, respectivamente. La separación entre tratamientos fúngicos con Ni fue aún más evidente, observándose una diferenciación marcada de las plántulas Co-inoculadas y Ni respecto a los demás tratamientos, mientras que Bs y Ms presentaron un mayor grado de solapamiento. Las variables que más contribuyeron al eje PC1 (Fig. 11D) fueron Biomasa (Radicular), C total (Hoja), Proteínas solubles totales (Hoja), actividad GS (Hoja) y NR (Hoja y raíz). Por su parte, en el eje PC2, las variables que más contribuyeron fueron %N (Hoja) y C:N (Hoja). En conjunto, se sugiere que bajo limitación de nitrógeno la respuesta inducida por los HE estuvo fuertemente asociada con ajustes en la asimilación, reutilización y distribución interna del nitrógeno, acompañados por cambios en el crecimiento y en las relaciones carbono-nitrógeno de las plántulas.

3.11 Resumen estadístico de los efectos de HE y nivel de N sobre variables relacionadas con el metabolismo de N y C en *A. araucana*

Tabla 1. Valores de p ($p < 0.05$) para los efectos de HE, N y su interacción determinados por análisis ANOVA de dos vías sobre atributos fisiológicos y bioquímicos en *A. araucana* inoculadas con HE y dos niveles de N.

Variables	p valor		
	HE	N	HE x N
Biomasa aérea	0.057	<0.001	0.077
Biomasa radicular	<0.001	<0.001	0.007
Biomasa total	<0.001	<0.001	0.002
Azúcares solubles totales foliar (mg por planta)	0.098	<0.001	0.208
Azúcares solubles totales radicular (mg por planta)	0.005	0.002	0.752
Almidón foliar (mg por planta)	0.005	<0.001	0.003
Almidón radicular (mg por planta)	0.013	<0.001	<0.001
Carbohidratos no estructurales foliar (mg por planta)	0.011	<0.001	0.038
Carbohidratos no estructurales radicular (mg por planta)	0.008	<0.001	<0.001
Aminoácidos libres totales foliar (mg g peso seco ⁻¹)	0.212	<0.001	0.002
Aminoácidos libres totales radicular (mg g peso seco ⁻¹)	<0.001	0.331	<0.001
Proteínas solubles totales foliar (mg g peso seco ⁻¹)	<0.001	<0.001	<0.001
Proteínas solubles totales radicular (mg g peso seco ⁻¹)	<0.001	0.22	0.064
Clorofila a (mg g peso seco ⁻¹)	0.573	0.104	0.072
Clorofila b (mg g peso seco ⁻¹)	0.246	0.027	0.028
Clorofila total (mg g peso seco ⁻¹)	0.46	0.064	0.05
Carotenoides (mg g peso seco ⁻¹)	0.753	0.098	0.032
Nitrato reductasa (NR) foliar ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$)	<0.001	0.057	0.543
Nitrato reductasa (NR) radicular ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$)	<0.001	0.225	<0.001
Glutamina sintetasa (GS) foliar ($\mu\text{mol } \gamma\text{-ghm h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$)	<0.001	<0.001	0.003
Glutamina sintetasa (GS) radicular ($\mu\text{mol } \gamma\text{-ghm h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$)	<0.001	0.093	0.313
Glutamato deshidrogenasa (GDH-NADH) foliar ($\text{nmol NADH oxidado h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$)	<0.001	<0.001	0.002
Glutamato deshidrogenasa (GDH-NADH) radicular ($\text{nmol NADH oxidado h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$)	<0.001	0.225	0.034
Glutamato deshidrogenasa (GDH-NAD ⁺) foliar ($\text{nmol NAD}^+ \text{reducido h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$)	<0.001	0.004	<0.001
Glutamato deshidrogenasa (GDH-NAD ⁺) radicular ($\text{nmol NAD}^+ \text{reducido h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$)	<0.001	0.08	<0.001
%N foliar	0.547	<0.001	0.009
%C foliar	0.094	0.107	0.445
Contenido de N total foliar (mg por planta)	0.685	<0.001	0.036
Contenido de C total foliar (mg por planta)	0.013	<0.001	0.071
Relación estequiométrica N : C	0.255	<0.001	0.004
Relación estequiométrica C : N	0.021	<0.001	0.003
Composición isotópica $\delta^{15}\text{N}$ foliar (‰)	<0.001	0.037*	<0.001
Composición isotópica $\delta^{13}\text{C}$ foliar (‰)	0.094	<0.001	0.151
ADN genómico Beauveria (ng mg peso fresco ⁻¹)	<0.001	0.443	0.626
ADN genómico Metarhizium (ng mg peso fresco ⁻¹)	0.028	0.004	0.637

4 DISCUSIÓN

Las interacciones entre *Beauveria*, *Metarhizium* y plantas han sido estudiadas principalmente en el contexto de la transferencia de nitrógeno desde insectos parasitados hacia sus hospedadores vegetales (Behie et al., 2012). Sin embargo, son limitados los estudios sobre mecanismos mediante los HE pueden modular el metabolismo vegetal cuando las plantas crecen utilizando fuentes modificadas de nitrógeno inorgánico, como NH_4/NO_3 .

Se ha descrito que los beneficios en interacciones simbióticas fúngicas dependen fuertemente del estado nutricional de la planta hospedadora (Hoeksema et al., 2010) y, que las Co-inoculaciones con diferentes cepas podrían generar respuestas sinérgicas superiores a las obtenidas por cada hongo de manera individual (Khaekhum et al., 2021; González-Teuber et al., 2022).

Este estudio arroja las primeras luces sobre el efecto de los HE en la eficiencia metabólica de *A. araucana*, creciendo bajo distintas condiciones de N.

4.1 El incremento de biomasa en condiciones de LN no estuvo asociado a una mayor acumulación de N o C foliar

La inoculación con HE incrementó significativamente la biomasa radicular, siendo este efecto más evidente a baja disponibilidad de N (Fig. 1). Este patrón coincide con observaciones realizadas en otras asociaciones endofíticas, donde los beneficios sobre el crecimiento suelen intensificarse cuando los recursos son

limitantes (Di Martino et al., 2022; Alquichire-Rojas et al., 2024). Resultó particularmente interesante que el incremento de biomasa no estuvo acompañado por aumentos significativos en el porcentaje foliar de N y C. Estas interpretaciones coincidieron con lo reportado por Alquichire et al. (2024), quienes observaron que la colonización por HE no necesariamente incrementa la concentración de nitrógeno en tejidos aéreos. Del mismo modo, la acumulación de carbohidratos no estructurales (CNE) y almidón aumentaron en raíces de plántulas inoculadas, especialmente con *Metarhizium* a condiciones LN (Fig 2). Este resultado se relaciona con la promoción de crecimiento en las raíces (Fig 1B). Este aumento podría indicar que el carbono disponible fue destinado preferentemente a sostener el crecimiento vegetal y la actividad metabólica. Además se ha propuesto que los hongos endófitos (HE) pueden actuar como sumideros de C, utilizando parte de los fotosintatos transferidos por la planta hospedadora para sostener su propio metabolismo (Ahmad et al., 2026). Asimismo, una fracción de estos exudados carbonatados podría destinarse a favorecer otras interacciones microbianas en la rizosfera (Sasse et al., 2018).

Aunque los resultados observados en acumulación de carbono y nitrógeno en las hojas no explican el incremento del crecimiento radicular, es posible que los HE favorezcan un uso más eficiente del nitrógeno, especialmente bajo condiciones limitantes. Además de mejorar la adquisición y el metabolismo de este nutriente, diversos estudios han demostrado que los HE pueden producir fitohormonas, como el ácido indol-3-acético (AIA) y las giberelinas, o bien modular sus niveles

en la planta hospedadora (Taheri, 2025). En este contexto, Liao et al. (2017) demostraron que *Metarhizium robertsii* es capaz de producir AIA y promover el crecimiento radicular de sus plantas hospedadoras, lo que sugiere que este mecanismo también podría contribuir al efecto promotor del crecimiento observado en *A. araucana*. Sin embargo, en este estudio no se evaluó la producción de fitohormonas ni las rutas de señalización hormonal, por lo que su participación permanece como una hipótesis que deberá ser abordada en futuras investigaciones

4.2 Los HE aumentaron la eficiencia de utilización de nitrógeno más que su acumulación en tejidos.

Aunque la inoculación con HE no incrementó el %N foliar a condiciones limitantes (LN), sí produjo cambios significativos en prácticamente todos los indicadores bioquímicos asociados al metabolismo de N.

