

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
CAMPUS LOS ÁNGELES
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal**



ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA CONSERVACIÓN *in vitro* DE *Colobanthus quitensis* EN CONDICIONES DE CRECIMIENTO MÍNIMO.

Memoria de título presentada al Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal de la Universidad de Concepción para optar al título profesional de ingeniero en biotecnología vegetal

POR: RODRIGO ANDRÉS BURGOS SUÁREZ

Profesor Guía: Marely Cuba Díaz

**marzo 2020
LOS ÁNGELES, CHILE**



PÁGINA DE DERECHO DE AUTOR

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

ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA CONSERVACIÓN *in vitro* DE *Colobanthus quitensis* EN CONDICIONES DE CRECIMIENTO MÍNIMO.

Alumno



Rodrigo Burgos Suárez
Ingeniero en Biotecnología Vegetal

Profesor Guía



Dra. Marely Cuba Díaz
Profesor Titular
Biólogo

Jefe de Carrera

Profesor Pedro Quiroz Hernández
Profesor Instructor
Ingeniero de Ejecución Forestal

Director Departamento

Mg. Pablo Novoa Barra
Profesor Asistente
Ingeniero de Ejecución Forestal

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera darle las gracias al Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales y a la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la U. de Concepción, por facilitarme el espacio, el material y financiamiento en pro de esta investigación.

A mis padres por los valores entregados, por su apoyo incondicional y la persistencia de no rendirme, aunque la vida te diga lo contrario. Por estar conmigo en las buenas decisiones y en las malas, por ser mi modelo a seguir y porque, a pesar de todo, siguen y seguirán siendo mis guías en la vida. Gracias por ser mis padres, aunque a veces hayan diferencias, esos pensamientos son opacados por el cariño que siento por Uds.

Quiero dar un enorme agradecimiento a una personita, que empezó observando al inicio de esta investigación, pero al final terminó siendo mi mejor compañera de trabajo, Solange Alveal (Soe). Desde que nos conocimos me has apoyado en todo, has sido mi amiga, compañera de carrera y laboratorio, además de formar parte de mi vida. Creo que después de odiar a las *Colobanthus* (broma), algo bueno obtuve de ellas, fue conocerte. Gracias darme la oportunidad de formar parte de tu camino. En parte, esta memoria es gracias a ti.

Dar las gracias a la Prof. Marely Cuba por su apoyo, colaboración y PACIENCIA a lo largo de toda esta investigación y durante estos años de estudio, sé que va a extrañar retarme, pero descuide, al menos quedó una mejor subordinada de reemplazo. También, agradecer al Prof. Mauricio Rondanelli por sus sabias palabras hace años. También a Darío y Macarena por su ayuda en la parte crucial de esta memoria.

Agradecer a mis amigos Dante Vásquez y Diego Farias, los cuales me ayudaron, aconsejaron y contribuyeron en esta memoria, además de que fueron los mejores compañeros de carrera que podría haber. Extrañaré esas tardes con música, sus conversaciones y salidas después del horario de laboratorio. Agradecer también a muchas otras personas durante este paso por la Universidad: a Lizeth por tus consejos; además a la selección de baloncesto, Iván L., Javier Y., Marce D., Carla C., Naty C., Kathy V., Álvaro H., Paulina P., entre muchos más... Por el tiempo compartido, las risas, consejos y momentos únicos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
1. RESUMEN.....	13
1.1 ABSTRACT	14
2. INTRODUCCIÓN.....	15
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	27
5. OBJETIVOS	27
5.1 General	27
5.2 Específicos	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1 Material vegetal	28
6.2 Preparación de medio basal	28
6.3 Preparación de explantes y condiciones de conservación	29
6.4 Etapa 1 - Efecto del uso de diferentes tipos de tapas en frascos de vidrio.....	29
6.5 Etapa 2 - Efecto por número de explantes y disminución de la concentración del medio basal.....	30
6.6 Etapa 3 - Efecto por aumento de la concentración de agentes osmoreguladores en medio basal	30
6.7 Curva de absorbancia de papel celofán.....	30
6.8 Medición de la intensidad lumínica a través de papeles filtro.....	31
6.9. Etapa 4 – Efecto del recubrimiento de los frascos con papel celofán.....	32
6.9.1. Obtención de extracto y separación e identificación de pigmentos	32
6.10 Evaluación del efecto morfo-fisiológico en los tratamientos	32
6.11 Diseño experimental y análisis estadístico.....	33
7. RESULTADOS	35
7.1 Etapa 1 - Evaluación del efecto por uso de diferentes tipos de tapas en el desarrollo morfo-fisiológico de <i>C. quitensis</i> pC.....	35

7.2	Etapa 1 - Evaluación del efecto por uso de diferentes tipos de tapas en el desarrollo morfo-fisiológico de <i>C. quitensis</i> pA.....	37
7.3	Etapa 2 - Análisis del efecto por número de explantes y disminución de la concentración de medio MS en el desarrollo morfo-fisiológico de <i>C. quitensis</i> pC ...	39
7.4	Etapa 2 - Análisis del efecto por número de explantes y disminución de la concentración de medio MS en el desarrollo morfo-fisiológico de <i>C. quitensis</i> pA....	41
7.5	Etapa 3 - Evaluación del efecto por adición de agentes osmo-reguladores en medio basal en el desarrollo morfo-fisiológico de <i>C. quitensis</i> pC	43
7.6	Etapa 3 - Evaluación del efecto por adición de agentes osmo-reguladores en medio basal en el desarrollo morfo-fisiológico de <i>C. quitensis</i> pA	46
7.7	Etapa 4 - Curva de absorbancia de papeles filtro.	49
7.8	Etapa 4 - Evaluación del efecto por recubrimiento con filtros de luz roja en el desarrollo morfo-fisiológico y fotoquímico de <i>C. quitensis</i> pC.....	50
7.9	Etapa 4 - Evaluación del efecto por recubrimiento con filtros de luz roja en el desarrollo morfo-fisiológico y fotoquímico de <i>C. quitensis</i> pA.....	54
8.	DISCUSIÓN.....	58
8.1	Etapa 1 - Evaluación del efecto por uso de diferentes tipos de tapas en el desarrollo morfo-fisiológico de <i>C. quitensis</i>	58
8.2	Etapa 2 - Análisis del efecto por número de explantes y disminución de la concentración de medio MS en el desarrollo morfo-fisiológico de <i>C. quitensis</i>	60
8.3	Etapa 3 - Evaluación del efecto por adición de agentes osmo-reguladores en medio basal en el desarrollo morfo-fisiológico de <i>C. quitensis</i>	61
8.4	Etapa 4 - Evaluación del efecto por recubrimiento con filtros de luz roja en el desarrollo morfo-fisiológico y fotoquímico de <i>C. quitensis</i>	63
9.	CONCLUSIÓN.....	683
10.	GLOSARIO.....	64
11.	BIBLIOGRAFÍAS.....	705
12.	ANEXOS.....	816

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plántulas de *Colobanthus quitensis in vitro*: población Arctowski (pA) a) plántula y b) explante (5 mm de longitud); población Conguillío (pC) c) plántula y d) explante (10 mm de longitud)23

Figura 2. Tubos de vidrio para medición de absorbancia de luz por espectrofotometría cubiertos con papel celofán de color A) rojo, B) naranja. El tubo de vidrio sin cubrir fue considerada como blanco26

Figura 3. Efecto por el uso de diferentes tipos de tapas de sellado: metálica (M), doble lámina de papel aluminio (A) y film plástico (P) en **a)** la longitud foliar (Análisis no paramétrico, test Kuskal-Wallis $p \leq 0,05$) y **b)** la longitud radicular (letras diferentes indican diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$).; de plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío (pC), después de 60 días de cultivo *in vitro*. Los tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)29

Figura 4. Efecto por el uso de diferentes tipos de tapas de sellado: metálica (M), doble lámina de papel aluminio (A) y film plástico (P) en **a)** el número de brotes y **b)** el número de ápices foliares; de plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío (pC), después de 60 días de cultivo *in vitro*. Los tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE). Análisis no paramétrico, test Kuskal-Wallis $p \leq 0,05$)30

Figura 5. Efecto por el uso de diferentes tipos de tapas de sellado: metálica (M), doble lámina de papel aluminio (A) y film plástico (P) en **a)** la eficiencia cuántica máxima del PSII (fotosistema II) y **b)** el porcentaje de amarillamiento foliar; de plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío (pC), después de 60 días de cultivo *in vitro*. Los tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE). Análisis no paramétrico, test Kuskal-Wallis $p \leq 0,05$)31

Figura 6. Efecto por el uso de diferentes tipos de tapas de sellado: metálica (M), doble lámina de papel aluminio (A) y film plástico (P) en **a)** la longitud foliar (letras diferentes indican diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$) y **b)** la longitud radicular (Análisis no paramétrico, test Kuskal-Wallis $p \leq 0,05$); de plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski (pA), después de 60 días de cultivo *in vitro*. Los tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)32

Figura 7. Efecto por el uso de diferentes tipos de tapas de sellado: metálica (M), doble lámina de papel aluminio (A) y film plástico (P) en **a)** el número de brotes y **b)** el número de ápices foliares; de plantas de *Colobanthus quitensis* población Artowski (pA), después

de 60 días de cultivo *in vitro*. Los tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media±error standard (SE). Análisis no paramétrico, test Kuskal-Wallis $p \leq 0,05$)32

Figura 8. Efecto por el uso de diferentes tipos de tapas de sellado: metálica (M), doble lámina de papel aluminio (A) y film plástico (P) en **a)** la eficiencia cuántica máxima del PSII (fotosistema II) y **b)** el porcentaje de amarillamiento foliar; de plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski (pA), después de 60 días de cultivo *in vitro*. Los tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media±error standard (SE). Análisis no paramétrico, test Kuskal-Wallis $p \leq 0,05$)33

Figura 9. Efecto del uso de diferentes concentraciones de sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) (100%, 50% y 25%) y diferente densidad de explantes por frasco (7, 9 y 12) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío (7, 9 y 12 por frasco), después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** en el crecimiento foliar y **b)** en el crecimiento radicular. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA factorial, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media±error standard (SE)34

Figura 10. Efecto del uso de diferentes concentraciones de sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) (100%, 50% y 25%) y diferente densidad de explantes por frasco (7, 9 y 12) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío (7, 9 y 12 por frasco), después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** número de brotes y **b)** evaluación del porcentaje de amarillamiento en hojas. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA factorial, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media±error standard (SE)35

Figura 11. Efecto del uso de diferentes concentraciones de sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) (100%, 50% y 25%) y diferente densidad de explantes por frasco (7, 9 y 12) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski (7, 9 y 12 por frasco), después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En el crecimiento foliar y **b)** en el crecimiento radicular. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA factorial, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media±error standard (SE)36

Figura 12. Efecto del uso de diferentes concentraciones de sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) (100%, 50% y 25%) y diferente densidad de explantes por frasco (7, 9 y 12) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski (7, 9 y 12 por frasco), después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** Número de brotes y **b)** evaluación del porcentaje de amarillamiento en hojas. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA factorial, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media±error standard (SE)37

Figura 13. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac (sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** en el crecimiento foliar y **b)** en el crecimiento radicular. Los tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)38

Figura 14. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac (sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** La eficiencia cuántica máxima del PSII (fotosistema II) (letras diferentes indican diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$) y **b)** en el porcentaje de sobrevivencia de las plantas. Tratamientos se realizaron en triplicado, columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)39

Figura 15. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac (sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En el número de brotes (letras diferentes indican diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$) y **b)** en el porcentaje de amarillamiento foliar (Análisis no paramétrico, test Kruskal-Wallis $p \leq 0,05$). Tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)40

Figura 16. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac (sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío después de 90 días de cultivo *in vitro*, en el contenido relativo de agua. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)41

Figura 17. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac (sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En el crecimiento foliar y **b)** en el crecimiento radicular. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)42

Figura 18. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac (sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En la eficiencia cuántica máxima del PSII (fotosistema II) (letras diferentes indican diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$) y **b)** en el porcentaje de sobrevivencia de las plantas. Tratamientos se realizaron en triplicado, columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)43

Figura 19. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac (sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En el número de brotes y **b)** en el porcentaje de amarillamiento foliar. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)44

Figura 20. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac (sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski después de 90 días de cultivo *in vitro*, en el contenido relativo de agua. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)44

Figura 22. Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío, después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** en el crecimiento foliar y **b)** en el crecimiento radicular. Los tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)46

Figura 23. Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío, después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En la eficiencia cuántica máxima del PSII (fotosistema II) (letras diferentes indican diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$) y **b)** en el porcentaje de sobrevivencia de plantas. Tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)47

Figura 24. Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío, después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En el número de brotes (letras diferentes indican diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$) y **b)** en el porcentaje de amarillamiento foliar (Análisis no paramétrico, test Kuskal-Wallis $p \leq 0,05$). Tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)48

Figura 25. Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío, después de 90 días de cultivo *in vitro*, en el contenido relativo de agua. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)49

- Figura 26.** Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío, después de 90 días de cultivo *in vitro*: en el acumulación de pigmentos fotosintéticos **a)** neoxantina, **b)** violaxantina, **c)** luteína, **d)** beta caroteno, **e)** clorofila a y **f)** clorofila b. Tratamientos se realizaron en triplicado; columnas representadas con la media50
- Figura 27.** Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski, después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En el crecimiento foliar y **b)** en el crecimiento radicular. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)51
- Figura 28.** Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski, después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En la eficiencia cuántica máxima del PSII (fotosistema II) (letras diferentes indican diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$) y **b)** en el porcentaje de sobrevivencia de plantas. Tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)52
- Figura 29.** Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski, después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En el número de brotes y **b)** en el porcentaje de amarillamiento foliar. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)53
- Figura 30.** Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski, después de 90 días de cultivo *in vitro*, en el contenido relativo de agua. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE)54
- Figura 31.** Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski, después de 90 días de cultivo *in vitro*: en el acumulación de pigmentos fotosintéticos **a)** neoxantina, **b)** violaxantina, **c)** luteína, **d)** beta caroteno, **e)** clorofila a y **f)** clorofila b. Tratamientos se realizaron en triplicado; columnas representadas con la media55

Anexo figura 1. Esquema de las 4 etapas aplicadas en la conservación *in vitro* de *C. quitensis* poblaciones Arctowski (pA) y población Conguillío (pC), de arriba abajo, las etapas son etapa 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Las casillas en color amarillo son consideradas controles78

Anexo figura 2. Efecto del uso de diferentes concentraciones de MS (100%, 50% y 25%) en plantas de *C. quitensis* pC, después de 30 días de cultivo. A, B, C: 100% de MS con 7, 9 y 12 explantes respectivamente. D, E, F: 50% de MS con 7, 9 y 12 explantes respectivamente. G, H, I: 25% de MS con 7, 9 y 12 explantes respectivamente79

Anexo figura 3. Efecto del uso de diferentes concentraciones de MS (100%, 50% y 25%) en plantas de *C. quitensis* pA, después de 30 días de almacenamiento. A, B, C: 100% de MS con 7, 9 y 12 explantes respectivamente. D, E, F: 50% de MS con 7, 9 y 12 explantes respectivamente. G, H, I: 25% de MS con 7, 9 y 12 explantes respectivamente.....80

Anexo figura 4. Curva de absorbancia de luz en papel celofán naranja y rojo. Rango de absorbancia establecido entre los 380 nm y los 780 nm (rango del espectro visible de la luz). Datos de absorbancia medidos en Espectrofotómetro Genesys 10S UV vis83



1. RESUMEN

Colobanthus quitensis (Caryophyllaceae) posee una amplia distribución geográfica que se adapta a una variedad de hábitats adversos, siendo un sistema modelo interesante para el estudio de la tolerancia a condiciones adversas. Además, se considera una especie modelo para estudios en estrés abiótico. Debido a la limitada accesibilidad a sus hábitats, es necesario establecer protocolos de propagación y conservación en un banco de germoplasma activo *in vitro*. El objetivo de este trabajo fue el establecimiento de protocolos para la conservación *in vitro* a corto plazo en condiciones de crecimiento mínimo de dos poblaciones de *C. quitensis*, evitando daños fisiológicos a largo plazo. Se utilizaron explantes de plántulas de poblaciones de Arctowski (pA) y Conguillio (pC) establecidas *in vitro*. Esta investigación se dividió en cuatro etapas: 1) tipos de sellado, 2) número de explantes en combinación con la concentración de sales y minerales en el medio basal, 3) adición de agentes osmo-reguladores y 4) cobertura de frascos con papel celofán como filtro de luz roja y naranja; que modulan el desarrollo morfo-fisiológico. La combinación de los factores que regulan el crecimiento vegetativo y la fisiología vegetal tuvieron un efecto positivo en la disminución de la longitud de foliar y radicular, amarillamiento foliar (%) y número de brotes nuevos. La eficiencia fotosintética se mantuvo en un rango óptimo para cultivo *in vitro*. Los mejores resultados fueron: tapas de film plástico (etapa 1), 50% MS y 12 explantes por frasco (etapa 2), 6% sorbitol en pA y 4% sorbitol en pC (etapa 3) y uso de filtro naranja (pC) y color rojo en pA (etapa 4). El contenido de pigmentos fotosintéticos fue mayor y varió al usar filtros de color en comparación al no uso de ellos. El cultivo fue realizado exitosamente por 90 días con crecimiento mínimo al final de la etapa 4.