En específico, el nivel de N suministrado por sí solo tuvo escasa influencia sobre las proteínas solubles totales (PST), aminoácidos libres (AAL) y actividades enzimáticas (NR, GS y GDH) en el tejido radicular. Una posible explicación para este resultado es que las reservas internas de carbono y nitrógeno acumulado durante las etapas tempranas de desarrollo de las plántulas de *A. araucana* hayan amortiguado parcialmente el efecto del N externo sobre el metabolismo radicular, fenómeno previamente descrito en especies leñosas de crecimiento lento (Millard y Grelet, 2010).

Sin embargo, los HE en interacción con la disponibilidad de nitrógeno, mejoran la actividad de las enzimas nitrato reductasa (NR) a nivel radicular, glutamina sintetasa (GS) a nivel aéreo y glutamato deshidrogenasa (GDH) aéreo y radicular. Además de modificar la acumulación de aminoácidos libres (AAL) en hojas y raíces, así como de alterar la relación C/N.

Estos resultados sugieren que los HE mejoran la utilización interna del nitrógeno en las plántulas de *A. araucana*, favoreciendo una mayor capacidad para reducir nitrato, incorporar amonio a aminoácidos y utilizar estos compuestos en la síntesis de proteínas. Sin embargo, la concentración de proteínas solubles totales (PST) no fue afectada por la interacción entre los HE y el nivel de nitrógeno. En cambio, las plántulas inoculadas con *Metarhizium* presentaron mayores concentraciones de PST independientemente de la disponibilidad de nitrógeno, lo que sugiere que este hongo podría estimular la síntesis o acumulación de proteínas independientemente de la disponibilidad de este nutriente.

Aunque los mecanismos moleculares específicos de la interacción entre HE y *A. araucana* aún son desconocidos, estudios realizados con *Brassica pekinensis* (Col china) han demostrado que ciertos HE, como *Piriformospora indica* pueden inducir directamente la expresión de genes asociados a la asimilación de N, incluyendo NR (Sherameti et al., 2005). Dado que *Metarhizium* también pueden colonizar tejidos aéreos (Behie et al., 2015), el incremento de las actividades enzimáticas relacionadas al metabolismo del N puede ocurrir no solo en raíces

sino también en hojas. Esto es relevante puesto es donde se concentra una gran parte de la asimilación y re-asimilación de este recurso (Masclaux-Daubresse et al., 2010; Lea y Mifflin 2010).

La asimilación de nitrógeno depende estrechamente de la disponibilidad de esqueletos carbonados (Forde y Lea, 2007), por lo que estos cambios probablemente estuvieron acompañados por ajustes en el metabolismo central del carbono, particularmente en aquellas rutas asociadas a la actividad de GDH. La ausencia de cambios importantes en los pigmentos fotosintéticos sugiere que esta reorganización metabólica ocurrió sin comprometer la capacidad fotosintética de las plántulas, favoreciendo la utilización del carbono disponible para sostener la asimilación de nitrógeno.

4.3 La Co-inoculación incrementó la actividad GDH desaminante y redujo metabolitos claves del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).

La actividad de la glutamato deshidrogenasa (GDH) mostró respuestas diferenciales dependiendo de la cepa inoculada y de la disponibilidad de nitrógeno. Mientras Bs promovió principalmente la actividad aminante (GDH-NADH) en raíces y Ms indujo esta misma actividad en hojas, ambos tratamientos mostraron escasos cambios en la actividad desaminante. Este patrón sugiere una dirección neta del metabolismo hacia la síntesis de glutamato y la incorporación de nitrógeno en compuestos orgánicos. Por otro lado, Co-I favoreció principalmente la actividad desaminante de GDH (GDH-NAD⁺) en el tejido aéreo

y en ambas condiciones de N. Esta reacción genera 2-oxoglutarato, un intermediario central que conecta el metabolismo del nitrógeno con el TCA. Por ello, el aumento de GDH desaminante podría reflejar una mayor demanda de esqueletos carbonados y energía para sostener simultáneamente el crecimiento vegetal y los requerimientos metabólicos asociados a la colonización fúngica.

Esta interpretación es consistente con los resultados de metabolómica obtenidos de plántulas cultivadas a LN, donde las inoculadas con Co-I presentaron menores concentraciones de ácido cítrico, ácido málico y ácido 2-isopropilmálico (Fig 7B). Estos compuestos participan en el metabolismo respiratorio y en la provisión de esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos (Sweetlove et al., 2010). En conjunto, los resultados sugieren que Co-I promovió una mayor movilización de intermediarios del TCA, posiblemente asociada a un incremento de la respiración celular y a una utilización más intensa de carbono para sostener el metabolismo bajo condiciones limitantes de nitrógeno (Nunes-Nesi et al., 2010). No obstante, aunque este patrón es consistente con una mayor actividad respiratoria, las tasas de respiración no fueron medidas directamente en este estudio.

4.4 Los HE modularon rutas asociadas al metabolismo del carbono, aminoácidos y compuestos fenólicos en función de la disponibilidad de nitrógeno.

Los análisis metabolómicos revelaron que los efectos de los HE variaron según la disponibilidad de nitrógeno y la cepa inoculada (Fig. 7). Aunque los análisis

multivariados mostraron una separación parcial entre tratamientos, particularmente en condiciones de HN (Fig. 7C), las diferencias observadas estuvieron asociadas principalmente a cambios en la abundancia relativa de metabolitos específicos más que a una reorganización completa del Metaboloma. En condiciones de HN, la inoculación promovió principalmente cambios asociados a la vía del shikimato y al metabolismo fenilpropanoide. Un patrón común a todos los tratamientos fúngicos fue la mayor acumulación de fenilalanina (Phe), shikimato, derivados del cumaroilquínico y derivados de catequina respecto de las plántulas no inoculadas (Ni). Phe el principal precursor de la ruta fenilpropanoide, actuando como sustrato de la fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima que inicia la biosíntesis de una amplia diversidad de compuestos fenólicos (Vogt, 2010). Tanto la catequina y sus derivados corresponden a flavanoles derivados de la ruta fenilpropanoide y han sido ampliamente asociados a funciones antioxidantes y mecanismos de protección frente a estrés biótico y abiótico (Treutter, 2008; Agati et al., 2012). Resultados similares han sido reportados en otras asociaciones con HE, donde la inoculación induce la acumulación de compuestos fenólicos y metabolitos asociados a respuestas defensivas de la planta (Shaalan et al., 2022). Adicionalmente, mayores concentraciones de shikimato y derivados del ácido cumaroilquínico, demuestran que los HE están ejerciendo un efecto destinado al metabolismo secundario (Fraser y Chapple, 2011; Maeda y Dudareva, 2012).

En específico, las plántulas inoculadas con *Beauveria* acumularon ácido quínico y ácido málico. Mientras que el ácido quínico se encuentran estrechamente vinculados a la vía del shikimato, en etapas tempranas de la biosíntesis fenilpropanoide (Vogt, 2010). El ácido málico constituye un importante intermediario del metabolismo central del carbono, participando en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y contribuyendo al suministro de carbono necesario para la síntesis de aminoácidos y otros compuestos orgánicos (Nunes-Nesi et al., 2010). Por otro lado, las plántulas inoculadas con *Metarhizium* (Ms) presentaron una mayor acumulación de arginina, un patrón similar al observado en la co-inoculación (Co-I), donde el perfil metabólico también se caracterizó por mayores concentraciones de arginina y shikimato. Mientras que el shikimato constituye un intermediario clave en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y compuestos fenólicos (Maeda y Dudareva, 2012), la arginina representa una de las principales formas de almacenamiento de nitrógeno orgánico en las plantas y es esencial para la elongación radicular traducido a una mayor biomasa (Winter et al., 2015; Ávila et al., 2025). La acumulación simultánea de ambos metabolitos, junto con el aumento de fenilalanina en los tratamientos inoculados, sugiere que las plántulas dispusieron de una mayor disponibilidad de nitrógeno para sostener tanto el crecimiento y la biosíntesis de compuestos fenólicos derivados de la vía de los fenilpropanoides.