1.1 ABSTRACT

Colobanthus quitensis (Caryophyllaceae) has a wide geographical distribution that adapts to a variety of adverse habitats, being an interesting model system for the study of tolerance to adverse conditions. In addition, it is considered a model species for studies in abiotic stress. Due to the limited accessibility to their habitats, it is necessary to establish propagation and conservation protocols in an active germplasm bank *in vitro*. The objective of this work is the establishment of protocols for short-term *in vitro* conservation under conditions of minimum growth of two populations of *C. quitensis*, avoiding long-term physiological damage. Seed explants from Arctowski (pA) and Conguillio (pC) populations established *in vitro* were used. This investigation was divided into four stages: 1) types of sealing, 2) number of explants in combination with the concentration of salts and minerals in the basal medium, 3) addition of osmo-regulatory agents and 4) covering the bottles with cellophane paper. as a red and orange light filter; that modulate morpho-physiological development. The combination of the factors that regulate vegetative growth and plant physiology had a positive effect on the reduction of leaf and root length, leaf yellowing (%) and number of new shoots. Photosynthetic efficiency has maintained in an optimal range for *in vitro* culture. The best results were: plastic film caps (stage 1), 50% DM and 12 explants per bottle (stage 2), 6% sorbitol in pA and 4% sorbitol in pC (stage 3) and use of orange filter (pC) and red color in pA (stage 4). The content of photosynthetic pigments was higher and varied when using color filters compared to not using them. The culture was successfully carried out for 90 days with minimal growth at the end of stage 4.

2. INTRODUCCIÓN

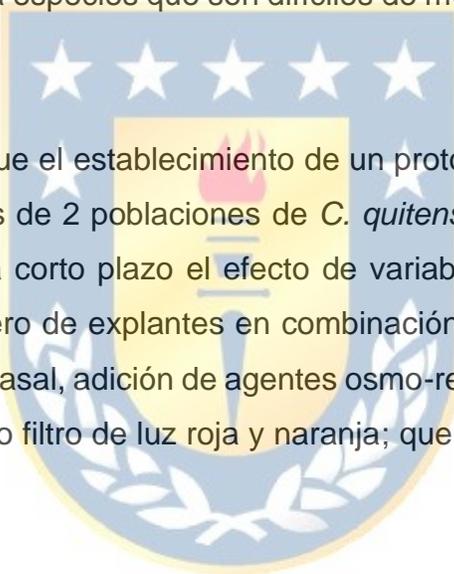
Colobanthus quitensis (Kunth) Bartl. es la única dicotiledónea, que junto a *Deschampsia antarctica* Desv., han colonizado naturalmente la Antártica. Ambas especies, a lo largo del tiempo, han incrementado su dispersión en toda la costa oeste de la Península Antártica (Grobe *et al.* 1997). *C. quitensis* tiene una amplia gama de distribución en áreas donde el acceso es difícil durante gran parte del año (Cuba-Díaz *et al.* 2019). Algunos de los lugares donde se encuentra son las islas subantárticas de Georgia del sur, Orcadas del sur, Shetland del sur y por la costa oeste de la Península Antártica (Moore 1970), además de los Andes de Chile central hasta el sur de México (Smith 2003). Estos sitios de clima frío, presentan condiciones abióticas hostiles para el desarrollo de plantas vasculares dados los fuertes vientos, suelos pobres en materia orgánica y elevados niveles de radiación fotosintéticamente activa (PAR) y ultravioleta-B (UV-B) (Green *et al.* 2007).

La capacidad de *C. quitensis* de tolerar condiciones abióticas tan adversas hacen considerarla como una planta de interés para estudios sobre mecanismos ecofisiológicos y moleculares de tolerancia al estrés abiótico. Para llevar a cabo dichos estudios con esta especie, es prioritario garantizar un buen estado a nivel fisiológico por períodos de tiempo extensos (superiores a 90 días), lo cual, ha constituido un desafío en laboratorio. El cultivo *in vitro* de esta especie y la conservación por un periodo de tiempo (superior a 30 días) permiten mantener material vegetal en condiciones de crecimiento lento, pero, en consecuencia, con presencia de clorosis en tejidos foliares, los cuales aumentan directamente con la cantidad de tiempo de conservación (Cuba-Díaz *et al.* 2014).

Una conservación *in vitro* no es eficiente cuando se dan altas tasas de crecimiento, ya que requieren de una supervisión recurrente. Debido a esto, se han realizado investigaciones para reducir las tasas de crecimiento al disminuir la concentración del medio de cultivo, la calidad de luz y el uso de distintos materiales de sellado que permitan controlar el entorno físico (Withers, 1991). Respecto a lo anterior, el control en el balance del intercambio de gases es una forma de retardar el crecimiento, además de agregar agentes osmo-reguladores (como azúcares o polioles) al medio de cultivo (Cha-Um y Kirdmanee 2007). La calidad y cantidad de luz, en condiciones *in vitro*, proporciona

energía y estímulo para la morfogénesis y la diferenciación de los tejidos cultivados (Yeong *et al.* 2006). También, el material vegetal se puede mantener con éxito en el mismo medio de cultivo durante uno a cinco años, según la especie y el método utilizado (Reed *et al.* 2004). Respecto a este tema, se han logrado preservar, mediante cultivo *in vitro*, especies de plantas de interés ornamental y medicinal; mediante métodos de crecimiento lento, como brotes de *Dianthus caryophyllus* (Winarto *et al.* 2004). Una estrategia de la conservación es la creación de un banco de genes/ADN, semillas y germoplasma; una herramienta útil, cuando se realizan estudios genéticos, de respuesta al cambio climático y de población, entre otros, además de proporcionar una fuente constante de material vegetal para especies que son difíciles de muestrear (Cruz-Cruz *et al.* 2013).

El objetivo de esta investigación fue el establecimiento de un protocolo de conservación *in vitro* a corto plazo de explantes de 2 poblaciones de *C. quitensis*, a partir de plantas cultivadas *in vitro*, evaluándose a corto plazo el efecto de variables físicas y químicas como son: tipos de sellado, número de explantes en combinación con la concentración de sales y minerales en el medio basal, adición de agentes osmo-reguladores y cobertura de frascos con papel celofán como filtro de luz roja y naranja; que modulan el desarrollo morfo-fisiológico.



3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Colobanthus quitensis*, clavelito antártico

Colobanthus quitensis (Kunth) Bartl. perteneciente a la familia Caryophyllaceae, es una de las dos especies de plantas vasculares nativas que colonizaron la Antártida marítima. Tiene una amplia distribución que varía de 17° N (México) a 68° S (Península Antártica) y rangos de altitud de 0 a 4200 msnm (metros sobre el nivel del mar) (Smith 2003). Su anatomía foliar es típica de xerófitos con mesófilos gruesos, estomas pequeños y cutículas cerosas (Mantovani y Vierira 2000). Es auto-compatible y muchas veces se autopoliniza, considerándose Cleistógama (Moore 1970). Esta especie crece en forma de esteras o cojines compactos, llegando a medir varios centímetros. Alcanza una altura mínima de 1,5 cm y una altura máxima de 8 cm aproximadamente (Smith 2003). Existe una relación entre el tamaño del cojín y la edad de la especie, sugiriendo que *C. quitensis* alcanza una fase madura, cuando el cojín mide entre 40 y 70 mm aproximadamente (Edwards 1975).

Se han descrito varias poblaciones de esta especie, entre las cuales se encuentran las poblaciones Arctowski (pA) situada en un área cercana a la base polaca Henry Arctowski en la isla Rey Jorge (62°09'S; 58°28'W), islas Shetland del Sur en la Antártica marítima; y las poblaciones Conguillío (pC) ubicada en el Parque Nacional Conguillío (38°36'S; 71°36'W) en la Región de la Araucanía de Chile. *Colobanthus quitensis* pA crece a una altitud de 3-23 msnm, bajo una estable temperatura (-2 a 6 °C) y expuestas a bajas PPFD (densidades de flujo de fotones fotosintéticos) y un par de días con altos PPFD (2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Durante la etapa de crecimiento de esta especie, la Antártica está bajo episodios frecuentes de alta intensidad lumínica y un fotoperíodo más extenso que en hábitats andinos. *C. quitensis* está expuesta a fluctuaciones ambientales que pueden impulsar la plasticidad fenotípica (capacidad de un organismo individual para alterar su fisiología/morfología en respuesta a los cambios en las condiciones ambientales) (Pigliucci *et al.* 2006) y una amplia diferenciación genética entre las poblaciones, a lo largo de su gradiente de distribución (Cuba-Díaz *et al.* 2017b). Algunas de las características de supervivencia de *C. quitensis* en los lugares que habita, son atribuidas

a que posee una arquitectura foliar interna con tejidos escleróticos (protección contra el viento), mesófilo grueso sin fibras y hojas muy lignificadas de hasta 225 μm de espesor, además de una baja estatura de plantas y un metabolismo fotosintético, contribuyentes para una exitosa supervivencia en la Antártida (Mantovani y Cardoso 2000).

Ambas poblaciones de *C. quitensis* (pC y pA) han sido objeto de varios estudios, como por ejemplo; se observó los mecanismos de tolerancia (bioquímicos y morfo-fisiológicos) a diferentes concentraciones de iones de cobre: 0 μM (control), 100 μM y 500 μM en plántulas de ambas poblaciones cultivadas *in vitro* por 90 días, y se concluyó que la población pC no se vio afectada por los iones Cu^{+2} , como ocurrió con pA, con una alta tasa de crecimiento relativo, ausencia de clorosis y bajo número de ápices (Marín 2015). Se evaluaron las respuestas morfo-fisiológicas de poblaciones de *C. quitensis* por NaCl (control sin sal, 50 mM y 150 mM), frío (control a 14°C y tratamiento a 4°C) e iones cobre (control sin cobre, 100 μM y 500 μM). Estas poblaciones presentaron diferentes estrategias de tolerancias al estrés, no siendo afectadas por los diferentes tratamientos salinos, pero, en consecuencia, se generó una acumulación de azúcares solubles totales y sacarosa en hojas. *C. quitensis* pA presentó una respuesta de tolerancia mayor que pC, a la disminución de la temperatura, pero cuando ambas poblaciones fueron expuestas a iones cobre, su capacidad antioxidante no se vio afectada (Arriagada 2017).

Otro estudio relacionado con el desarrollo de plántulas *in vitro* y la exposición a un estrés salino, fue realizado en las 3 poblaciones de *C. quitensis*: La Marisma (pPA), La Parva (pPar) y Conguillío (pC), cultivadas en 3 medios MS con 3 diferentes concentraciones de NaCl 0 mM (control), 50 mM y 100 mM. Los resultados mostraron que *C. quitensis* pC, en comparación a las otras poblaciones, presentó un crecimiento normal independiente de la presencia o ausencia del NaCl, pero se observó que hubo un aumento de la concentración de prolina en comparación al tratamiento control y una disminución del contenido de pigmentos fotosintéticos al aumentar la concentración de sal (Castel 2015). También para optimizar algunos parámetros críticos en la propagación *in vitro* de *C. quitensis* pC, pA y Laredo (pL), y otras especies nativas y no nativas, respecto de la sanidad vegetal, se probaron 3 agentes desinfectantes a

diferentes concentraciones y períodos de lavado con los explantes, antes de ser puestos en el medio de cultivo. Como control se usó hipoclorito de sodio y como tratamientos hipoclorito de calcio, nitrato de plata y nanopartículas de plata. Los resultados mostraron que, la contaminación se redujo utilizando hipoclorito de calcio para las poblaciones de *C. quitensis* pA y pC; siendo recomendado el uso de 100 mg mL^{-1} durante 15 minutos. En pA, se observó una mayor disminución en el porcentaje de contaminación de explantes, y también una disminución en el porcentaje de aparición de flores (síntoma de estrés en cultivo *in vitro*). Para pC, aunque hubo una disminución en la contaminación, se recomendó realizar más estudios (Cuba-Díaz *et al.* 2020). También, para optimizar algunos parámetros críticos en la propagación *in vitro* de *C. quitensis* pC relacionados con aspectos físicos y químicos. Los tratamientos fueron uso de Tiosulfato de plata (STS) en medio MS a concentraciones de $0 \text{ } \mu\text{M}$ (control), $1 \text{ } \mu\text{M}$, $10 \text{ } \mu\text{M}$ y $30 \text{ } \mu\text{M}$, distintas concentraciones de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal: 1.0, 0.5 y 0.25 mg L^{-1} para AIA y BAP; y kinetina (2.0 mg L^{-1}), y la exposición a diferentes intensidades lumínicas 28 ± 0.5 , 45 ± 2 y $72 \pm 2 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Los resultados mostraron que, la población pC en presencia de una intensidad lumínica de $45 \pm 2 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y un medio que contenía AIA 0.25 mg L^{-1} , BAP 0.5 mg L^{-1} y STS $10 \text{ } \mu\text{M}$, mostró un menor porcentaje de amarillamiento foliar, y muerte de plántulas, además de una mayor regeneración de brotes y raíces (Acuña 2014).

3.2 Conservación *in vitro* del germoplasma

La conservación de germoplasma *in vitro* es una herramienta auxiliar utilizada en la conservación de los recursos genéticos, especialmente para la propagación vegetativa asexual (Ferreira 2011). Esta conservación utiliza el germoplasma, que es una fuente de información *in vivo* para todos los genes presentes en la planta respectiva, la cual puede conservarse durante cortos períodos (meses) y regenerarse para ser propagada (Mathur 2013). La unidad a conservar que se mantiene en condiciones controladas, puede ser la semilla botánica o explantes vegetativos, dependiendo principalmente del hábito de crecimiento de la especie (Wang *et al.* 2005; Tyagi *et al.* 2007). Debido a que los esfuerzos para el desarrollo de protocolos de germoplasma de relevante importancia

científica se basan en la utilización de los recursos genéticos, es imperativo garantizar la conservación y el acceso a la más amplia gama de diversidad genética, junto con la información genotípica y fenotípica necesaria para el uso eficaz de estos recursos (Khoury *et al.* 2014). La conservación *in vitro* se puede clasificar, según su duración en corto, mediano y largo plazo. En el primer tipo (germoplasma permanece *in vitro* hasta por 12 meses) y segundo tipo (de 12 meses a 5 años, dependiendo del material vegetal), generalmente se utilizan técnicas de cultivo *in vitro* que fomentan el crecimiento reducido, controlándose las condiciones de cultivo para retrasar el crecimiento y aumentar los intervalos de tiempo entre subcultivos. En el último tipo (almacenándose por más de 5 años) se utiliza principalmente la crioconservación (Keller *et al.* 2006; Cousins y Adelberg 2008). La alternativa a utilizar dependerá de la capacidad tecnológica, infraestructura disponible, objetivos de conservación y la naturaleza de las especies a conservar (Elias 1998). Las colecciones de plantas vivas pueden ser afectadas por enfermedades, plagas y catástrofes naturales. Además, pueden verse siniestradas por influencia antropogénica, que en consecuencia favorecen la erosión genética (Zhang *et al.* 2014). Es por lo anterior que, la conservación *in vitro* implica el mantenimiento de explantes en un entorno estéril y libre de patógenos, que se utiliza ampliamente para la conservación de especies, como las que producen semillas recalcitrantes (Engelmann 1997). Esta conservación *in vitro* tiene importantes implicaciones ecológicas, ya que desempeña un papel clave en los procesos de dinámica de poblaciones (al estudiar las variables que influyen en el flujo de individuos de dicha población), en la regeneración del germoplasma para su restauración ecológica o para crear bancos de germoplasma (Pereira *et al.* 2016). El mantenimiento *in vitro* de material genético, ya sea para la conservación o la producción de plantas, requiere cambios frecuentes en los medios de cultivo que pueden variar según el objetivo del laboratorio. Esta rutina operativa exige una estructura adecuada, un consumo de medio de cultivo y, mano de obra calificada (Tavazza *et al.* 2015), volviéndose costosa operacionalmente, ya que requiere de una gran cantidad de mano de obra y condiciones de crecimiento controladas (Sarasan *et al.* 2006).