En condiciones de bajo nitrógeno (LN) se observaron cambios consistentes en metabolitos vinculados al metabolismo central del carbono. Independientemente

de la cepa inoculada, las plántulas presentaron menores concentraciones de ácido málico y ácido 2-isopropilmálico respecto a los controles. Mientras que el ácido málico participa directamente en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), el ácido 2-isopropilmálico constituye un intermediario de la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada, particularmente leucina (Leu) (Nunes-Nesi et al., 2010). La disminución observada de estos metabolitos sugiere una mayor movilización de intermediarios del metabolismo central del carbono bajo condiciones de limitación de nitrógeno (Forde y Lea, 2007). Consistentemente, las plántulas inoculadas presentaron mayores concentraciones de aminoácidos libres totales (AST) y modificaciones importantes en la actividad de enzimas asociadas a la asimilación de nitrógeno. La concordancia entre ambos resultados sugiere una estrecha integración entre los metabolismos del carbono y del nitrógeno, donde el carbono disponible estaría siendo redirigido hacia la síntesis de compuestos nitrogenados (Binder, 2010). En concordancia, los tres tratamientos inoculados presentaron además mayores concentraciones de gentibiosa y ácido isetiónico respecto a los controles. Aunque la función fisiológica de estos compuestos en *A. araucana* aún no es clara, su respuesta consistente en los tres tratamientos inoculados sugiere que forman parte de una reorganización metabólica común inducida por los HE bajo condiciones de limitación de nitrógeno. Según tratamiento fúngico, las plántulas inoculadas con *Beauveria* y Co-I acumularon preferentemente shikimato, derivados del ácido cumaroilquínico y derivados de catequina. Dado que ambos metabolitos

corresponden a intermediarios tempranos de la vía del shikimato y de la biosíntesis fenilpropanoide (Vogt, 2010; Maeda y Dudareva, 2012; Li et al., 2022), estos resultados que coinciden con HN, sugieren que *Beauveria* y Co-I mantuvieron una activa la provisión de precursores para la síntesis de compuestos fenólicos incluso bajo condiciones de limitación de nitrógeno. En cambio, las plántulas inoculadas con *Metarhizium* (Ms) se diferenciaron principalmente por una mayor acumulación de afzelequina, un flavanol derivado de la ruta fenilpropanoide con reconocida actividad antioxidante (Luo et al., 2022). Este resultado es consistente con lo observado bajo condiciones de HN, donde Ms promovió la acumulación de otros flavanoles, como catequina y galocatequina, lo que sugiere una activación sostenida del metabolismo fenólico asociado a la protección celular. Además, las plántulas inoculadas con Ms presentaron mayores concentraciones de triptófano y arginina, dos metabolitos primarios estrechamente relacionados con el crecimiento radicular observado. En particular, el triptófano es el principal precursor de la biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA), y diversos microorganismos pueden utilizarlo para producir esta fitohormona, promoviendo el crecimiento y desarrollo de las plantas (Trivedi et al., 2020).

Aunque la mayoría de las respuestas metabolómicas dependieron tanto de la disponibilidad de nitrógeno como de la cepa inoculada, algunos metabolitos mostraron un comportamiento consistente en ambas condiciones nutricionales. Uno de ellos fue la hipaforina/lenticina, cuya abundancia relativa disminuyó en

las plántulas inoculadas con *Beauveria* (Bs) y *Metarhizium* (Ms), tanto en HN como en LN. La hipaforina es un derivado del triptófano descrito en simbiosis ectomicorrícicas, donde participa en procesos de señalización entre las raíces y los hongos colonizadores (Ditengou et al., 2000; Jambois et al., 2005). En este contexto, la disminución de este metabolito en las plántulas inoculadas con Bs y Ms podría indicar que los HE modifican rutas metabólicas relacionadas con la comunicación entre la planta y los microorganismos. En contraste, este patrón no se observó en las plántulas Co-inoculadas (Co-I), cuyos niveles de hipaforina/lenticina fueron similares a las plántulas No inoculadas. Esta diferencia sugiere que la presencia simultánea de ambas cepas generó una respuesta metabólica distinta a la observada en las inoculaciones individuales, posiblemente asociada con la menor colonización detectada en este tratamiento (Fig. 10). En conjunto, estos resultados evidencian que los HE no inducen una respuesta metabólica uniforme en *A. araucana*, sino que modulan selectivamente distintas rutas bioquímicas dependiendo tanto de la disponibilidad de nitrógeno como de la cepa inoculada. Estos ajustes sugieren que los HE contribuyen a la plasticidad metabólica de las plántulas, favoreciendo distintas estrategias de utilización y asignación de recursos según el contexto nutricional.

4.5 La respuesta diferencial del $\delta^{15}\text{N}$ en relación con la colonización fúngica

Mientras que $\delta^{13}\text{C}$ se mantuvo estable entre tratamientos, el $\delta^{15}\text{N}$ mostró variaciones importantes asociadas tanto a la disponibilidad de nitrógeno como a la inoculación fúngica. Las plántulas Ni cultivadas en condiciones LN presentaron

un enriquecimiento en $\delta^{15}\text{N}$ respecto de aquellas cultivadas en HN, lo que podría reflejar cambios en las fuentes de nitrógeno utilizadas o una menor discriminación isotópica durante su adquisición y asimilación (Evans, 2001, Pons et al., 2025).

En contraste, bajo condiciones de LN las plántulas inoculadas presentaron una marcada disminución de $\delta^{15}\text{N}$. Este patrón es consistente con observaciones realizadas en asociaciones micorrícicas, donde los hongos retienen preferentemente el nitrógeno enriquecido en $\delta^{15}\text{N}$ dentro de su biomasa fúngica asociada a las raíces, mientras transfieren a la planta compuestos relativamente empobrecidos en $\delta^{15}\text{N}$, generando una señal isotópica más negativa en los tejidos vegetales (Högberg et al., 2010; Hobbie y Högberg, 2012). De hecho, Högberg et al. (2010) observaron que bosques sometidos a limitación de nitrógeno presentaban menores valores foliares de $\delta^{15}\text{N}$, lo que fue atribuido a una mayor retención de ^{15}N por parte de los hongos ectomicorrícicos. Nuestros resultados sugieren que los HE podrían estar ejerciendo un efecto funcional similar, actuando como reservorios temporales de nitrógeno y modificando el fraccionamiento isotópico durante su transferencia hacia la planta hospedadora.

Resulta particularmente interesante que, pese a las diferencias observadas en la actividad de enzimas asociadas al metabolismo nitrogenado, especialmente NR y GDH, las distintas inoculaciones produjeran valores similares de $\delta^{15}\text{N}$ en la parte aérea. Asimismo, las plántulas Co-I mostraron una respuesta isotópica comparable a la observada en Bs y Ms. Esto sugiere que las diferencias en las

rutas de asimilación de nitrógeno inducidas por cada cepa no se tradujeron de cambios detectables en la señal isotópica foliar. En cambio, la menor capacidad de colonización observada cuando ambas cepas estuvieron presentes simultáneamente (Fig. 10) podría explicar la ausencia de efectos sinérgicos en varios de los parámetros fisiológicos evaluados en condiciones de LN. En conjunto, estos resultados sugieren que la magnitud de la colonización fúngica podría influir sobre el fraccionamiento isotópico del nitrógeno y su destino dentro de la planta. Sin embargo, serían necesarios estudios que integren análisis isotópicos a nivel radicular para determinar si las diferencias observadas en la actividad de NR y GDH se traducen en destinos metabólicos distintos para el nitrógeno dentro del sistema planta-hongo.

4.6 Colonización diferencial entre *Beauveria* y *Metarhizium* según la disponibilidad de nitrógeno

Aunque *Beauveria* no presentó diferencias la colonización bajo ambas condiciones de nitrógeno, sus efectos fisiológicos y metabólicos no fueron completamente independientes del estado nutricional de la planta. A nivel radicular, las variables bioquímicas evaluadas, que incluyen aminoácidos, la actividad NR y GS, y los carbohidratos no estructurales, mostraron respuestas relativamente estables entre HN y LN. En contraste, las respuestas observadas en tejido aéreo fueron más sensibles a la disponibilidad de nitrógeno, particularmente aquellas relacionadas con la coordinación entre los metabolismos del carbono y del nitrógeno. A nivel metabólico, Bs indujo de

manera consistente la acumulación de intermediarios tempranos de la ruta fenilpropanoide, tanto en HN como en LN, sugiriendo una modulación relativamente estable según disponibilidad de N.

Por otro lado, *Metarhizium* mostró una respuesta más dependiente de la disponibilidad de nitrógeno. A diferencia de Bs, la colonización de raíces por Ms fue significativamente mayor bajo condiciones de limitación de nitrógeno (LN) que en HN (Fig. 10A), sugiriendo que el establecimiento del hongo se vio favorecido cuando la disponibilidad de este nutriente fue menor. Aunque ciertas variables radiculares presentaron comportamientos similares entre HN y LN, como proteínas solubles totales, actividad GS y GDH-NADH. Ciertas respuestas metabólicas inducidas por Ms difirieron entre ambas condiciones. Mientras que en HN predominó la acumulación de metabolitos secundarios, asociados a la ruta de los fenilpropanoides, en LN destacó el aumento de afzelequina y otros metabolitos potencialmente asociados al crecimiento y al metabolismo nitrogenado, como triptófano y arginina. La coincidencia entre una mayor colonización y una respuesta metabólica más marcada bajo LN sugiere que el grado de establecimiento de *Metarhizium* podría influir sobre la magnitud de los cambios fisiológicos y metabólicos inducidos en *A. araucana*.