3.2.1 Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma

Las estrategias de conservación de germoplasma, según el lugar de ejecución, pueden ser *in situ* y *ex situ*, siendo tecnologías bien conocidas para preservar la diversidad de las plantas y para poder establecer programas de conservación efectivos. Uno de los métodos útiles de la conservación *ex situ* para una diversidad de plantas es el cultivo *in vitro* (Fay 1994). Los métodos de conservación *in vitro* se pueden agrupar en dos categorías: los métodos basados en el crecimiento mínimo del germoplasma cultivado *in vitro*: frigo-conservación y encapsulación refrigerada, que permiten la conservación del material a mediano plazo, y el método basado en un crecimiento casi nulo: la crioconservación, que permite la conservación del material vegetal a largo plazo (Bhojwani y Dantu 2013). Ejemplos de variables que son controladas para disminuir el crecimiento *in vitro* son la reducción de la temperatura, la modificación de la concentración de los nutrientes del medio y sus componentes, el uso de reguladores osmóticos, material de sellado de frascos, entre otros (Chandel y Pandey 1991). Además del uso de reguladores osmóticos, los reguladores de crecimiento también son usados para la conservación de germoplasma *in vitro*, siendo el ácido abscísico (ABA) uno de los más utilizados (Engelmann 1998). La frigo-conservación es un método de conservación de colecciones *in vitro* a mediano plazo en la que se consigue ralentizar el crecimiento mediante el empleo principalmente de bajas temperaturas, ya que así disminuye la tasa de crecimiento de las plantas y se prolonga el ciclo celular (Xia *et al.* 2009). La técnica de encapsulación refrigerada es un método que permite la conservación de una porción de tejido vegetal derivado del cultivo *in vitro*. Las secciones encapsuladas en alginato de sodio, alginato de potasio, carboximetil celulosa o Gelrite, son conservadas a bajas temperaturas y no requieren de transferencia a un medio fresco (West *et al.* 2006). Por otra parte, la crioconservación es un método para preservar germoplasma a temperaturas extremadamente bajas, generalmente la del nitrógeno líquido (-196 °C), un desafío, al llevar los tejidos al punto de congelación sin la formación de cristales de hielo (Engelmann 2011). Esta técnica garantiza la conservación segura y a largo plazo de diferentes tipos de germoplasma (Engelmann 2004). Este procedimiento tiene la ventaja de que garantiza la viabilidad de preservar el material en espacios pequeños, protegido de la

contaminación y con mantenimiento mínimo, siendo una desventaja su alto costo económico (Wang *et al.* 2011). Es una alternativa para preservar las especies que se mantienen en colecciones de campo, jardines botánicos o reservas naturales (Prudente *et al.* 2015).

3.2.1.1 Tapas de sellado

Un método influyente en el almacenamiento, es el sellado de los recipientes de cultivo *in vitro*, el cual protege al medio en los frascos y al explante de infecciones microbianas, evitando la evaporación excesiva del agua del medio de cultivo y la deshidratación de los explantes. El tipo de cierre del frasco de cultivo afecta a la composición gaseosa interna (Lentini *et al.* 1988) y al crecimiento de las plantas en el cultivo, como la elongación y proliferación de los brotes, el aumento del peso fresco y los procesos de degradación hiperhidráulica (McClelland y Smith 1990). Los tejidos de plantas cultivadas *in vitro* producen compuestos gaseosos (dióxido de carbono, etileno, etano, etanol y acetaldehído) que pueden acumularse en sistemas de cultivo semicerrados y cerrados (herméticos). El micro entorno gaseoso (Kumar *et al.* 1998) y, en particular, el tipo de cierre del frasco puede afectar fuertemente la morfogénesis y el crecimiento de los cultivos de plantas (Marino y Noferini 2013), así como la fisiología y morfología de brotes (Zobayed *et al.* 1999). Según Cuba-Díaz *et al.* (2014), en frascos *in vitro* con plantas de *Colobanthus quitensis* cubiertos con papel aluminio, permitió solo observar un 25% de amarillamiento en hojas, sin pérdidas en la turgencia del medio de cultivo ni en el tejido de las plántulas.

3.2.1.2 Concentración de sales en el medio basal

El medio basal es una solución nutritiva sólida, semi o líquida para el crecimiento de tejido vegetales y desempeña un papel crucial en la multiplicación y regeneración *in vitro* de plantas (Ramsay *et al.* 2003). En un medio basal de cultivo *in vitro*, la concentración del medio influye en la absorción de todos los macronutrientes, micronutrientes y vitaminas por efecto del cambio de la fuerza iónica. Por lo tanto, el efecto de diferentes resistencias en el medio también podría afectar la organogénesis de la planta *in vitro* (Rezali *et al.*

2017). La disminución de la concentración de sales en el medio de cultivo (la reducción de la absorción de nutrientes responsables del crecimiento y desarrollo), también se puede utilizar como una estrategia para reducir el crecimiento de las plantas (Engelmann 1991). En el estudio realizado por Mukherjee *et al.* (2010), demostraron que la proliferación de brotes de portainjertos de uva se incrementó cuando fue cultivada en presencia de la mitad de la concentración de nutrientes del medio basal. De hecho, para *Epidendrum chlorocorymbos*, la reducción de las sales del medio de cultivo a un 50% proporcionó un crecimiento lento, pudiéndose almacenar por 4 meses (Lopez-Puc 2013).

3.2.1.3 Densidad de plantas cultivadas *in vitro*

La competencia entre plantas en una situación de cultivo está bien documentada (Healy y Lang 1985), sin embargo, existe carencia de publicaciones sobre el efecto de la densidad de individuos cultivados *in vitro*, en la competencia por el aprovechamiento de los macro y micronutrientes en el medio de cultivo. Se ha sugerido que la disponibilidad de nutrientes es un factor primordial, ya que según Lumsden *et al.* (1990), reducir el número de explantes (desde 20 a 10, 5 y 1 por tubo) de *Hemerocallis* en los recipientes de cultivo aumentó significativamente las tasas de absorción de nutrientes, siendo 10 plantas la con mayor tasa. La morfogénesis en plantas se ve afectada por cambios en la proporción de volumen del explante y medio de cultivo, además del tamaño de los frascos (Cousson *et al.* 1989). El espacio interno disponible en los frascos tiene un efecto significativo sobre el desarrollo *in vitro* de explantes (Assis *et al.* 2012). Esto se puede explicar debido a que en los tratamientos donde se encuentran bajas densidades de explante, la transpiración es menor, lo que conlleva una menor humedad relativa, aumentando la formación de brotes, pero con un menor crecimiento foliar (Chen 2004). Boullani *et al.* (2017) demostraron que en *Cynara cardunculus*, a una densidad de 7 explantes en 132 cm² de área de cultivo *in vitro*, disminuyó significativamente la tasa de multiplicación de los brotes de 6.57 a 2.33 brotes. Esto sugiere que, altas densidades de explantes generan plántulas con una menor producción de brotes, siendo una variable favorable para un crecimiento mínimo.

3.2.1.3 Concentración de agentes osmoreguladores

Las fuentes de carbono son vitales en plantas, ya que ejercen parcialmente su efecto sobre el crecimiento y la morfogénesis, y en parte a través de su potencial osmótico variable, que influye en la velocidad de división celular o el grado de morfogénesis de las células (Sotiropoulos *et al.* 2006). Estas fuentes de carbono desempeñan una función en las rutas síntesis en plantas, actuando como bloques de construcción de macromoléculas y controlando algunos procesos de desarrollo en la célula (Du Toit *et al.* 2004; Karami *et al.* 2006). Son de gran importancia para la morfogénesis *in vitro*, un proceso que requiere alta energía (Calamar y De Klerk 2002). La adición de agentes osmoreguladores u osmóticos, han demostrado ser una herramienta importante para prolongar el período de subcultivos (Rajasekharan y Sahijram 2015). Dentro de los reguladores osmóticos más usados, se encuentran la sacarosa, sorbitol y manitol, los cuales actúan como retardantes del crecimiento al causar estrés osmótico en el material bajo conservación. Cuando se agregan al medio de cultivo, estos carbohidratos reducen el potencial hídrico y restringen la disponibilidad de agua a los explantes (Fortes y Scherwinski-Pereira 2001; Shibli *et al.* 2006). El cambio de la fuente de carbono puede tener un efecto positivo/negativo en la tasa de crecimiento de raíces y brotes. Los carbohidratos alternativos son polioles (una forma hidrogenada del carbohidrato) como el sorbitol, glicerol, manitol (Demo *et al.* 2008). La inclusión de polioles inertes y no metabolizables, manitol y sorbitol en el rango de 3 a 6% (p/v), restringió el crecimiento de plantas de la familia Rosaceae preservadas *in vitro*. El sorbitol sirve como un fotosintato primario, y como sustancia de translocación y almacenamiento en plantas (Wallaart 1980).

3.2.1.4 Calidad de la luz

Como una fuente de energía, la luz visible emite radiación electromagnética con longitudes de onda de 400 a 700 nm. La naturaleza ha producido varias moléculas receptoras de luz, que permiten a los organismos responder a los cambios en el entorno de la luz natural. Los cambios en la calidad de la luz (longitudes de onda) influyen en diversos procesos fisiológicos y en el rendimiento de los cultivos *in vitro*, pero varían las

respuestas a estos cambios, según la especie y la etapa de desarrollo o el órgano estudiado (He *et al.* 2017). La luz es uno de los factores más influyentes que pueden cambiar el metabolismo secundario de las plantas, a través de un efecto estimulante sobre la biosíntesis de los compuestos fenólicos al influir en la actividad de la enzima fenilalanina amoniaco-liasa (PAL), que cataliza el primer paso de la vía general del fenilpropanoide, el cual se encuentra ligado a la producción de algunos metabolitos, como los flavonoides, cumarinas y fitoalexinas (Engelsma 1974; Lefsrud 2008). Las plantas utilizan la luz como fuente de energía en el proceso fotosintético y responden de acuerdo con la intensidad, la calidad y la duración de la luz (Muneer *et al.* 2014). Para adaptarse a su entorno, las plantas perciben las condiciones de luz ambiental (intensidad o calidad) y cambian sus procesos de desarrollo utilizando una serie de fotorreceptores, tales como los fitocromos, criptocromos y las fototropinas (Smith 2000; Christie y Briggs 2001). Los fotorreceptores fitocromáticos (proteínas con actividad cinasa) detectan la relación de luz roja:rojo lejano (R:FR). Dentro de éstos, el fitocromo B (phyB) es el regulador clave para evitar la sombra en respuesta a la baja proporción de R:FR (siendo FR superior a R, en dicha condición). Posee 2 estados conformacionales, en cual uno se activa a Pfr (su estado activo) por la luz R y se inactiva a Pr (su estado inactivo) por la luz FR. Los fitocromos, regulan diferentes procesos a lo largo del ciclo de vida de la planta como la desetiología de las plántulas, el crecimiento radicular (Costigan *et al.* 2011) y la tolerancia a factores de estrés bióticos y abióticos (Ballaré *et al.* 2012). El cambio en la composición espectral de la luz afecta el crecimiento y la morfogénesis, el contenido de clorofila, la sacarosa, el almidón, la acumulación de azúcar soluble, así como el tamaño y el número de estomas en las hojas de plantas cultivadas *in vitro* (Dutta Gupta y Jatothu 2013; Liu *et al.* 2014). Cuando las plantas se exponen a un ambiente luminoso con una baja relación rojo/rojo lejano o una luz verde alta, muestran respuestas de evitación de la sombra (Carvalho *et al.* 2016). Las fuentes emisoras de luz roja, en combinación con otras longitudes de onda o por separado, generan un aumento de la acumulación de antioxidantes fenólicos en plantas (Pedroso *et al.* 2017). Estudios sobre el uso de diferentes espectros de luz en brotes de *Cattleya hybrid* sugirieron que el crecimiento, la diferenciación, la morfogénesis y otras actividades fisiológicas dependen en gran medida de los espectros de luz (Cybularz-Urban *et al.* 2007), como son la luz azul, la cual

desempeña un papel clave en el alargamiento del tallo, el control estomático, el movimiento de agua y gases y la síntesis de clorofila (Cosgrove 1981; Tripathy y Brown 1995). El crecimiento de hojas bajo luz roja, disminuyó el contenido de clorofila en los cultivos de orquídeas *Cymbidium* (Tanaka *et al.* 1998). Las especies pueden ser de esta manera conservadas por períodos de seis meses a dos años sin subcultivo (Withers 1991).

Las variables antes mencionadas son fundamentales en el retardo del crecimiento de plantas *in vitro*. Por lo anterior, se propone que una posible combinación de la tapa de sellado de frascos, la concentración de medio basal, la densidad de plantas cultivadas, la concentración de osmoreguladores y la calidad de luz, podrían ser aplicables en la conservación *in vitro* del germoplasma.



4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La combinación controlada de factores físico-químicos (tales como: tipo de sellado de frasco, concentración de medio basal, número de explantes, osmo-reguladores y calidad de luz) en el cultivo *in vitro* de *Colobanthus quitensis* favorece la disminución del crecimiento sin afectar el desempeño fisiológico de la especie, lo que permitiría su conservación a corto plazo.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Establecer un protocolo de conservación *in vitro* a corto plazo de explantes de *Colobanthus quitensis* poblaciones Arctowski (pA) y Conguillio (pC), a partir de plantas cultivadas *in vitro*.

5.2 Específicos

- I. Evaluar el desempeño morfo-fisiológico de *C. quitensis* de las poblaciones Arctowski (pA) y Conguillio (pC) por efecto del: uso de tres tipos de tapas en el frasco de cultivo, la reducción en la concentración de sales/vitaminas en el medio basal en combinación con el número de explantes por frasco y la adicción de manitol, sacarosa o sorbitol en altas concentraciones.
- II. Determinar el desempeño morfo-fisiológico y pigmentos en *C. quitensis* de las poblaciones Arctowski (pA) y Conguillio (pC), cultivadas en frascos cubiertos con filtros de luz roja y naranja.



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material vegetal

Para llevar a cabo esta investigación se utilizaron 1440 plantas provenientes de 2 poblaciones de *Colobanthus quitensis* identificadas como población Arctowski (pA) y población Parque Conguillío (pC), obtenidas desde la colección *in vitro* del Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales, Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles. A partir de esta colección de plántulas se realizó una propagación del material vegetal, las cuales fueron mantenidas en cámara de crecimiento por 30 días hasta su regeneración (fig. 1a y c). A partir de estas plántulas, se obtuvieron “explantes” (fragmento vegetal) (fig. 1b y d) usados en los diferentes ensayos de cada una de las etapas de este estudio.



Figura 1. Plántulas de *Colobanthus quitensis* *in vitro*: población Arctowski (pA) a) plántula y b) explante (5 mm de longitud); población Conguillío (pC) c) plántula y d) explante (10 mm de longitud).

6.2 Preparación de medio basal

El medio con sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog 1967) fue utilizado en cada una de las etapas de esta investigación como medio basal, el cual fue complementado con

hormonas reguladoras del crecimiento vegetal BAP (bencil-amino-purina) 1 mg L^{-1} y AIA (ácido indol acético) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Además, se adicionó al medio una fuente de carbono: sacarosa (sac) al 3% y un gelificante: agar al 0,7% con un pH final de 5,7. Todos los medios fueron esterilizados en autoclave (Huxley® HL-340) a 121°C y 1 atm por 20 min. Una vez esterilizados y enfriados a una temperatura aproximada de 30°C , se le adicionó $10 \text{ }\mu\text{M}$ de STS (tiosulfato de plata), un inhibidor del efecto del etileno, según Cuba-Díaz *et al.* (2014), siendo homogenizado por agitación y dispensados 25 ml de medio por frasco de vidrio de 100 ml. Los frascos fueron sellados, rotulados y almacenados en oscuridad, hasta su posterior uso. Un total de 42 frascos fueron utilizados en cada etapa de acuerdo a las especificaciones descritas para cada una de ellas más adelante.