5 CONCLUSION

Los hongos endófitos (HE) promovieron el crecimiento de las plántulas de *Araucaria araucana* bajo condiciones de limitación de nitrógeno (LN). Sin embargo, las respuestas fisiológicas y metabólicas dependieron de la cepa inoculada, evidenciando estrategias diferentes para favorecer el desempeño de la planta.

Beauveria sp. promovió principalmente respuestas bajo condiciones de alta disponibilidad de nitrógeno (HN), favoreciendo la acumulación de aminoácidos libres, almidón y carbohidratos no estructurales, junto con una mayor actividad de glutamina sintetasa en ambos tejidos. A nivel metabólico, esta cepa se asoció principalmente con la acumulación de metabolitos secundarios derivados de la ruta del shikimato y de los fenilpropanoides, sugiriendo una mayor inversión en procesos de almacenamiento y defensa.

En contraste, *Metarhizium sp.* presentó una respuesta más marcada bajo condiciones de limitación de nitrógeno, promoviendo el crecimiento radicular, el incremento de aminoácidos y proteínas, y una mayor actividad de las enzimas nitrato reductasa (NR) y glutamina sintetasa (GS) para ambos tejidos. Paralelamente, el perfil metabólico indicó una reorganización del metabolismo hacia procesos primarios relacionados con el crecimiento, lo que, en conjunto con la mayor colonización observada bajo LN, sugiere una utilización más eficiente de los recursos disponibles.

La Co-inoculación mostró una respuesta intermedia, compartiendo características con *Beauveria* en la acumulación de aminoácidos libres, almidón y carbohidratos no estructurales, además de metabolitos secundarios a alto nitrógeno (HN) y con *Metarhizium* en la activación de enzimas del metabolismo del nitrógeno a bajas condiciones N (LN).

En conjunto, estos resultados respaldan la hipótesis planteada, demostrando que, bajo condiciones de limitación de nitrógeno, los hongos endófitos (HE) favorecen la asimilación y utilización del nitrógeno en plántulas de *Araucaria araucana*. No obstante, *Metarhizium* presentó la respuesta más consistente entre el crecimiento, la actividad enzimática, el metabolismo del carbono y el perfil metabolómico, posicionándose como la cepa con mayor capacidad para ejercer un efecto en asimilación y utilización del nitrógeno en plantas.

Estos hallazgos contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos mediante los cuales *A. araucana* responde a distintas condiciones de disponibilidad de nitrógeno y a la colonización por microorganismos endófitos. Este trabajo respalda la necesidad de profundizar en el efecto de diferentes comunidades fúngicas en la fisiología de esta especie, así como en la evaluación de aislados nativos con potencial promotor del crecimiento, con miras a su futura incorporación en estrategias de conservación.

6 BIBLIOGRAFÍA

Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & et al. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76. doi:10.1016/j.plantsci.2012.07.014

Agbessenou, A., Akutse, K., Yusuf, A., Ekesi, S., Subramanian, S., & et al. (2020). Endophytic fungi protect tomato and nightshade plants against *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) through a hidden friendship and cryptic battle. *Scientific Reports*, 10, 22195. doi:10.1038/s41598-020-78898-8

Aguilera-Betti, I., Muñoz, A., Stahle, D., Figueroa, G., Duarte, F., & et al. (2017). The First Millennium-Age *Araucaria Araucana* in Patagonia. *Tree-Ring Research*, 73, 53-56. doi:10.3959/1536-1098-73.1.53

Ahmad, A., Ahmed, M., Akhtar, A., & et al. (2026). New Insight into Endophytic Fungi–Plant Symbioses Under Climate Change: Molecular Crosstalk, Nutrient Exchange, and Ecosystem Resilience. *Applied Microbiology*, 6(3), 47. doi:10.3390/applmicrobiol6030047

Alquichire-Rojas, S., Escobar, E., Bascuñan-Godoy, L., & González-Teuber, M. (2024). Root symbiotic fungi improve nitrogen transfer and morpho-physiological performance in *Chenopodium quinoa*. *Frontiers in Plant Science*, 15. doi:10.3389/fpls.2024.1386234

Ávila, C., Llebrés, M., Cánovas, F., & Castro-Rodríguez, V. (2025). Arginine, a key amino acid for nitrogen nutrition and metabolism of forest trees. *Journal of Experimental Botany*, 76(18), 5238-5251. doi:10.1093/jxb/erf260

Balocchi, F., Barnes, I., Wingfield, M., Ahumada, R., & Visagie, C. (2023). New *Resinogalea* species from *Araucaria araucana* resin in Chile and reclassification of the genus in the *Cryptocaliciomycetidae*. *IMA Fungus*, 14, 16. doi:10.1186/s43008-023-00122-9

Balochi, F., Marinconwitz, S., Wingfield, M., Ahumada, R., & Barnes, I. (2022). Three new species of *Pewenomyces* (Coryneliaceae) from *Araucaria araucana* in Chile. *Mycological Progress*, 21, 92. doi:10.1007/s11557-022-01840-x

Barnett, V., & Lewis, T. (1994). *Outliers in Statistical Data*. 3rd Edition, John Wiley & Sons, Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London.

Barrera, E., & Meza, I. (1991). Características de la epidermis foliar de las Gimnospermas chilena. *Boletín Museo Nacional De Historia Natural*, 42, 25-37. doi:10.54830/bmnhn.v42.1991.408

- Bascuñan-Godoy, L., Sanhueza, C., Pinto, K., & et al. (2018). Nitrogen physiology of contrasting genotypes of *Chenopodium quinoa* Willd. (Amaranthaceae). *Scientific Reports*, 8, 17524. doi:10.1038/s41598-018-34656-5
- Behie, S., & Bidochka, M. (2014). Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 1553-1560. doi:10.1128/AEM.03338-13
- Behie, S., Jones, S., & Bidochka, M. (2015). Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology*, 13, 112-119. doi:10.1016/j.funeco.2014.08.001
- Behie, S., Zelisko, P., & Bidochka, M. (2012). Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science*, 336, 1576-1577. doi:10.1126/science.1222289
- Berendse, F. (1994). Litter decomposability: a neglected component of plant fitness. *Journal of Ecology*, 82, 187-190. doi:10.2307/2261398
- Binder, S. (2010). Branched-Chain Amino Acid Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*, (8). doi:10.1199/tab.0137
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (2), 248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brodribb, T., Holbrook, M., Zwieniecki, M., & Palma, B. (2004). Leaf hydraulic capacity in ferns, conifers and angiosperms: impacts on photosynthetic maxima. *New Phytologist*, 165, 839-846. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01259.x
- Bucher, M., & Kossmann, J. (2007). Molecular Physiology of the Mineral Nutrition of the Potato. *Potato Biology and Biotechnology*, Chapter 15, 311-329. doi:10.1016/B978-044451018-1/50057-9
- Chávez, D., Rivas, G., Machuca, Á., Santos, C., & al, e. (2023). Contribution of Arbuscular Mycorrhizal and Endophytic Fungi to Drought Tolerance in *Araucaria araucana* Seedlings. *Plants*, 12, 2116. doi:10.3390/plants12112116
- Christian, N., Herre, E., & Clay, K. (2019). Foliar endophytic fungi alter patterns of nitrogen uptake and distribution in *Theobroma cacao*. *New Phytologist*, 1573-1583. doi:10.1111/nph.15693