6.3 Preparación de explantes y condiciones de conservación

Bajo cámara de flujo laminar horizontal (Esco® AHC-2A1), se procedió a la preparación del material vegetal (explantes), para lo cual a cada plántula se le cortan las hojas y raíces hasta quedar con un fragmento que contenga ambos órganos de aproximadamente 5-7 mm (fig. 1b y d) y 5-10 mm (fig. 1a y c). Los explantes se colocan en forma vertical en los frascos de vidrio con medio basal de acuerdo al número de explante establecido en cada etapa (ver etapa 1, 2, 3 y 4), manteniéndose por separado y claramente identificadas cada una de las poblaciones (pA o pC). Los frascos fueron llevados a cámara de crecimiento durante 90 días en condiciones de fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad, temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una intensidad lumínica en un rango de $28\text{-}45 \text{ }\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, en el Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología, Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles. Todos los ensayos (etapas) fueron realizados en condiciones de asepsia.

6.4 Etapa 1 - Efecto del uso de diferentes tipos de tapas en frascos de vidrio

De acuerdo a las experiencias informadas en la literatura sobre el uso de diferentes tapas en la conservación de germoplasma *in vitro* (Inácio *et al.* 2011; Niino y Arizaga 2015), en esta etapa se sellaron los frascos de cultivo con 3 tipos de tapas: doble lámina de papel

aluminio (A), film de plástico transparente (P) (0.22 mm de espesor) y una tapa metálica (M) para conservas con hilo. Se usaron 55 explantes por población de *C. quitensis*.

6.5 Etapa 2 - Efecto por número de explantes y disminución de la concentración del medio basal

Además del medio control (MS 100%), se evaluaron dos tratamientos, uno con la disminución de la concentración del medio MS a un 50% (medio con $\frac{1}{2}$ de fuerza iónica) y otro con la disminución a un 25% (medio con $\frac{1}{4}$ de fuerza iónica). Los frascos de cultivo fueron sellados con Aluminio y se evaluó del número de explantes considerando el efecto de la tensión de la concentración del medio y el número de explantes, colocándose 7 (en 30 frascos), 9 (en 24 frascos) o 12 (en 18 frascos) en combinación con las diferentes concentraciones del medio basal (ver anexos figura 1). Se usaron 108 explantes por población de *C. quitensis*.

6.6 Etapa 3 - Efecto por aumento de la concentración de agentes osmo-reguladores en medio basal

Se utilizaron como tratamientos un medio basal con sac al 3% (control), sac al 6% (3% adicional a la concentración en el medio basal) y/o complementados con manitol (man) o sorbitol (sorb), a concentraciones de 4% o 6% (ver anexos figura 1). Se colocaron 9 explantes por población de *C. quitensis* en un $\frac{1}{2}$ de MS y se sellaron los frascos con "A". Se usaron 27 explantes (divididos en 3 frascos) por tratamiento y población de *C. quitensis*.

6.7 Curva de absorbancia de papel celofán

Con el propósito de usar papel celofán de colores cubriendo los frascos de cultivo como filtro para luz fotoactiva, previamente se midió la absorbancia de luz (Abs) de los papeles (usados como filtros de luz), de color rojo y naranja, con un espectrofotómetro Thermo Scientific® modelo Genesys 10S UV-vis. Para ello se usaron tres tubos de vidrio, uno sin cubrir (transparente) y dos cubiertos completamente con los dos colores de papel celofán

(fig. 2). Se midió la abs de ambos papeles en la longitud del espectro visible de la luz (380-780 nanómetros (nm)) y se registraron las Abs cada 10 nm. Con estos datos se realizaron las curvas de absorbancias de ambos papeles, para así, poder determinar la absorbancia de los fotones de luz que poseen los papeles de color, en las distintas longitudes de onda del espectro visible.

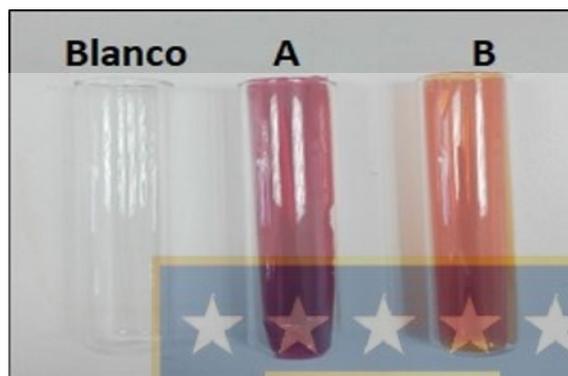


Figura 2. Tubos de vidrio para medición de absorbancia de luz por espectrofotometría cubiertos con papel celofán de color A) rojo, B) naranja. El tubo de vidrio sin cubrir fue considerada como blanco.

6.8 Medición de la intensidad lumínica a través de papeles filtro (Anexos 4)

En cámara de crecimiento, se midió la intensidad lumínica que los tubos fluorescentes emitían a los explantes, comprobando la intensidad de luz que las plantas recibían. Para ello, se recubrieron dos frascos (cada uno con un papel celofán de color) y mediante el uso de un fotómetro con sensor cuántico (Fieldscout® Lightscout quantum meter), ubicado en la posición de los frascos de vidrio, se midió la radiación fotosintéticamente activa (PAR, en μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), es decir, la densidad del flujo de fotones fotosintéticos (PPFD), que pasaba a través del papel celofán y llegan a los explantes. Los datos fueron tomados en 15 puntos del área de ubicación de los frascos, donde la intensidad lumínica debió fluctuar entre los 35 ± 2 y $45 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los datos fueron registrados y se calculó un promedio.

6.9. Etapa 4 – Efecto del recubrimiento de los frascos con papel celofán

Luego de ser medida la absorbancia y la intensidad lumínica a través de los papeles usados como filtros, se evaluó el efecto de estos sobre el desarrollo de los explantes de *C. quitensis* por recubrimiento de los frascos de cultivo. Se usaron ambos papeles celofán (rojo y naranja) siendo pegados sobre la superficie de vidrio de los frascos, evitando dejar espacios sin cubrir. Como control se consideraron frascos sin ser recubiertos. Las condiciones de cultivo fueron: 9 explantes por población de *C. quitensis* en $\frac{1}{2}$ de MS suplementado con sorbitol 6% (pA) y manitol 4% (pC), y sellado los frascos con "A". Se usaron 27 explantes (divididos en 3 frascos) por tratamiento y población de *C. quitensis*.

6.9.1. Obtención de extracto y separación e identificación de pigmentos

Para la extracción, separación e identificación de los diferentes pigmentos presentes en las muestras vegetales, se usaron plantas cultivadas por 90 días de la etapa 4. Estas muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas en papel aluminio a temperatura de -80°C . Luego las muestras fueron enviadas a para ser analizadas en un laboratorio externo (Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular Vegetal, Instituto de Agroindustria, Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile).

6.10 Evaluación del efecto morfo-fisiológico en los tratamientos

Se evaluó el efecto de los tratamientos en el desarrollo morfo-fisiológico de las plantas, para cada una de las etapas. Se midieron variables tales como: longitud radicular (mm) y longitud foliar (mm), número de brotes y número de ápices florares (unidad emergida). Los valores de las variables antes mencionadas fueron considerados beneficiosos para la conservación *in vitro*, cuando fueron menores). Se registró el peso fresco y peso seco (mg). Una vez extraídas las muestras desde los frascos, se limpió el medio de cultivo adosado en las raíces usando papel absorbente y se pesaron inmediatamente sobre una balanza analítica (A&D GF-400), siendo registrados los valores de peso fresco (Pf). Posteriormente y mediante un caliper (Kamasa), se realizó la medición del largo radicular, extendiendo dicho órgano y midiendo desde la división del tallo y el inicio de la raíz, y hasta el ápice radicular más largo. La longitud foliar fue medida por tensión del órgano,

desde la separación entre el inicio de formación de la raíz y el tallo, y hasta el ápice central del mismo. Para las etapas 1, 3 y 4, se midió la eficiencia cuántica máxima del PSII (Fotosistema II), evaluando con la variable F_v/F_m (Fluorescencia variable/máxima) y mediante el uso de un fluorímetro modelo Pocket PEA (Hansatech Instruments). Para esto, se seleccionaron al azar 15 plantas (5 por frasco de los tratamientos y población) y en 5 hojas de cada planta sacada, se cubrieron con pinzas por un periodo de 30 minutos (adaptándolas a oscuridad); a las cuales, luego del periodo de adaptación se les aplicó un pulso de luz saturante durante 1 segundo y se registraron los valores. Los valores que estuvieron entre 0.79-0.84, fueron considerados valores fotosintéticos normales (Bjorkman y Demmig 1987). El número de brotes se obtuvo mediante conteo de los brotes generados por cada explante y del total se obtuvo un promedio registrado en unidades de brotes producidas por población y tratamiento. Adicionalmente, otras variables como el porcentaje de amarillamiento en hojas y de supervivencia de las plantas fueron consideradas para determinar el estado del material vegetal, mediante observación del tejido. Se determinó si las plantas presentaban amarillamiento en hojas, mediante una escala: 0% (ausencia) a un 100%. Se determinó que las plantas demostraron sobrevivencia si presentaban daño (necrosis o pardeamiento) menor o igual a un 30% en hojas. Luego de realizarse todas las mediciones anteriores, el peso seco (P_s) se obtuvo después de 4 días de mantener las muestras (en sobres rotulados) en una estufa de secado a $37 \pm 0,2$ °C. Las muestras fueron pesadas en balanza analítica (AND G-400). El CRA (contenido relativo de agua) fue determinado en base al P_f y P_s . Se obtuvo mediante la ecuación $CRA = ((P_f - P_s) / P_f) * 100$ y el resultado expresado en porcentaje (Pieczyński *et al.* 2013), considerando un rango 20-40% como plantas deshidratadas y entre 50-70% como plantas con contenido de agua normal en hojas.

6.11 Diseño experimental y análisis estadístico

Esta investigación fue dividida en cuatro etapas y se usaron los resultados de la primera etapa y en adelante, como variable adicional en etapas posteriores. Todos los ensayos fueron completamente aleatorios, y realizados en triplicado. Para evaluar las diferencias estadísticas entre los tratamientos, se realizó un análisis de una vía (One Way ANOVA) para los ensayos del efecto de la adición de agentes osmo-reguladores y uso de filtros

de luz, mientras que los ensayos del efecto de sellado con tapa y la disminución del medio basal en combinación con el número de explantes, fueron mediante análisis de varianza factorial (ANOVA). En todos los ensayos se realizó una Prueba de Scheffé ($\alpha= 0,05$), utilizando el software STATISTICA versión 10.0 para el análisis de los datos y Sigma plot versión 12.1, para la elaboración de los gráficos. La curva de Abs de los papeles celofán fue realizada en Excel 2019 para Windows.



7. RESULTADOS

7.1 Etapa 1 - Evaluación del efecto por uso de diferentes tipos de tapas en el desarrollo morfo-fisiológico de *C. quitensis* pC

El uso de diferentes tapas no mostró diferencias en la longitud foliar de las plántulas de la población Conguillío (pC) de *C. quitensis*, pero se observó cierta tendencia a un menor crecimiento en las plántulas que crecieron en frascos con doble lámina aluminio (Fig. 3a). La longitud radicular tampoco se vio afectada por el uso de diferentes tapas, alcanzando promedios de 23 mm en frascos con tapas metálicas y 25 mm en frascos con tapas de doble lámina de aluminio y film de plástico, las cuales fueron significativamente superiores a las primeras (Fig. 3b).

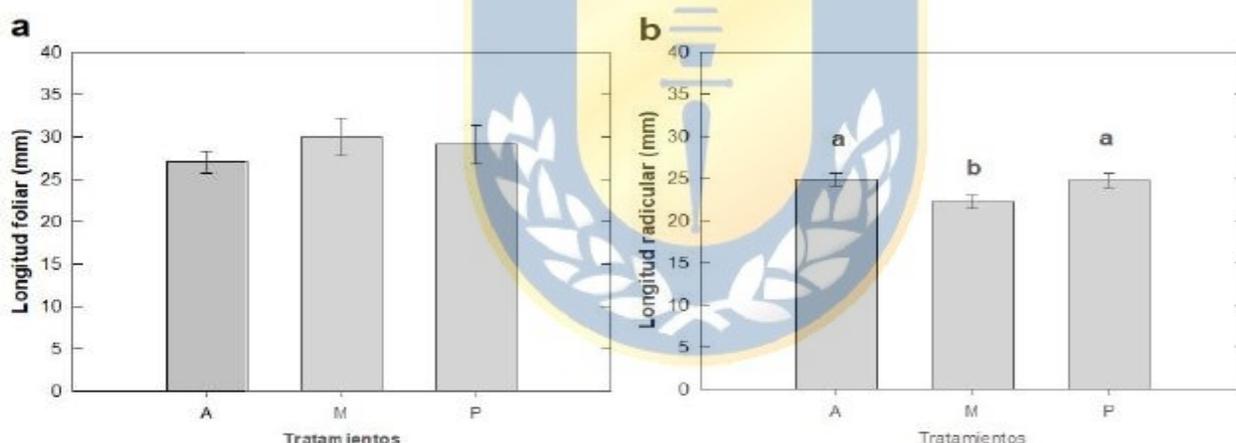


Figura 3. Efecto por el uso de diferentes tipos de tapas de sellado: metálica (M), doble lámina de papel aluminio (A) y film plástico (P) en **a)** la longitud foliar (Análisis no paramétrico, test Kuskal-Wallis $p \leq 0,05$) y **b)** la longitud radicular (letras diferentes indican diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$); de plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío (pC), después de 60 días de cultivo *in vitro*. Los tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

El uso de diferentes tapas favoreció la emergencia de nuevos brotes, sin diferencias entre el tipo de tapas, aunque en las tapas de doble lámina de aluminio y film de plástico se observó una tendencia hacia la menor formación de brotes (Fig. 4a). Existió desarrollo de

ápices florales en las plántulas que crecieron en frascos cubiertos por los 3 tipos de tapas, con una tendencia que estos se formaran en menor número en los frascos cubiertos por tapas metálicas y de film de plástico (Fig. 4b).

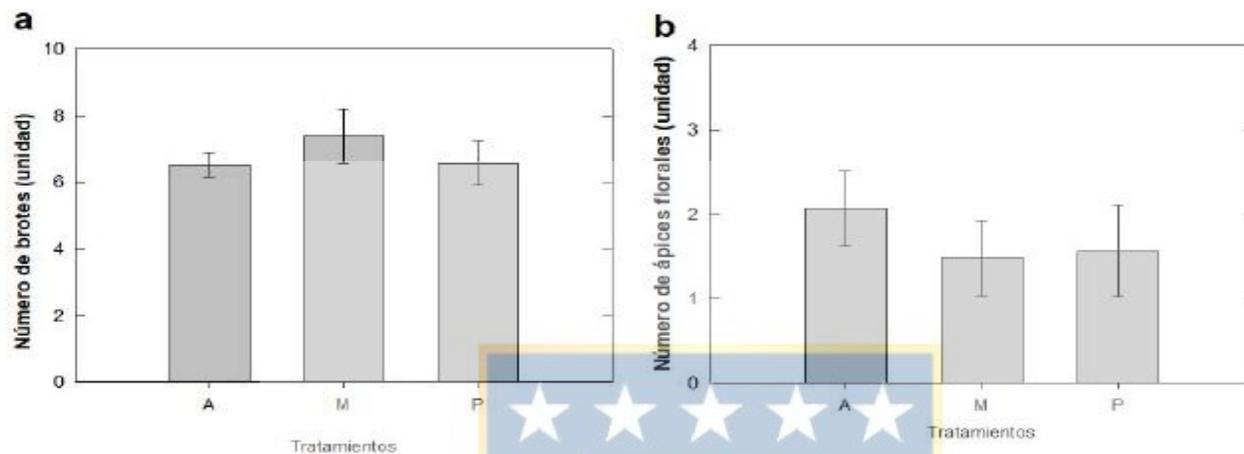


Figura 4. Efecto por el uso de diferentes tipos de tapas de sellado: metálica (M), doble lámina de papel aluminio (A) y film plástico (P) en **a)** el número de brotes y **b)** el número de ápices foliares; de plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío (pC), después de 60 días de cultivo *in vitro*. Los tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE). Análisis no paramétrico, test Kuskal-Wallis $p \leq 0,05$.

Después de 60 días de cultivo, las plántulas de pC, mantuvieron un buen estado fisiológico con valores de Fv/Fm en rangos apropiados, pero con diferencias entre los distintos tipos de tapas (Fig. 5a). Ninguna de las tapas evaluadas evitó el amarillamiento foliar, el porcentaje más bajo (59%) se observó en las plántulas que crecieron en frascos cubiertos con doble lámina de aluminio, pero sin diferencias con las plántulas cuyos frascos fueron cubiertos con film de plástico (68 %) (Fig. 5b).

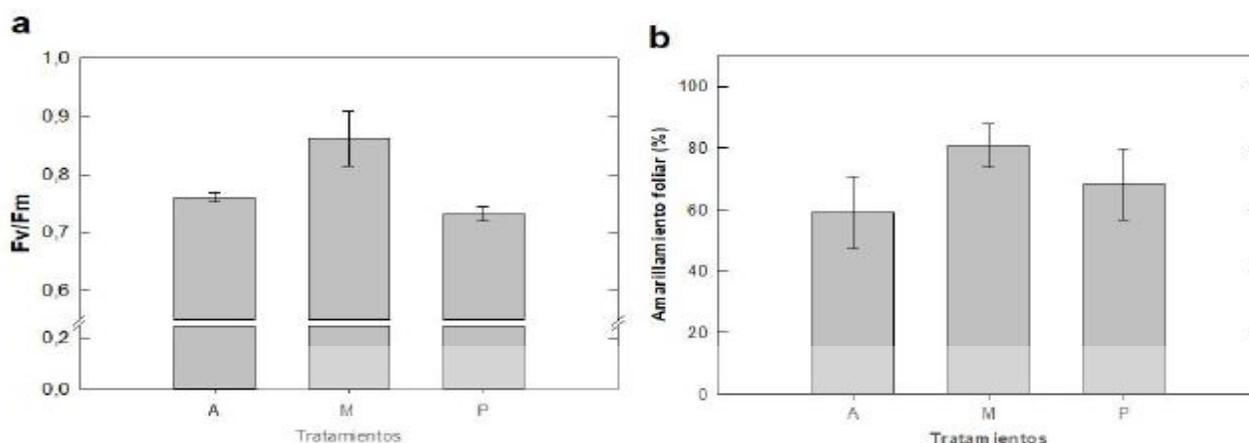


Figura 5. Efecto por el uso de diferentes tipos de tapas de sellado: metálica (M), doble lámina de papel aluminio (A) y film plástico (P) en **a)** la eficiencia cuántica máxima del PSII (fotosistema II) y **b)** el porcentaje de amarillamiento foliar; de plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío (pC), después de 60 días de cultivo *in vitro*. Los tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE). Análisis no paramétrico, test Kuskal-Wallis $p \leq 0,05$).

7.2 Etapa 1 - Evaluación del efecto por uso de diferentes tipos de tapas en el desarrollo morfo-fisiológico de *C. quitensis* pA

Las plántulas de la población Arctowski (pA), mostraron los mejores parámetros de crecimiento, longitud foliar y longitud radicular, cuando los frascos fueron tapados con film de plástico (Fig. 6), con diferencias estadísticas de las plantas que crecieron en frascos con los otros dos tipos de tapas. En cambio, en los frascos tapados con doble lámina de aluminio (A), se estimuló la proliferación de brotes (Fig. 7a) pero también el incremento del número de ápices florales (Fig. 7b). En los frascos cubiertos con film de plástico, si bien la proliferación de brotes fue baja, también se observó menor número de ápices florales.

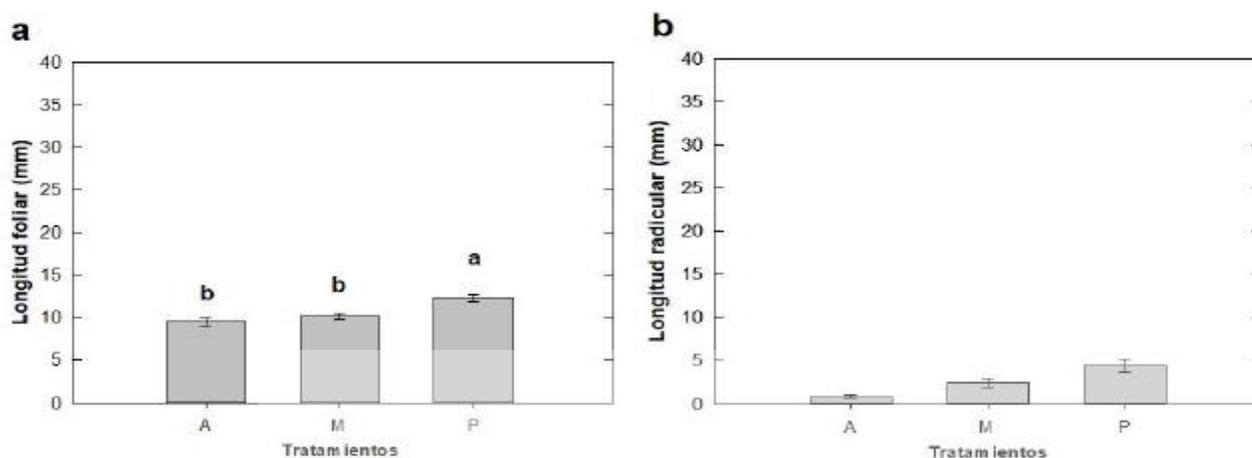


Figura 6. Efecto por el uso de diferentes tipos de tapas de sellado: metálica (M), doble lámina de papel aluminio (A) y film plástico (P) en **a**) la longitud foliar (letras diferentes indican diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$) y **b**) la longitud radicular (Análisis no paramétrico, test Kuskal-Wallis $p \leq 0,05$); de plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski (pA), después de 60 días de cultivo *in vitro*. Los tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

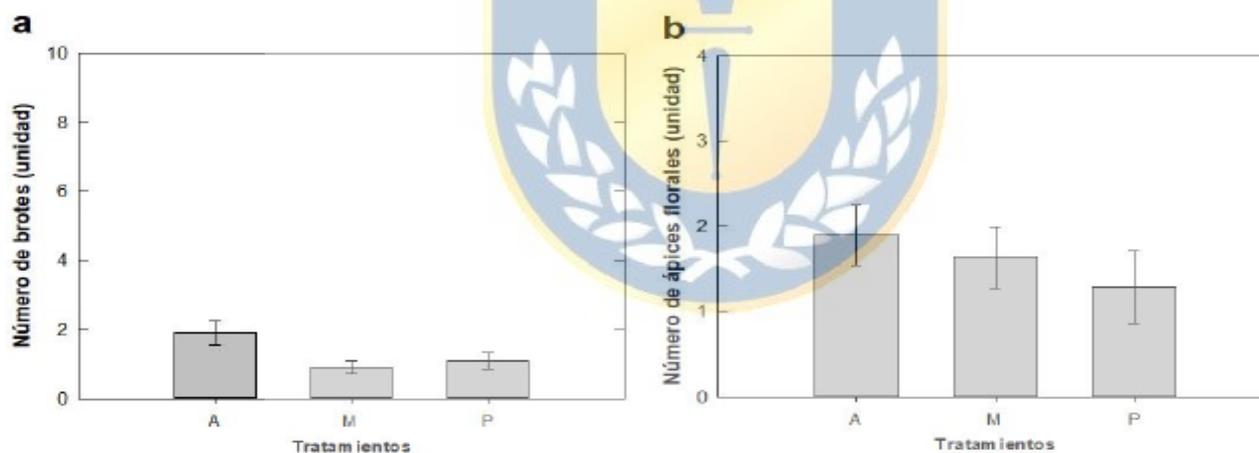


Figura 7. Efecto por el uso de diferentes tipos de tapas de sellado: metálica (M), doble lámina de papel aluminio (A) y film plástico (P) en **a**) el número de brotes y **b**) el número de ápices foliares; de plantas de *Colobanthus quitensis* población Artowski (pA), después de 60 días de cultivo *in vitro*. Los tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE). Análisis no paramétrico, test Kuskal-Wallis $p \leq 0,05$.

El uso de los tres tipos de tapas en los frascos de cultivo, no produjo efectos negativos en el desempeño fisiológico de las plántulas de la población Arctowski (Fig. 8a) pero no fueron capaces de evitar el amarillamiento foliar en estas mismas plántulas (Fig. 8b).

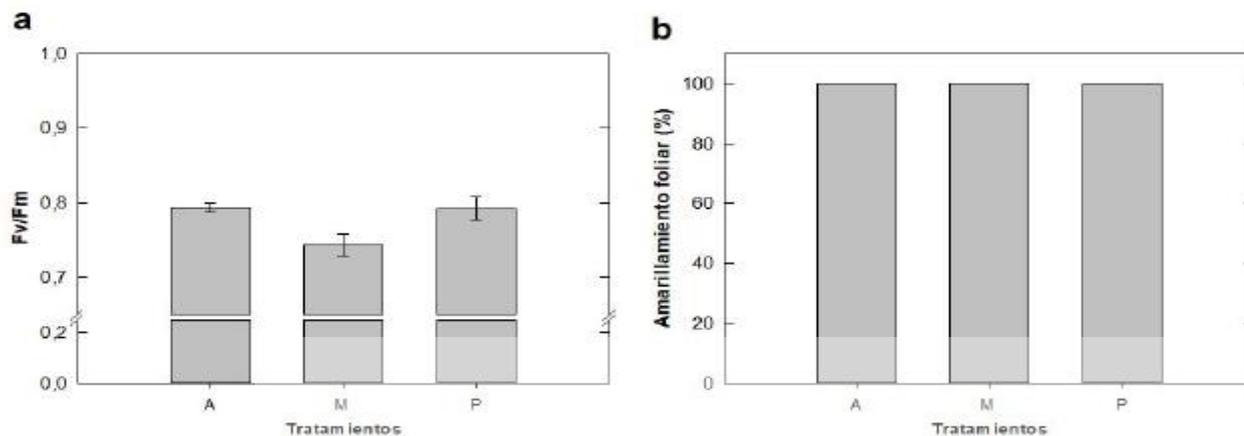


Figura 8. Efecto por el uso de diferentes tipos de tapas de sellado: metálica (M), doble lámina de papel aluminio (A) y film plástico (P) en **a)** la eficiencia cuántica máxima del PSII (fotosistema II) y **b)** el porcentaje de amarillamiento foliar; de plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski (pA), después de 60 días de cultivo *in vitro*. Los tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE). Análisis no paramétrico, test Kuskal-Wallis $p \leq 0,05$).

7.3 Etapa 2 - Análisis del efecto por número de explantes y disminución de la concentración de medio MS en el desarrollo morfo-fisiológico de *C. quitensis* pC

La disminución en el porcentaje de la concentración en el medio de cultivo basal MS (sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog), no afectó el desarrollo vegetativo de las plántulas de la población Conguillío (pC) (Fig. 9). El mayor desarrollo de longitud foliar y radicular se observó en las plántulas que crecieron en presencia del 100% de la concentración de MS recomendada, independientemente de la densidad de explantes dentro del frasco (Figs. 9 a y b - MS 100%). La densidad de explantes dentro del frasco de cultivo, sólo evidenció diferencias significativas en el desarrollo radicular en la concentración de 50% de las sales minerales y vitaminas de MS en las plántulas con una densidad de 12 plántulas por frascos (Fig. 9b - MS 50%).

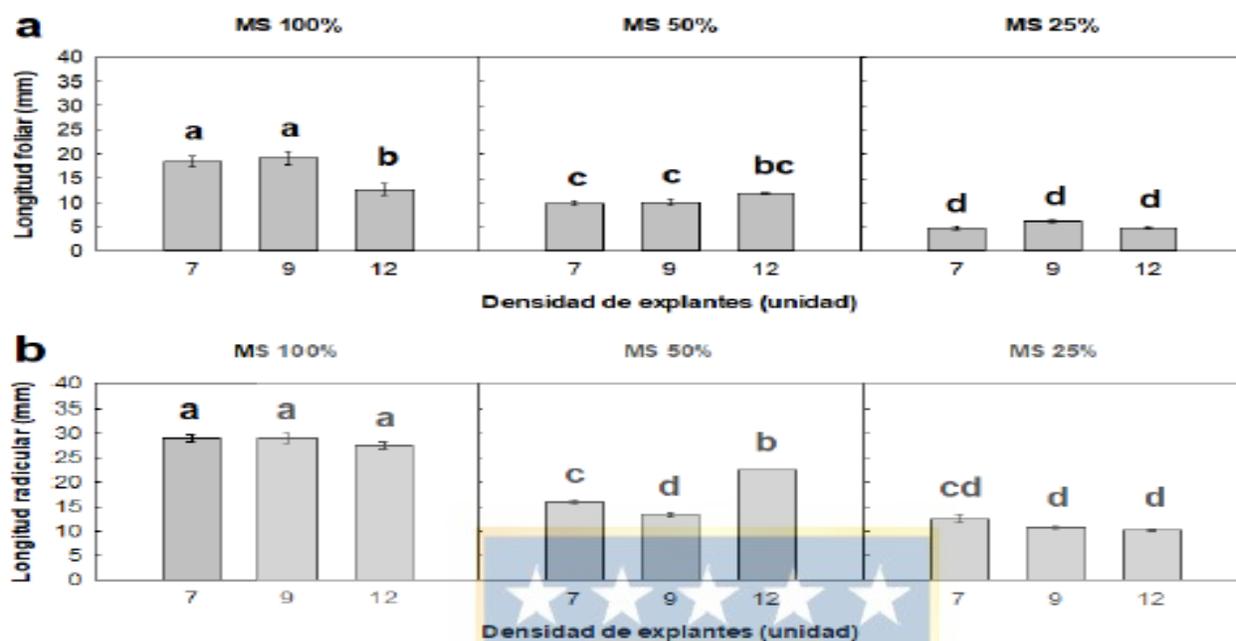


Figura 9. Efecto del uso de diferentes concentraciones de sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) (100%, 50% y 25%) y diferente densidad de explantes por frasco (7, 9 y 12) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío (7, 9 y 12 por frasco), después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** en el crecimiento foliar y **b)** en el crecimiento radicular. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA factorial, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

El número de brotes fue significativamente menor en las plántulas que crecieron con una densidad de explantes por frascos de 9 plántulas en las concentraciones de 50 y 25 % de MS y en 25% de MS con 12 explantes por frasco (Fig. 10a). La concentración de 100% de MS, permitió el desarrollo de mayor número de brotes, sin diferencias significativas entre densidades de explantes por frasco. Mientras que, la disminución al 50% de la concentración de MS, no produjo mayores efectos negativos, cuando la densidad de explantes por frascos fue de 7 o 12 explantes (Fig. 10a).