- Courty, P., Smith, P., Koegel, S., Redecker, D., & Wipf, D. (2015). Inorganic Nitrogen Uptake and Transport in Beneficial Plant Root-Microbe Interactions. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 1-3. doi:10.1080/07352689.2014.897897
- Di Martino, C., Torino, V., Minotti, P., Pietrantonio, L., Del Grosso, C., & et al. (2022). Mycorrhized Wheat Plants and Nitrogen Assimilation in Coexistence and Antagonism with Spontaneous Colonization of Pathogenic and Saprophytic Fungi in a Soil of Low Fertility. *plants*, 11, 924. doi:10.3390/plants11070924
- Diehl, P., Mazzarino, M., Funes, F., Fontenla, S., Gobbi, M., & Ferrari, J. (2003). Nutrient conservation strategies in native Andean-Patagonian forests. *Journal of Vegetation Science*, 14(1), 63-70. doi:10.1111/j.1654-1103.2003.tb02128.x
- Ditengou, F., Béguiristain, T., & Lapeyrie, F. (2000). Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. *Plant*, 211, 722-728. doi:10.1007/s004250000342
- Drake, F., Herrera, M., & Acuña, E. (2005). Sustainable Propousal Management of *Araucaria araucana* (Mol. C. Koch). *Bosque*, 26, 23-32. doi:10.4067/S0717-92002005000100003
- Eshel, A., & Beeckman, T. (2013). *Plant Roots (Fourth Edition (4th ed.) ed.)*. CRC Press. doi:10.1201/b14550
- Evans, D. (2001). Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition. *Trends in Plant Science*, 6(3), 121-126. doi:10.1016/S1360-1385(01)01889-1
- Facelli, J. (2008). Specialized strategies I: seedlings in stressful environments. *Seedling Ecology and Evolution*, Chapter 3, 56-58. doi:10.1017/CBO9780511815133.005
- Forde, B., & Lea, P. (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2339-2358. doi:10.1093/jxb/erm121
- Foyer, C., Noctor, G., & Verrier, P. (2018). Photosynthetic Carbon–Nitrogen Interactions: Modelling Inter-Pathway Control and Signalling. *Annual Plant Reviews*, 22, 325-347. doi:10.1002/9781119312994.apr0227
- Fraser, C., & Chapple, C. (2011). The Phenylpropanoid Pathway in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*, 9, e0152. doi:10.1199/tab.0152

González-Teuber, M., Contreras, R., Zúñiga, G., & et al. (2022). Synergistic Association With Root Endophytic Fungi Improves Morpho-Physiological and Biochemical Responses of *Chenopodium quinoa* to Salt Stress. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9:787318. doi:10.3389/fevo.2021.787318

Guo, F.-Q., Wang, R., Chen, M., & Crawford, N. (2001). The Arabidopsis Dual-Affinity Nitrate Transporter Gene AtNRT1.1 (CHL1) Is Activated and Functions in Nascent Organ Development during Vegetative and Reproductive Growth. *The Plant Cell*, 13, 1761-1777. doi:10.1105/TPC.010126

Gupta, S., Schillaci, M., Walker, R., Smith, P., Watt, M., & et al. (2021). Alleviation of salinity stress in plants by endophytic plant-fungal symbiosis: Current knowledge, perspectives and future directions. *Plant and Soil*, 461, 219-244. doi:10.1007/s11104-020-04618-w

Hadad, M., Roig Juñent, F., Boninsegna, J., & Patón, D. (2014). Age effects on the climatic signal in *Araucaria araucana* from xeric sites in Patagonia, Argentina. *Plant Ecology & Diversity*, 8, 343-351. doi:10.1080/17550874.2014.980350

Hageman, R., & Hucklesby, D. (1971). [45] Nitrate reductase from higher plants. *Methods in Enzymology*, 23, 491-503. doi:https://doi.org/10.1016/S0076-6879(71)23121-9

Hechenleitner, P., Gardner, M., Thomas, P., Echeverría, C., Escobar, B., Brownless, P., & et al. (2005). *Plantas Amenazadas del Centro-Sur de Chile (Distribución, Conservación y Propagación) (First Edition (1th ed.) ed.)*. Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edimburgo. Obtenido de <http://dspace.ugal.cl/bitstream/1950/10294/1/Hechenleitner%20%20V..pdf>

Hobbie, E., & Högborg, P. (2012). Nitrogen isotopes link mycorrhizal fungi and plants to nitrogen dynamics. *New Phytologist*, 196, 367-382. doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04300.x

Hoeksema, J., Chaudhary, B., Gehring, C., & et al. (2010). A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters*, 13(3), 394-407. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01430.x

Högborg, P., Johannisson, C., Yarwood, S., & et al. (2010). Recovery of ectomycorrhiza after 'nitrogen saturation' of a conifer forest. *New Phytologist*, 189, 515-525. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03485.x

Hu, S., & Bidochka, M. (2021). Root colonization by endophytic insect-pathogenic fungi. *Journal of applied microbiology*, 130, 570-581. doi:10.1111/jam.14503

Huang, X.-F., Chaparro, J., Reardon, K., Zhang, R., Shen, Q., & Vivanco, J. (2014). Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*, 92, 267-275. doi:10.1139/cjb-2013-0225

IUCN Red List of Threatened Species. (2011). Red List. doi:10.2305_IUCN.UK.2013-1.RLTS.T31355A2805113

Jambois, A., Dauphin, A., Kawano, T., & et al. (2005). Competitive antagonism between IAA and indole alkaloid hypaphorine must contribute to regulate ontogenesis. *Physiologia Plantarum*, 123(2), 120-129. doi:10.1111/j.1399-3054.2005.00474.x

Khaekhum, S., Ekprasert, J., Suebrasri, T., & et al. (2021). Co-Inoculation of an Endophytic and Arbuscular Mycorrhizal Fungus Improve Growth and Yield of *Helianthus tuberosus* L. under Field Condition. *Journal of Fungi*, 7(11), 976. doi:10.3390/jof7110976

Kiba, T., & Krapp, A. (2016). Plant Nitrogen Acquisition Under Low Availability: Regulation of Uptake and Root Architecture. *Plant and Cell Physiology*, 57(4), 707-714. doi:10.1093/pcp/pcw052

Kiba, T., & Krapp, A. (2016). Plant Nitrogen Acquisition Under Low Availability: Regulation of Uptake and Root Architecture. *Plant & Cell Physiology*, 57(4), 707-714. doi:10.1093/pcp/pcw052

Kishorekumar, R., Bulle, M., Wany, A., & Jagadis, K. (2020). An Overview of Important Enzymes Involved in Nitrogen Assimilation of Plants. *Nitrogen Metabolism in Plants*, 2057, 1-13. doi:10.1007/978-1-4939-9790-9_1

Koegel, S., Boller, T., Lehmann, M., Wiemken, A., & et al. (2013). Rapid nitrogen transfer in the *Sorghum bicolor*-*Glomus mosseae* arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Signaling & Behavior*, 8, e25229. doi:10.4161/psb.25229

Krapp, A. (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 115-122. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.010

Kumar, R., Shah, K., & Dubey, R. (2000). Salinity induced behavioural changes in malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance. *Plant Science*, 156, 23-34. doi:10.1016/s0168-9452(00)00224-7

Kunzmann, L. (2007). *Araucariaceae* (Pinopsida): Aspects in palaeobiogeography and palaeobiodiversity in the Mesozoic. *Zoologischer*

Anzeiger (A Journal of Comparative Zoology), 246, 257-277.
doi:10.1016/j.jcz.2007.08.001

Kuusk, V., Niinements, Ü., & Valladares, F. (2018). A major trade-off between structural and photosynthetic investments operative across plant and needle ages in three Mediterranean pines. *Tree Physiology*, 38, 543-557.
doi:10.1093/treephys/tpx139

Lam, H., Wong, P., Chan, H., & et al. (2003). Overexpression of the ASN1 gene enhances nitrogen status in seeds of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 132, 926-935. doi:10.1104/pp.103.020123

Lambers, H., Chapin III, S., & Pons, T. (2008). *Plant Physiological Ecology* (Second ed.). Springer. doi:10.1007/978-0-387-78341-3

Lea, P., & Forde, B. (1994). The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. *Plant, Cell & Environment*, 17, 541-556.
doi:10.1111/j.1365-3040.1994.tb00148.x

Lea, P., & Mifflin, B. (1974). Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, 251, 614-616. doi:10.1038/251614a0.