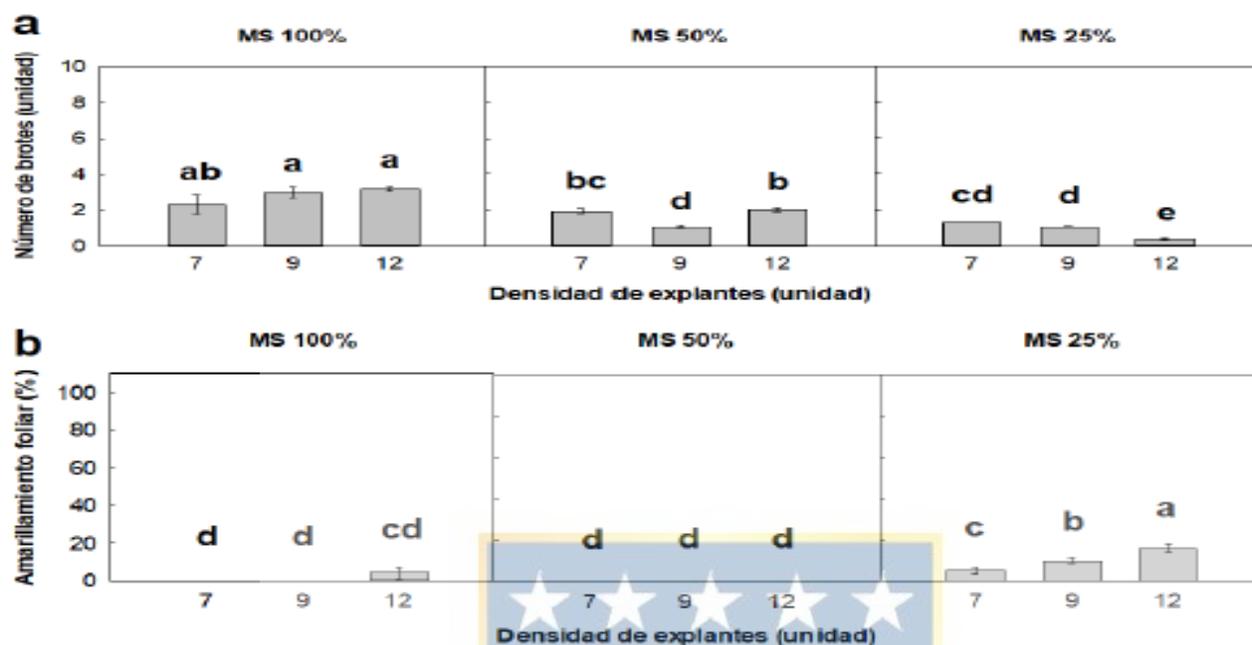


Figura 10. Efecto del uso de diferentes concentraciones de sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) (100%, 50% y 25%) y diferente densidad de explantes por frasco (7, 9 y 12) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío (7, 9 y 12), después de 90 días de cultivo. **a)** número de brotes y **b)** evaluación del porcentaje de amarillamiento foliar. Tratamientos realizados en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA factorial, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con media \pm error standard (SE).

El amarillamiento foliar fue mínimo en las plántulas que se mantuvieron en presencia del 50% de MS independientemente de la densidad de explantes por frascos y en presencia de 100% de MS con 7 y 9 explantes por frascos sin diferencias significativas con las plántulas que se desarrollaron con una densidad de explante de 12 por frasco (Fig. 10b). La disminución a 25% de la concentración de sales minerales y vitaminas de MS en el medio de cultivo favoreció el amarillamiento foliar de las plántulas.

7.4 Etapa 2 - Análisis del efecto por número de explantes y disminución de la concentración de medio MS en el desarrollo morfo-fisiológico de *C. quitensis* pA

En las plántulas de la población Arctowski, la longitud foliar disminuyó con la disminución de la concentración de MS, pero solo con diferencias significativas con la concentración más baja evaluada (25% de MS) (Fig. 11a). Sólo en las plántulas que se desarrollaron en presencia de 50% de MS, se observó un efecto de la densidad de explantes, con una

disminución significativa para la densidad de 7 y 9 explantes por frasco. Similares resultados se observaron para la variable longitud radicular con la disminución de la concentración de las sales minerales y vitaminas de MS (Fig. 11b), con una tendencia a la disminución de la longitud en relación con la disminución de la concentración de MS. En los frascos con 100% de MS, la mayor densidad de plantas por frasco (12) presentó una disminución significativa respecto de las densidades menores (7 y 9), mientras que para la concentración de 50% el menor desarrollo radicular se observó para la densidad de

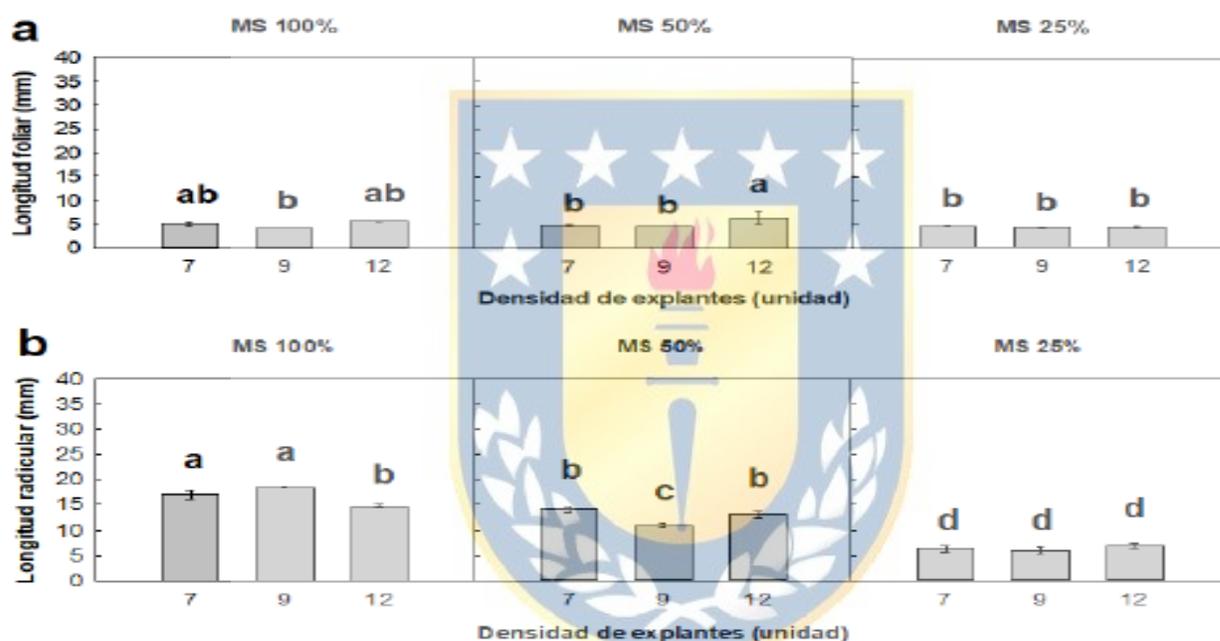


Figura 11. Efecto del uso de diferentes concentraciones de sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) (100%, 50% y 25%) y diferente densidad de explantes por frasco (7, 9 y 12) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski (7, 9 y 12 por frasco), después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En el crecimiento foliar y **b)** en el crecimiento radicular. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA factorial, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

Sólo la concentración más baja de las sales minerales y vitaminas de MS (25%) evidenció una disminución significativa en el número de brotes nuevos (Fig. 12a) y el mayor porcentaje de amarillamiento foliar en las plántulas de la población Arctowski, después de 90 días de cultivo (Fig. 12b). En general, no se observaron diferencias en las concentraciones de 100 y 50 % de MS ni en las densidades de plántulas por frasco.

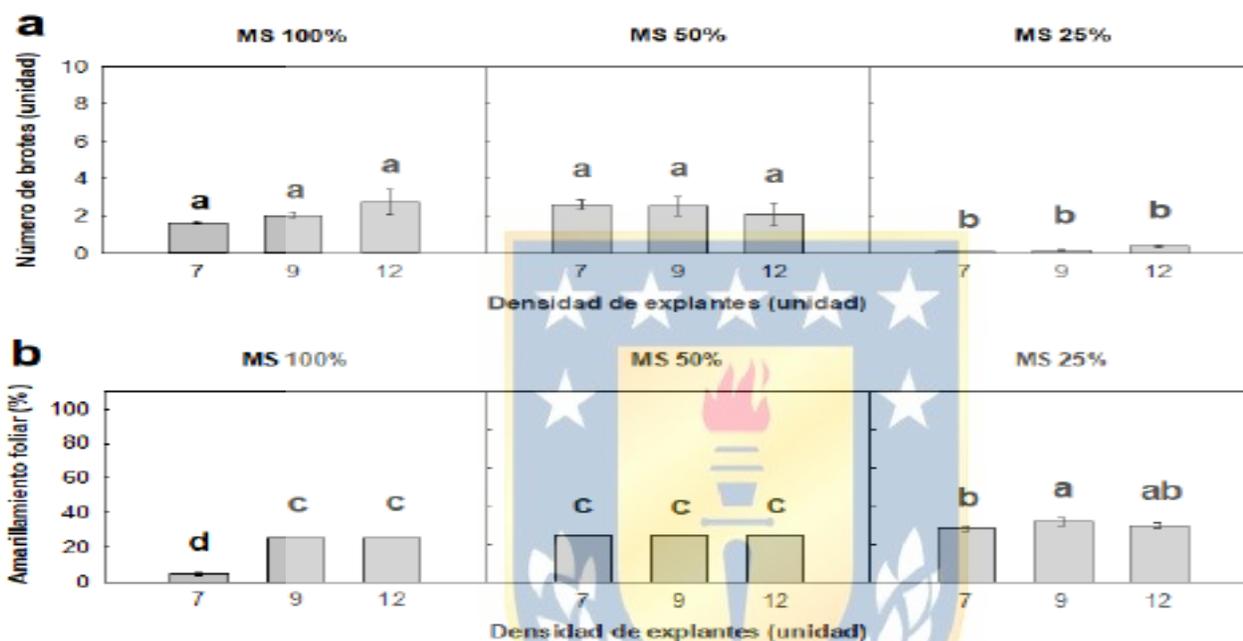


Figura 12. Efecto del uso de diferentes concentraciones de sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) (100%, 50% y 25%) y diferente densidad de explantes por frasco (7, 9 y 12) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski (7, 9 y 12 por frasco), después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** Número de brotes y **b)** evaluación del porcentaje de amarillamiento en hojas. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA factorial, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

7.5 Etapa 3 - Evaluación del efecto por adición de agentes osmo-reguladores en medio basal en el desarrollo morfo-fisiológico de *C. quitensis* pC

El tratamiento control (Sacarosa 3%) mostró el mayor desarrollo foliar (Fig. 13a) y radicular (Fig. 13b) en las plántulas de la población Conguillío, con diferencias significativas, pero con valores medios compatibles con buen estado de desarrollo para sacarosa 6%, y sorbitol 4 y 6 % para la longitud foliar (Fig. 13a). La presencia de sorbitol

4% no mostró diferencias significativas con respecto a sacarosa 3% para la variable longitud radicular, mientras que la adición de manitol 6% mostró valores significativamente inferiores (Fig. 13b). La adición de manitol 4% y sorbitol 6%, mostraron los valores más bajos en la longitud foliar y radicular, respectivamente.

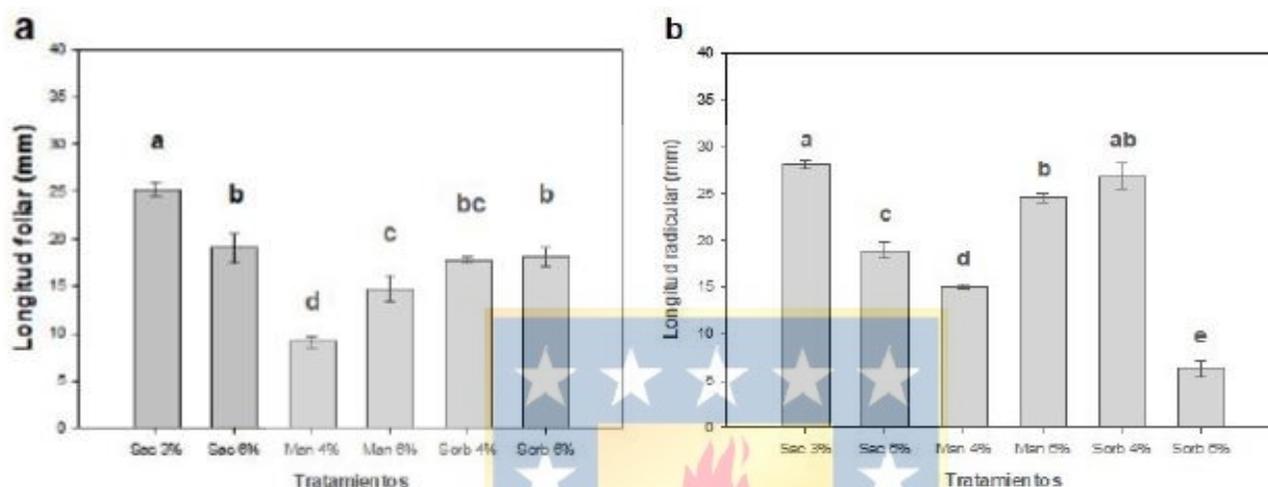


Figura 13. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac (sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** en el crecimiento foliar y **b)** en el crecimiento radicular. Los tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

La adición de los agentes osmo-reguladores no tuvo efectos sobre el desempeño fotosintético de las plántulas de *C. quitensis* población Conguillío (Fig. 14a) y permitió el 100% de sobrevivencia, excepto en las plántulas que crecieron en presencia de manitol 6%, donde la sobrevivencia fue de 95% (Fig. 14b).

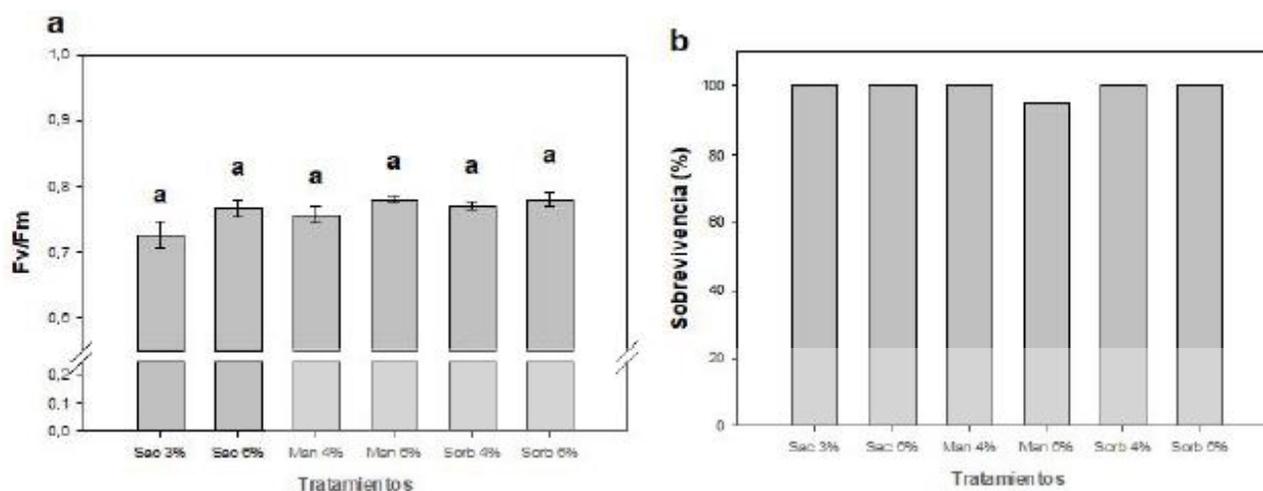


Figura 14. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac (sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** La eficiencia cuántica máxima del PSII (fotosistema II) (letras diferentes indican diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$) y **b)** en el porcentaje de sobrevivencia de las plantas. Tratamientos se realizaron en triplicado, columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

El uso de sacarosa 6%, manitol 4% y sorbitol 6% favorecieron la proliferación el mayor número de brotes, mientras que la adición de manitol 6% no estimuló el desarrollo de estos, con un promedio inferior a 1 brote nuevo por plántula (Fig. 15a). Todos los agentes y concentraciones evaluadas, permitieron un buen control del amarillamiento foliar, observándose sólo un 30% de amarillamiento en todas las plántulas (Fig. 15b).