Lea, P., & Mifflin, B. (2010). Nitrogen Assimilation and its Relevance to Crop Improvement. *Annual Plant Reviews*, 42, 1-40. doi:10.1002/9781444328608.ch1

Lea, P., Blackwell, R., Chen, F.-L., & Hecht, U. (1990). 15 - Enzymes of Ammonia Assimilation. *Methods in Plant Biochemistry*, 3, 257-276. doi:10.1016/B978-0-12-461013-2.50022-8

Li, X., Zhang, J., Lin, S., & et al. (2022). (+)-Catechin, epicatechin and epigallocatechin gallate are important inducible defensive compounds against *Ectropis grisescens* in tea plants. *Plant, Cell & Environment*, 45(2), 496-511.
doi:10.1111/pce.14216

Liao, X., Lovett, B., Fang, W., & et al. (2017). *Metarhizium robertsii* produces indole-3-acetic acid, which promotes root growth in Arabidopsis and enhances virulence to insects. *Microbiology*, 163(7), 980-991. doi:10.1099/mic.0.000494

Lichtenthaler, H. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
doi:https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1

Lignum. (2017). Daño foliar y muerte de Araucarias. Proyectan posibles causas y líneas de acción. 18-22 pp. Obtenido de <https://issuu.com/revistamch/docs/lignum166>

- López-Hidalgo, C., Meijón, M., Lamelas, L., & Valledor, L. (2021). The rainbow protocol: A sequential method for quantifying pigments, sugars, free amino acids, phenolics, flavonoids and MDA from a small amount of sample. *Plant, Cell & Environment*, 44(6), 1977-1986. doi:10.1111/pce.14007
- López-Ráez, J., Shirasu, K., & Foo, E. (2017). Strigolactones in Plant Interactions with Beneficial and Detrimental Organisms: The Yin and Yang. *Trends in Plant Science*, 22, 527-537. doi:10.1016/j.tplants.2017.03.011
- Luo, Y., Jian, Y., Liu, Y., & et al. (2022). Flavanols from Nature: A Phytochemistry and Biological Activity Review. *Molecules*, 27(3), 719. doi:10.3390/molecules27030719
- Lusk, C. (2001). Leaf life spans of some conifers of the temperate forest of South America. *Revista chilena de historia natural*, 74, 711-718. doi:10.4067/S0716-078X2001000300017
- Ma, Q.-H. (2024). Lignin Biosynthesis and Its Diversified Roles in Disease Resistance. *Genes*, 15(3), 295. doi:10.3390/genes15030295
- Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual review of plant biology*, 63:73, 105. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105439
- Marro, N., Lidoy, J., Chico, M., Rlal, C., García, J., Varela, R., . . . López-Ráez, J. (2022). Strigolactones: New players in the nitrogen–phosphorus signalling interplay. 45(2), 512-527. doi:10.1111/pce.14212
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., & et al. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*, 105(7), 1141-1157. doi:10.1093/aob/mcq028
- Massalha, H., Korenblum, E., Tholl, D., & Aharoni, A. (2017). Small molecules below-ground: the role of specialized metabolites in the rhizosphere. *the plant journal*, 90, 788-807. doi:10.1111/tpj.13543
- Matus, F., Dyckmans, J., Stock, S., Merino, C., Dippold, M., & Kuzyakov, Y. (2025). Abiotic Nitrite Incorporation into Organic Matter in Volcanic and Non-Volcanic Soil Within Rainforest Ecosystems. *Forests*, 16(6), 930. doi:10.3390/f16060930
- Mejía, L., Herre, E., Sparks, J., Winter, K., García, M., & et al. (2014). Pervasive effects of a dominant foliar endophytic fungus on host genetic and phenotypic

expression in a tropical tree. *Frontiers in Microbiology*, 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00479

Miflin, B. (1974). The Location of Nitrite Reductase and Other Enzymes Related to Amino Acid Biosynthesis in the Plastids of Root and Leaves. *Plant Physiology*, 54, 550-555. doi:10.1104/pp.54.4.550

Millard, P., & Grelet, G.-a. (2010). Nitrogen storage and remobilization by trees: ecophysiological relevance in a changing world. *Tree Physiology*, 30(9), 1083-1095. doi:10.1093/treephys/tpq042

Muhorakeye, M., Namikoye, E., Khamis, F., Wanjohi, W., & et al. (2024). Biostimulant and antagonistic potential of endophytic fungi against fusarium wilt pathogen of tomato *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Scientific Reports*, 14, 15365. doi:10.1038/s41598-024-66101-1

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 474-497. doi:0.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Newsham, K. (2011). A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytologist*, 190, 783-793. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03611.x.

Ninkuu, V., Aluko, O., Yan, J., Zeng, H., Liu, G., Zhao, J., . . . Dakora, F. (2025). Phenylpropanoids metabolism: recent insight into stress tolerance and plant development cues. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1571825. doi:10.3389/fpls.2025.1571825

Nunes-Nesi, A., Fernie, A., & Stitt, M. (2010). Metabolic and Signaling Aspects Underpinning the Regulation of Plant Carbon Nitrogen Interactions. *Molecular Plant*, 3(6), 973-996. doi:10.1093/mp/ssq049

Obata, T., & Fernie, A. (2012). The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(19), 3225-3243. doi:10.1007/s00018-012-1091-5

O'Brien, J., Vega, A., Bouguyon, E., Krouk, G., Gojon, A., Coruzzi, G., & Gutiérrez, R. (2016). Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Molecular Plant*, 9(6), 837-856. doi:10.1016/j.molp.2016.05.004

Ojeda, C., Yañez, L., & Roig, F. (2017). Efectos del Cambio Climático en las hojas de *Araucaria araucana*. *Universitarios Potosinos*, 14, 4-10. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/320086166>

- Okamoto, M., Vidmar, J., & Glass, A. (2003). Regulation of NRT1 and NRT2 Gene Families of *Arabidopsis thaliana*: Responses to Nitrate Provision. *Plant and Cell Physiology*, 44, 304-317. doi:10.1093/pcp/pcg036
- Onoda, Y., Wright, I., Evans, J., Hikosaka, K., Kitajima, K., & et al. (2017). Physiological and structural tradeoffs underlying the leaf economics spectrum. *New Phytologist*, 214, 1395-1397. doi:10.1111/nph.14496
- Peng, Q., Shrestha, A., Zhang, Y., Fan, J., Yu, F., & Wang, G. (2024). How lignin biosynthesis responds to nitrogen in plants: a scoping review. *Plant Biology*, 26(6), 881-895. doi:10.1111/plb.13627
- Pietro-Souza, W., Pereira, F., Souza, I., Frutuoso, F., & et al. (2020). Mercury resistance and bioremediation mediated by endophytic fungi. *Chemosphere*, 240, 124874. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.124874
- Pons, L., Conti-Jerpe, I., Guibert, I., & et al. (2025). Host Evaluation: Reliance on Symbionts: A new metric for quantifying nutrient exchange in nutritional mutualisms. *Methods in Ecology and Evolution*, 16(9), 1887-2165. doi:10.1111/2041-210X.70111
- Reis, M., Ladio, A., & Peroni, N. (2014). Landscapes with *Araucaria* in South America: Evidence for a cultural dimension. *Ecology and Society*, 19, 43. doi:10.5751/ES-06163-190243
- Riquelme, S., Campos, J., Pecio, L., & et al. (2022). *Sirex noctilio* infestation led to inevitable pine death despite activating pathways involved in tolerance. *Phytochemistry*, 203, 113350. doi:10.1016/j.phytochem.2022.113350
- Rivera, B., Sáez, P., Cavieres, L., Capó-Bauçà, S., Iñiguez, C., & et al. (2022). Anatomical and biochemical evolutionary ancient traits of *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch and their effects on carbon assimilation. *Tree Physiology*, 42, 1957-1974. doi:10.1093/treephys/tpac057.
- Rosner, B. (1975). On the detection of many outliers. *Technometrics*, 17, 221-227. doi:10.2307/1268354
- Ruan, J., Zhang, F., & Wong, M. (2000). Effect of nitrogen form and phosphorus source on the growth, nutrient uptake and rhizosphere soil property of *Camellia sinensis* L. *Plant and Soil*, 223, 65-73. doi:10.1023/A:1004882001803
- 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. Technical Report. doi:10.13140/RG.2.2.20807.14248

Sánchez-Fernández, R., Sánchez-Ortiz, B., Sandoval-Espinosa, Y., Ulloa-Benítez, Á., & et al. (2013). Endophytic fungi: a potential source of bioactive secondary metabolites and their application in agriculture and medicine. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 16, 132-146. Obtenido de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2013000200006

Sanfuentes, E., González, M., Castillo, M., Rubilar, R., Besoain, X., Sanhueza, C., & Smith, M. (2022). Detection of *Phytophthora cinnamomi* on declining *Araucaria araucana* forests. *Forest Pathology*, 52(5), e12765. doi:10.1111/efp.12765

Sanguinetti, J., & Kitzberger, T. (2009). *Araucaria araucana* temporal and spatial seedling establishment patterns: masting, seed predation and understory vegetation effects. *Revista chilena de historia natural*, 82, 319-335. doi:10.4067/S0716-078X2009000300001

Sanguinetti, J., Ditgen, R., Donoso-Calderón, S., Hadad, M., Gallo, L., González, M., & et al. (2023). Relevant scientific information for management and conservation of the Pewen biocultural ecosystem in Chile and Argentina. *Bosque (Valdivia)*, 44(1), 179-190. doi:10.4067/s0717-92002023000100179

Sasse, J., Martinoia, E., & Northen, T. (2018). Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? *Trends in Plant Science*, 23(1), 25-41. doi:10.1016/j.tplants.2017.09.003

Satti, P., Mazzarino, M., Gobbi, M., Funes, F., Roselli, L., & Fernández, H. (2003). Soil N dynamics in relation to leaf litter quality and soil fertility in north-western Patagonian forests. *Journal of Ecology*, 91(2), 173-181. doi:10.1046/j.1365-2745.2003.00756.x

Shaalán, R., Ibrahim, L., As-sadi, F., & et al. (2022). Impact of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the Metabolic Interactions between Cucumber (*Cucumis sativus* L.) and Cucumber Mosaic Virus (CMV). *Horticulturae*, 8(12), 1182. doi:10.3390/horticulturae8121182

Sharma, S., Singh, P., Choudhary, O., & Neemisha. (2021). Nitrogen and rice straw incorporation impact nitrogen use efficiency, soil nitrogen pools and enzyme activity in rice-wheat system in north-western India. *Field Crops Research*, 266, 108131. doi:10.1016/j.fcr.2021.108131

Sherameti, I., Shahollari, B., Venus, Y., Altschmied, L., & et al. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco

and Arabidopsis roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 26241-26247. doi:10.1074/jbc.M500447200

Skopelitis, D., Paranychianakis, N., Paschalidis, K., Pliakonis, E., & et al. (2006). Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *The Plant Cell*, 18, 2767-2781. doi:10.1105/tpc.105.038323

Smith, C., & Osborn, M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67, 6-20. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.

Smith, S., & Read, D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis* (Third ed.). doi:10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6

Stitt, M., & Krapp, A. (1999). The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environment*, 22(6), 583-621. doi:10.1046/j.1365-3040.1999.00386.x

Sui, L., Lu, Y., Zhou, L., Li, N., & et al. (2023). Endophytic *Beauveria bassiana* promotes plant biomass growth and suppresses pathogen damage by directional recruitment. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1227269. doi:10.3389/fmicb.2023.1227269

Sweetlove, L., Beard, K., & Nunes-Nesi, A. (2010). Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in Plant Science*, 15(8), 462-470. doi:10.1016/j.tplants.2010.05.006

Taheri, P. (2025). Endophytic fungi as regulators of phytohormones production: Cytomolecular effects on plant growth, stress protection and importance in sustainable agriculture. *Plant Stress*, 17, 100978. doi:10.1016/j.stress.2025.100978

Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Fisiología Vegetal* (Third ed.). Plant Physiology. Obtenido de https://books.google.cl/books?id=7QIbYg-OC5AC&printsec=frontcover&hl=es&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

Taylor, T., Klavins, S., Krings, E., & et al. (2007). Fungi from the Rhynie chert: a view from the dark side. *Earth and Environmental Science*, 94, 457-473. doi:10.1017/S026359330000081X

Treutter, D. (2008). Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis. *Plant Biology*, 7(6), 581-591. doi:10.1055/s-2005-873009

- Trivedi, P., Leach, J., Tringe, S., Sa, T., & Singh, B. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 18, 607-621. doi:10.1038/s41579-020-0412-1
- Urcelay, C., Borda, V., Marro, N., & López-Ráez, J. (2026). Flavonoids, strigolactones, and beyond: scaling plant-arbuscular mycorrhizal fungi communication towards community-level dynamics. *New Phytologist*, 250(6), 3559-3571. doi:10.1111/nph.71122
- van der Ham, R., Jagt, J., Renkens, S., & van Konijnenbur-van Cittert, J. (2010). Seed-cone scales from the upper Maastrichtian document the last occurrence in Europe of the Southern Hemisphere conifer family Araucariaceae. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 291, 469-473. doi:10.1016/j.palaeo.2010.03.017
- Veblen, T., Donoso, C., Kitzberger, T., & Rebertus, A. (1996). Ecology of southern Chilean and Argentinean Nothofagus forest. *The Ecology and Biogeography of Nothofagus Forests*. Yale University Press, 293-353. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/301346312_Ecology_and_Biogeography_of_Nothofagus_Forests
- Vega, F. (2018). The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycologia*, 110, 4-30. doi:10.1080/00275514.2017.1418578
- Villagrán, C. (2018). Biogeografía de los bosques subtropical-templados del sur de sudamérica. Hipótesis históricas. *Magallania (Punta Arenas)*, 46, 27-48. doi:10.4067/S0718-22442018000100027
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2-20. doi:10.1093/mp/ssp106
- Wagner, S. (2011). Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge*, 10, 15. Obtenido de <http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/biological-nitrogen-fixation-23570419>
- Wang, Q., Zhang, X., Xie, Q., Tao, J., Jia, Y., & et al. (2024). Exploring Plant Growth-Promoting Traits of Endophytic Fungi Isolated from Ligusticum chuanxiong Hort and Their Interaction in Plant Growth and Development. *Journal of fungi*, 10, 713. doi:10.3390/jof10100713
- Winter, G., Todd, C., Trovato, M., & et al. (2015). Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6:534. doi:10.3389/fpls.2015.00534

Wright, I., Groom, P., Lamont, B., Poot, P., Prior, L., & et al. (2004). Short Communication: Leaf trait relationships in Australian plant species. *Functional Plant Biology*, 31, 551-558. doi:10.1071/FP03212

Wu, F., Qu, D., Zhao, X., Zhu, D., & et al. (2023). A high-affinity nitrate transporter PaNRT2.1 mediates dark septate endophyte (DSE) dependent nitrogen assimilation in sweet cherry roots. *Plant and Soil*, 489, 1-18. doi:10.1007/s11104-023-06039-x

Ye, J., Tian, W., & Jin, C. (2022). Nitrogen in plants: from nutrition to the modulation of abiotic stress adaptation. *Stress Biology*, 2, 4. doi:10.1007/s44154-021-00030-1

Zhang, H., Cheng, H., Twagirayezu, G., Zhang, F., Shi, Y., Luo, C., & et al. (2023). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Adjusts Root Architecture to Promote Leaf Nitrogen Accumulation and Reduce Leaf Carbon–Nitrogen Ratio of Mulberry Seedlings. *forest*, 14, 2448. doi:10.3390/f14122448

Zhao, Y. (2010). Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annual Reviews*, 61, 49-64. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112308

7. ANEXOS

Figuras suplementarias

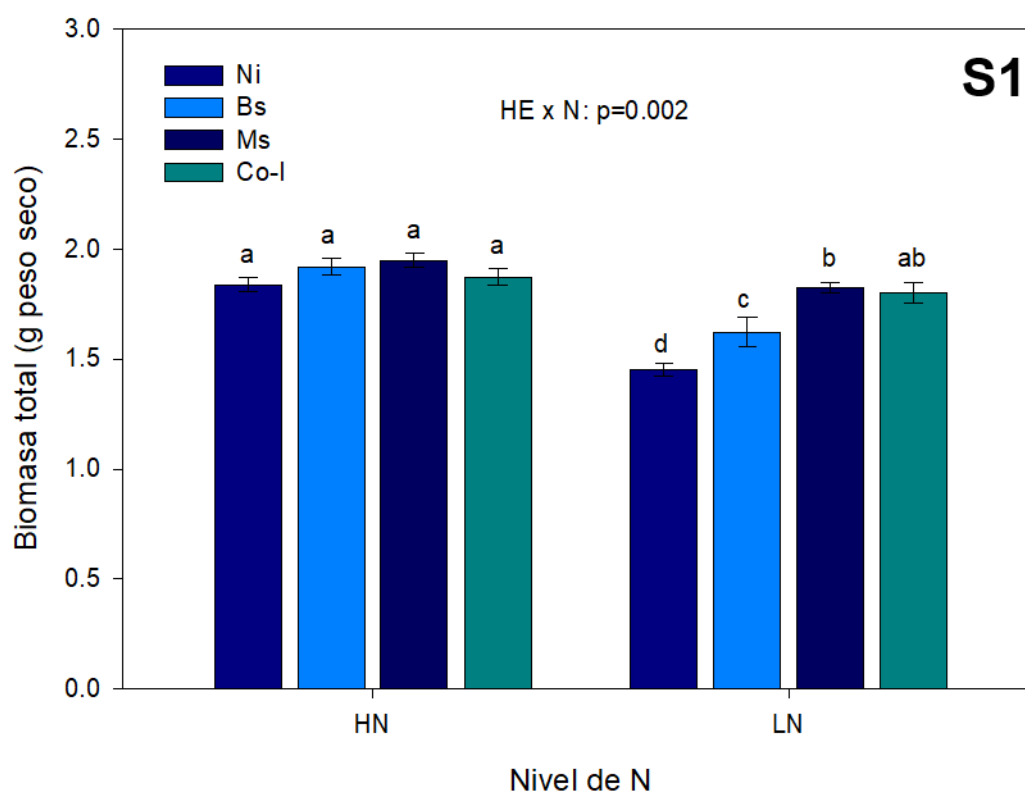


Figura S1. Efecto de la inoculación con HE y nivel de N sobre la biomasa total de las plántulas de *Araucaria araucana*, en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). Los tratamientos corresponden a plántulas no inoculadas (Ni), inoculadas con *Beauveria sp.* (Bs), *Metarhizium sp.* (Ms) y Co-inoculación (Co-I). Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar ($n = 4$). Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey (HSD, $p < 0.05$). Los valores de p para los efectos de inoculación fúngica (HE), nivel de N y su interacción (HE x N) se indican en cada gráfico.