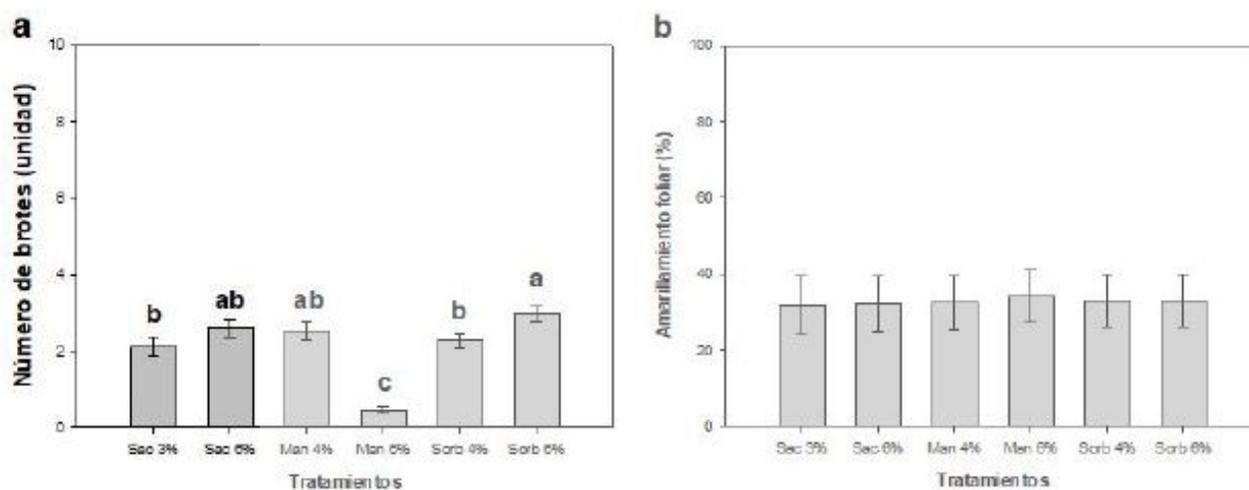


Figura 15. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac

(sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En el número de brotes (letras diferentes indican diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$) y **b)** en el porcentaje de amarillamiento foliar (Análisis no paramétrico, test Kruskal-Wallis $p \leq 0,05$). Tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

Las plántulas que crecieron en presencia de sacarosa 3% (control), manitol 4% y sorbitol 4%, mostraron los más altos valores promedio de contenido relativo del agua (CRA), siendo superiores al 40% en presencia de manitol 4%, pero sin diferencias significativas con los otros agentes (Fig. 16). En cambio, la concentración más alta de este compuesto osmorregulador (6%), afectó el estado hídrico de las plántulas con valores de CRA cercanos al 20%.

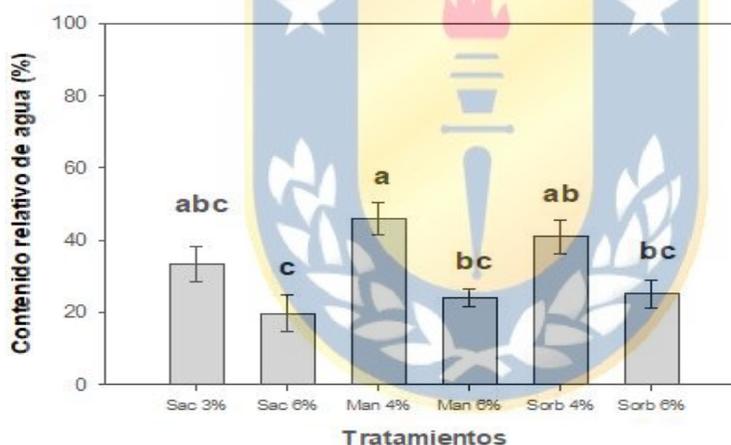


Figura 16. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac (sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío después de 90 días de cultivo *in vitro*, en el contenido relativo de agua. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

7.6 Etapa 3 - Evaluación del efecto por adición de agentes osmo-reguladores en medio basal en el desarrollo morfo-fisiológico de *C. quitensis* pA

El mayor promedio de longitud foliar se alcanzó en las plántulas que crecieron en presencia de sacarosa 3% (medio control), seguido por sacarosa 6%, manitol 4% y sorbitol 4 y 6 %, con promedios sobre los 10mm (Fig. 17a). El desarrollo radicular se vio favorecido en presencia de sacarosa 6% y sorbitol 4% con promedios superiores a los 20mm. El uso de sacarosa 3%, manitol 4% y sorbitol 6% también permitió un buen desarrollo radicular con valores medios que superaron los 15 mm (Fig. 17b).

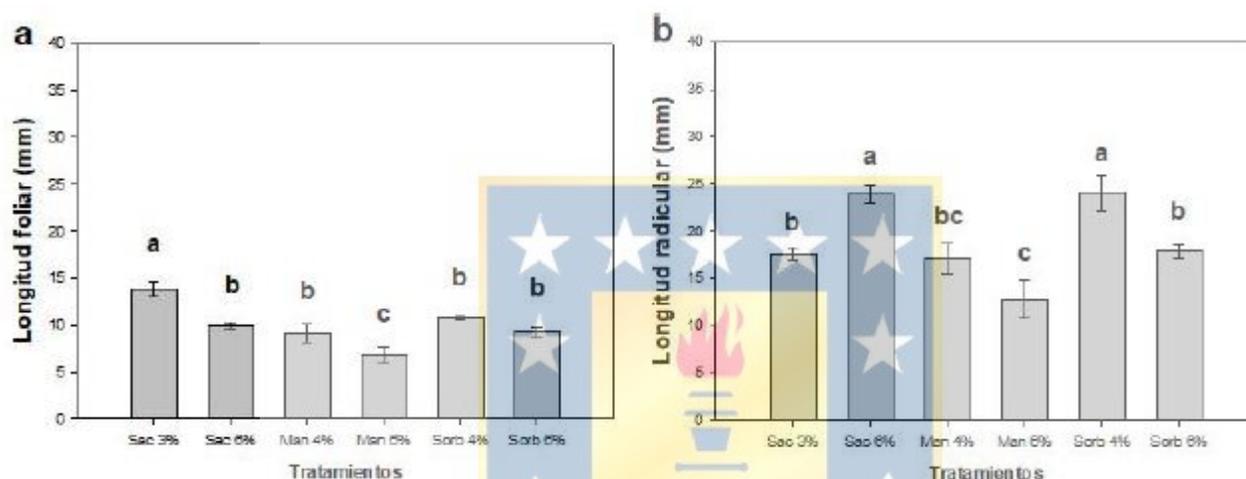


Figura 17. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac (sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En el crecimiento foliar y **b)** en el crecimiento radicular. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

El uso de los diferentes agentes osmo-reguladores y las concentraciones evaluadas no afectaron el estado fotosintético de las plantas (Fig. 18a), ni la sobrevivencia de estas (Fig. 18b). En promedio, los compuestos osmo-reguladores y las concentraciones evaluadas permitieron valores de sobrevivencia superiores al 80% en las plántulas de la población Arctowski.

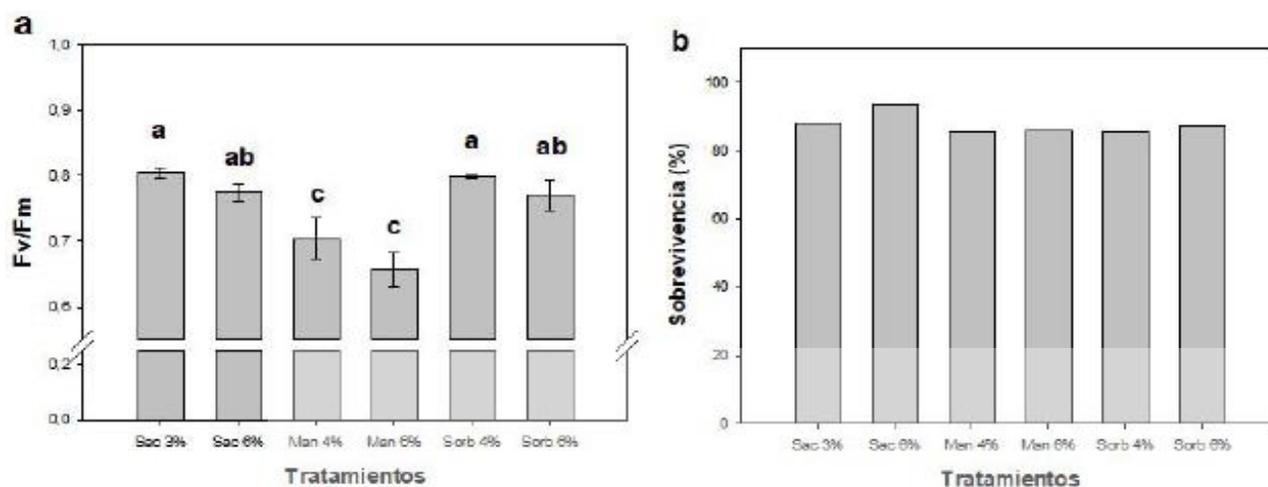


Figura 18. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac (sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En la eficiencia cuántica máxima del PSII (fotosistema II) (letras diferentes indican diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$) y **b)** en el porcentaje de sobrevivencia de las plantas. Tratamientos se realizaron en triplicado, columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

La mayor proliferación de brotes nuevos se observó en las plántulas que crecieron en presencia de sorbitol 6% y el menor número se observó en aquellas que crecieron en presencia de manitol 4% (Fig. 19a). Todos los agentes osmóticos y concentraciones evaluadas evitaron amarillamiento foliar en un 70% en promedio (Fig. 19b).

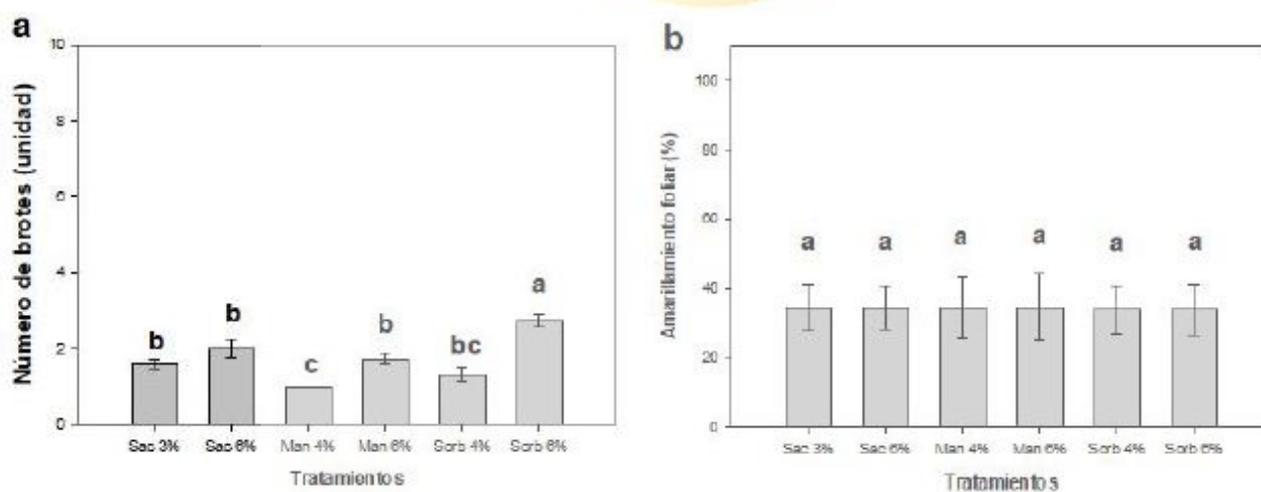


Figura 19. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac (sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población

Arctowski después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En el número de brotes y **b)** en el porcentaje de amarillamiento foliar. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

El mejor estado hídrico se observó en las plántulas que crecieron en presencia de sorbitol 6% con un contenido relativo de agua (CRA) cercano al 40% (Fig. 20).

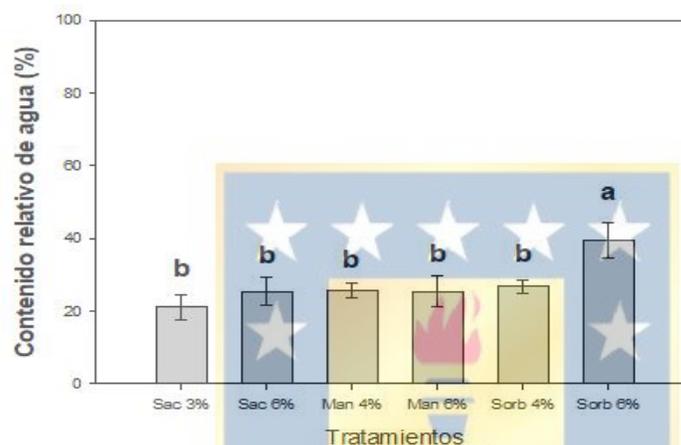


Figura 20. Efecto de la adición de agentes osmo-reguladores al medio de cultivo: Sac (sacarosa), Man (manitol) o Sorb (sorbitol) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski después de 90 días de cultivo *in vitro*, en el contenido relativo de agua. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

7.7 Etapa 4 - Curva de absorbancia de papeles filtro.

En la curva de absorbancia se obtuvo que el papel celofán naranja tenía un pick de absorción de fotones de luz en el rango entre los 390-490 nm (siendo este rango perteneciente a los colores violeta, azul y ciano), teniendo una baja absorción de luz a medida que el rango de la longitud de onda de la luz aumentaba (sobre 490 nm) y llegando hasta los 650 nm (espectro de color rojo), donde se mantuvo entre los valores de 0.1 y 0.15 (anexos Fig. 4). En la absorción de luz con papel celofán rojo se observó una baja en la absorbancia entre el rango de los 390-430 nm (espectro del color violeta), aumentando luego de los 430 nm y llegando a un pico máximo de absorción de luz entre

los 490-530 nm (siendo el espectro de los colores ciano y verde). Luego, en una longitud de onda superior a los 530 nm, disminuyó su poder de absorción llegando hasta los 640 nm, donde se mantuvo entre los rangos de 0.0 y 0.1 de absorbancia (anexos Fig. 4).

7.8 Etapa 4 - Evaluación del efecto por recubrimiento con filtros de luz roja en el desarrollo morfo-fisiológico y fotoquímico de *C. quitensis* pC.

La ausencia de filtros de color (Control), estimuló el desarrollo foliar y radicular en las plántulas de la población Conguillío, no obstante, el filtro para color rojo permitió un buen desarrollo foliar mientras que, el filtro color naranja estimuló el desarrollo radicular (Fig. 21).

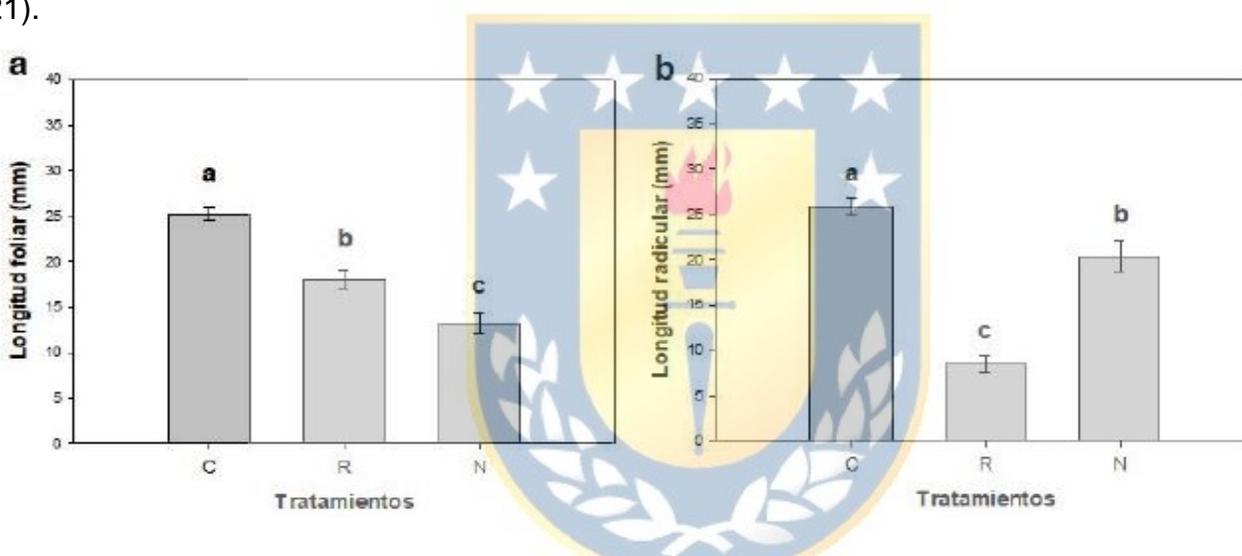


Figura 21. Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío, después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** en el crecimiento foliar y **b)** en el crecimiento radicular. Los tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

El uso de filtros para color no modificó ni afectó significativamente el desempeño fotosintético de las plántulas de la población Conguillío (Fig. 22a), y tampoco la sobrevivencia de plántulas con valores iguales o superiores al 80%. Estos valores fueron ligeramente superiores en las plantas que crecieron en ausencia de filtros (Fig. 22b).