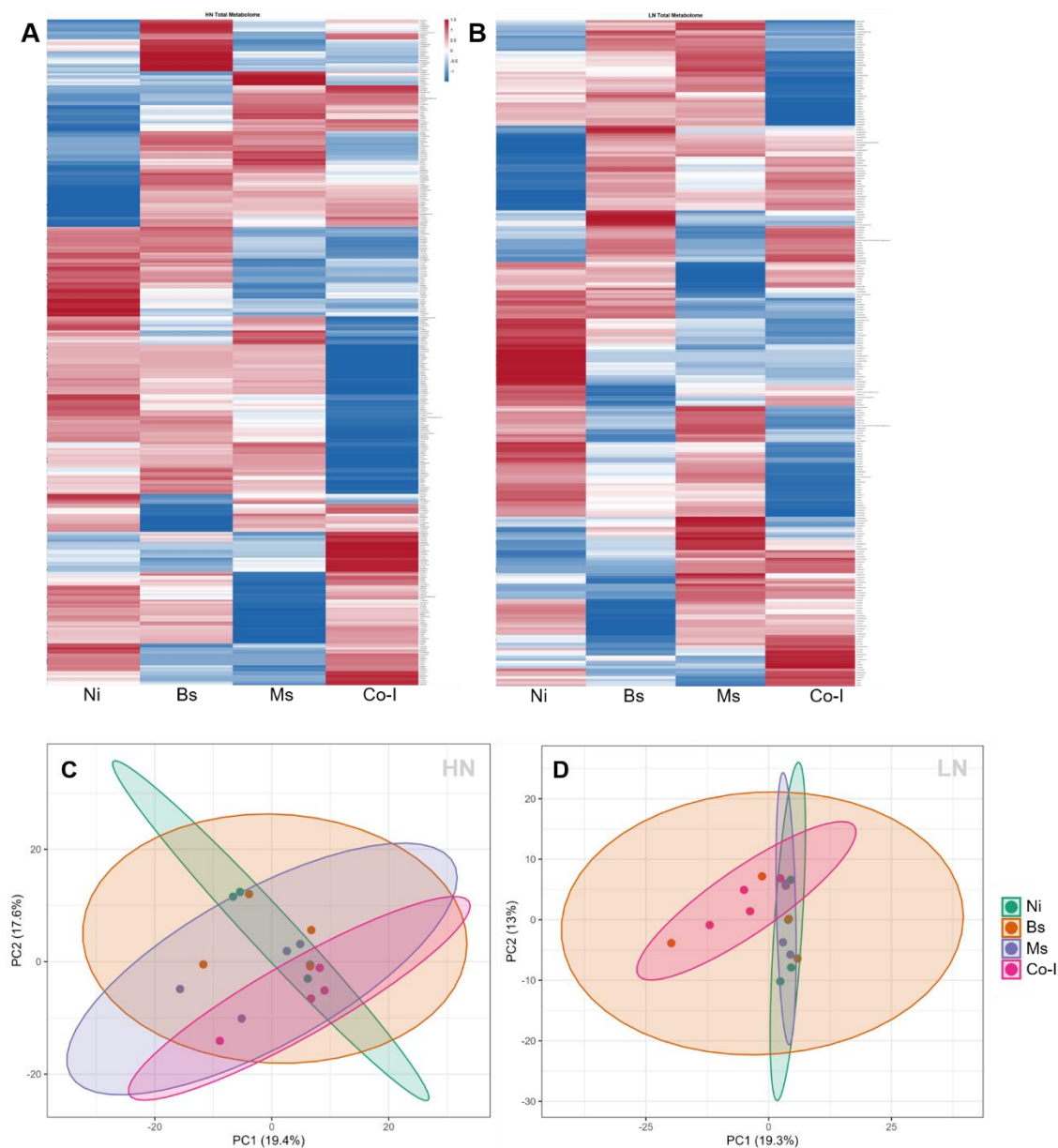


Figura S2. Análisis global del perfil metabolómico foliar de plántulas de *Araucaria araucana* inoculadas con HE en condiciones de alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN). Los tratamientos corresponden a plántulas no inoculadas (Ni), inoculadas con *Beauveria* sp. (Bs), *Metarhizium* sp. (Ms) y Co-inoculación (Co-I). Los mapas de calor muestran (A) la abundancia relativa de los 334 metabolitos detectados en HN y; (B) los 259 metabolitos detectados en LN. La barra de escala representa los valores estandarizados de abundancia relativa, desde baja (azul) hasta alta (roja). Los análisis de componentes principales (PCA) realizados utilizando la totalidad de los metabolitos detectados se presentan para (C) HN y; (D) LN, mostrando la variación global del perfil metabolómico entre tratamientos fúngicos y niveles de nitrógeno.

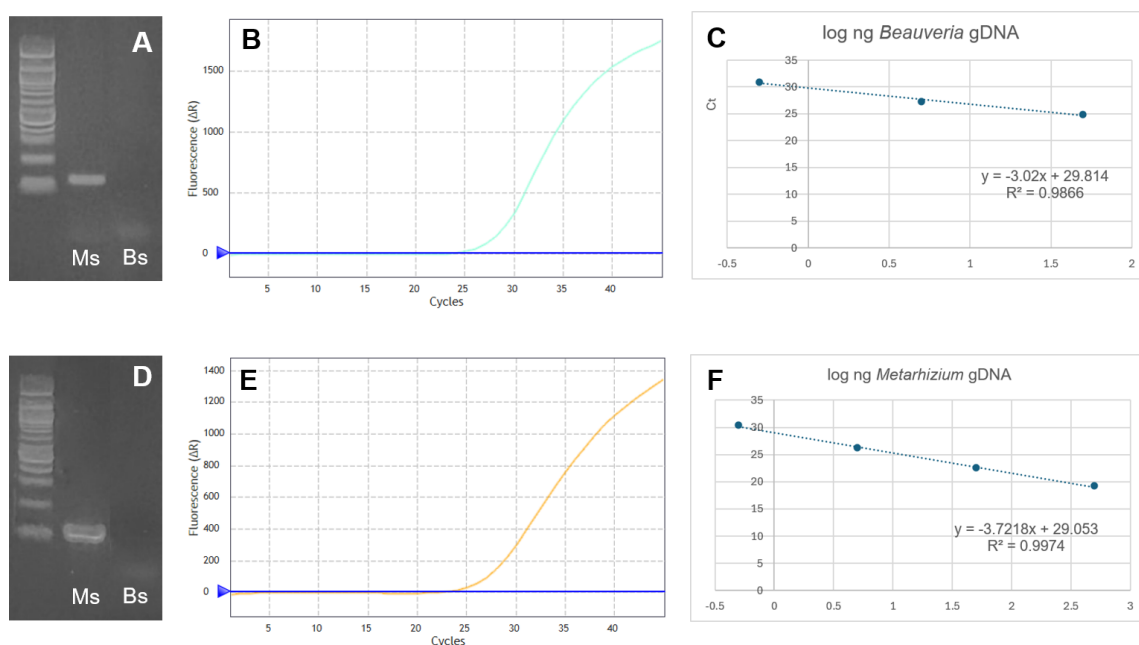


Figura S3: Validación de la especificidad de los cebadores de qPCR para hongos endófitos (HE) utilizando cultivos fúngicos puros. Se obtuvieron productos de amplificación por PCR de 122 pb para *Beauveria spp.* (Bs) y de 127 pb para *Metarhizium spp.* (Ms). (A) Productos de amplificación por PCR de *Beauveria spp.* y *Metarhizium spp.*, junto a un marcador de ADN de 100 pb. (B) Curva de amplificación obtenida con los cebadores de qPCR para *Beauveria spp.* (C) Curva estándar generada con los cebadores de qPCR para *Beauveria spp.* (D) Productos de amplificación por PCR de *Metarhizium spp.* y *Beauveria spp.*, junto a un marcador de ADN de 100 pb. (E) Curva de amplificación obtenida con los cebadores de qPCR para *Metarhizium spp.* (F) Curva estándar generada con los cebadores de qPCR para *Metarhizium spp.*