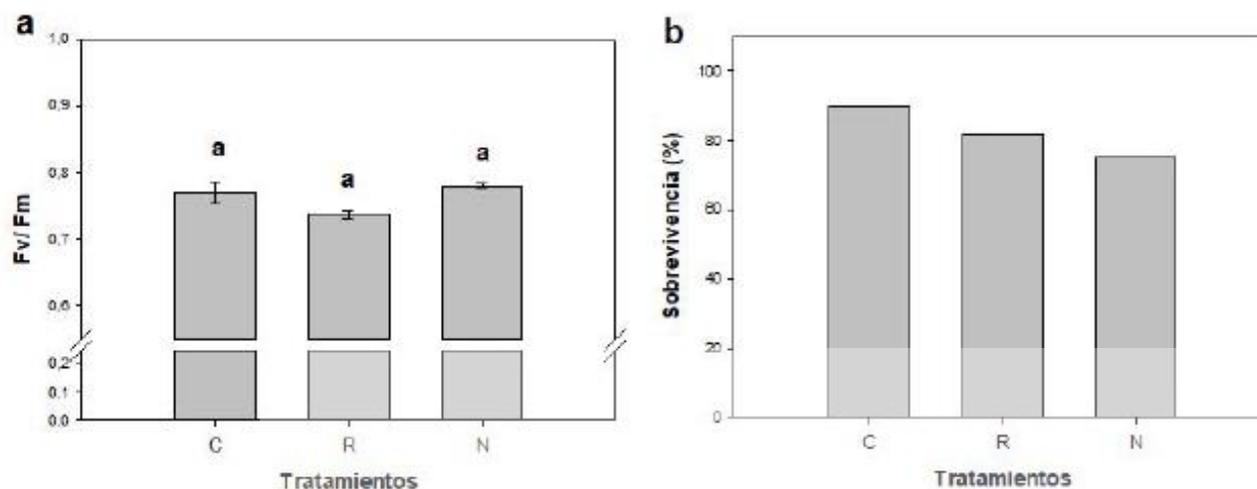


Figura 22. Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío, después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En la eficiencia cuántica máxima del PSII (fotosistema II) (letras diferentes indican diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$) y **b)** en el porcentaje de sobrevivencia de plantas. Tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

El uso de filtros no modificó el comportamiento en la generación de nuevos brotes (Fig. 23a), ni mostró diferencias en el control del amarillamiento (Fig. 23b), respecto de las plántulas que crecieron en ausencia de filtros.

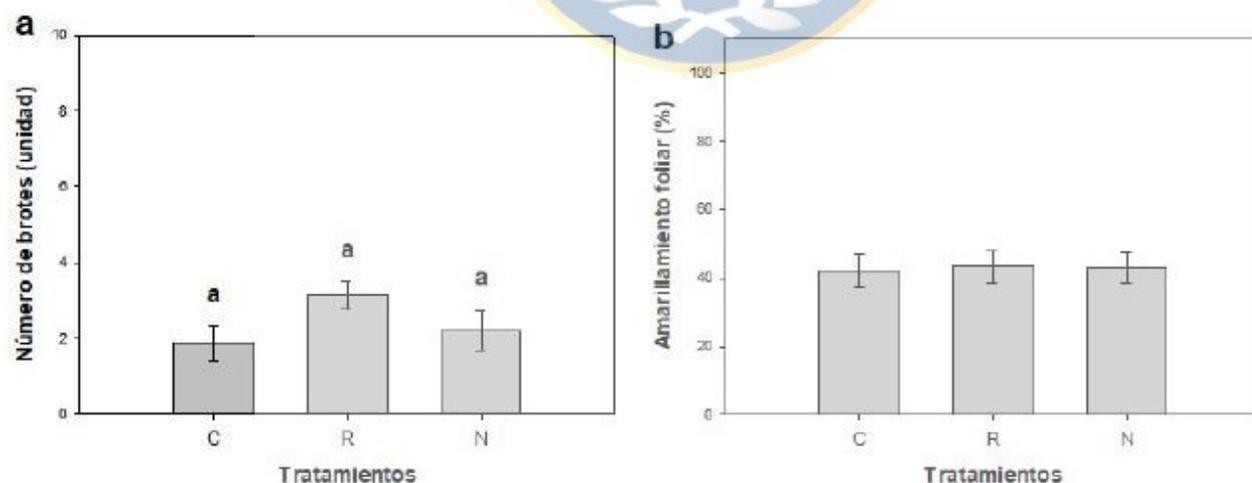


Figura 23. Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío, después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En el número de brotes (letras diferentes indican

diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$) y **b**) en el porcentaje de amarillamiento foliar (Análisis no paramétrico, test Kuskal-Wallis $p \leq 0,05$). Tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

El contenido relativo de agua (CRA) no evidenció diferencias significativas entre el control y los filtros para colores rojo y naranja. En cambio, en las plántulas que crecieron en frascos cubiertos con filtro naranja, se observó cierta tendencia a acumular mayor porcentaje de agua (Fig. 24).

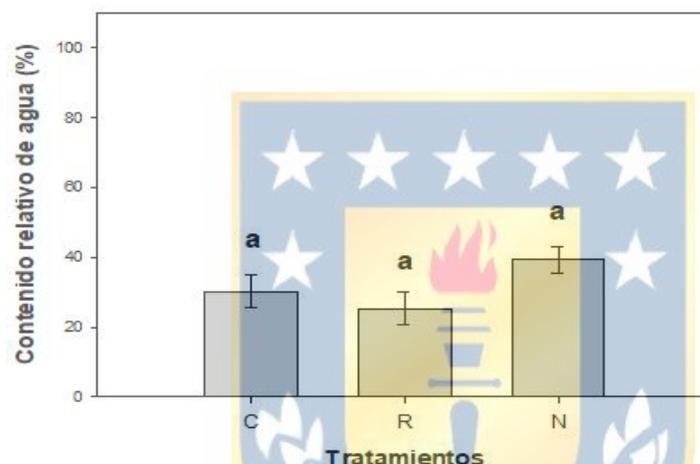


Figura 24. Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío, después de 90 días de cultivo *in vitro*, en el contenido relativo de agua. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

Se pudo observar que existe un incremento en la acumulación de todos los pigmentos cuantificados en las plántulas que crecieron en presencia de ambos filtros, sin observarse diferencias entre ellos (Fig. 25).

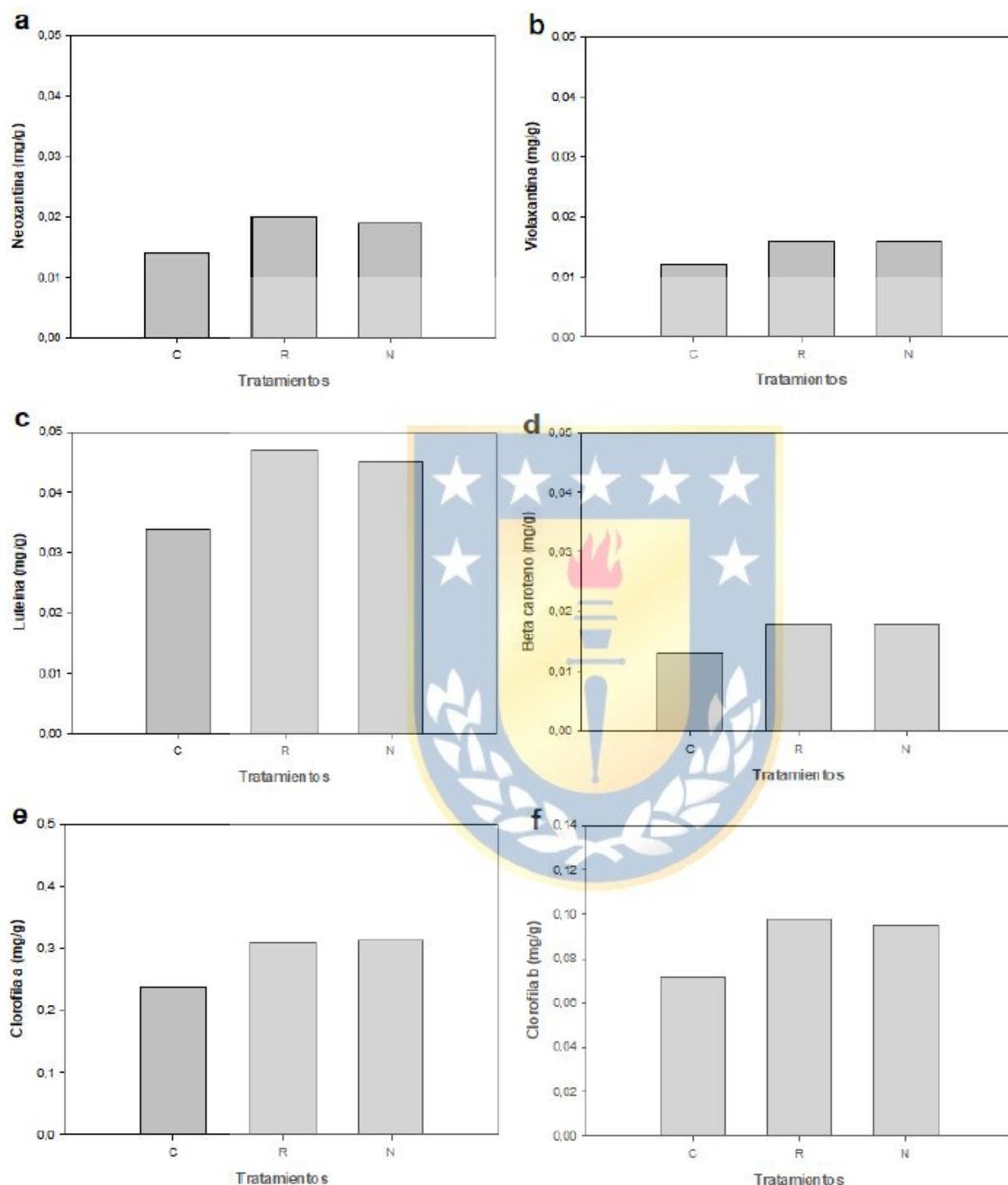


Figura 25. Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Conguillío, después de 90 días de cultivo *in vitro*: en el acumulamiento de pigmentos fotosintéticos **a)** neoxantina, **b)** violaxantina, **c)** luteína, **d)** beta caroteno, **e)** clorofila a y **f)** clorofila b. Tratamientos se realizaron en triplicado; columnas representadas con la media.

7.9 Etapa 4 - Evaluación del efecto por recubrimiento con filtros de luz roja en el desarrollo morfo-fisiológico y fotoquímico de *C. quitensis* pA.

Los promedios más altos de longitud foliar y longitud radicular se alcanzaron en las plántulas de la población Arctowski que crecieron en frascos sin filtros para color, y los valores más bajos, pero sin diferencias significativas con el filtro naranja, se observaron en las plántulas que crecieron en frascos con filtros para el rojo (Fig. 26).

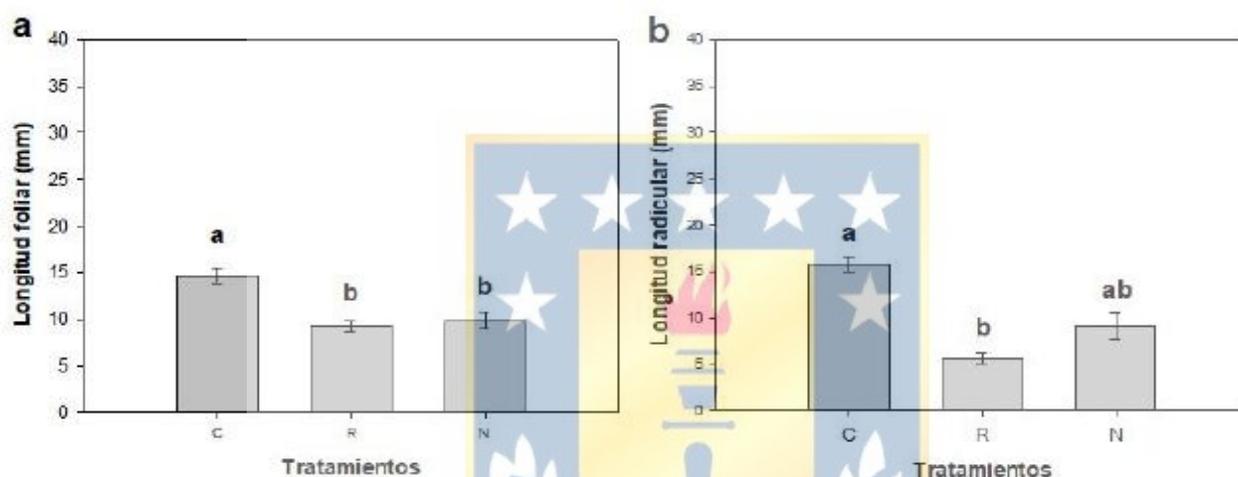


Figura 26. Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski, después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En el crecimiento foliar y **b)** en el crecimiento radicular. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

A pesar de que el uso de filtros no causó efectos negativos en el desempeño fotosintético de las plántulas de esta población (pA), las que crecieron en frascos cubiertos con filtro para el naranja mostraron valores medios de F_v/F_m significativamente inferiores a las plántulas que crecieron en ausencia de filtros (control) y en presencia de filtros para el rojo (Fig. 27a). Solo las plántulas que crecieron en ausencia de filtros alcanzaron porcentajes de sobrevivencia del 89%, el uso de filtros afectó esta variable con valores promedio de 55 y 26% para los colores rojo y naranja, respectivamente (Fig. 27b).

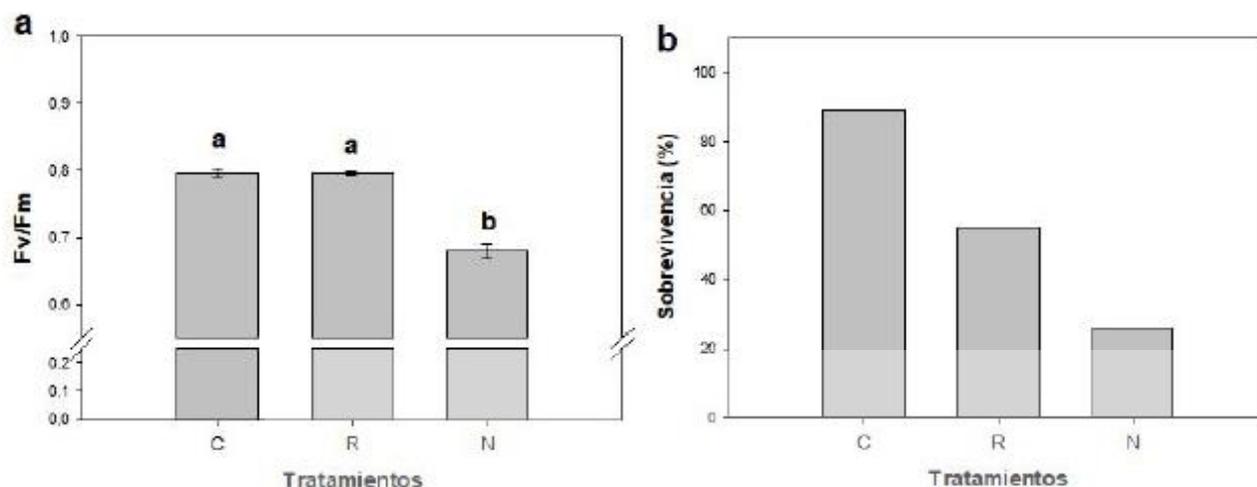


Figura 27. Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski, después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En la eficiencia cuántica máxima del PSII (fotosistema II) (letras diferentes indican diferencias significativas, One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$) y **b)** en el porcentaje de sobrevivencia de plantas. Tratamientos se realizaron en triplicado; columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

El uso de filtro rojo permitió una proliferación de brotes significativamente mayor que en las plántulas que crecieron en ausencia de filtro o en presencia de filtro naranja (Fig. 28a). En todos los tratamientos, el amarillamiento alcanzó valores medios cercanos al 40% (Fig. 28b).

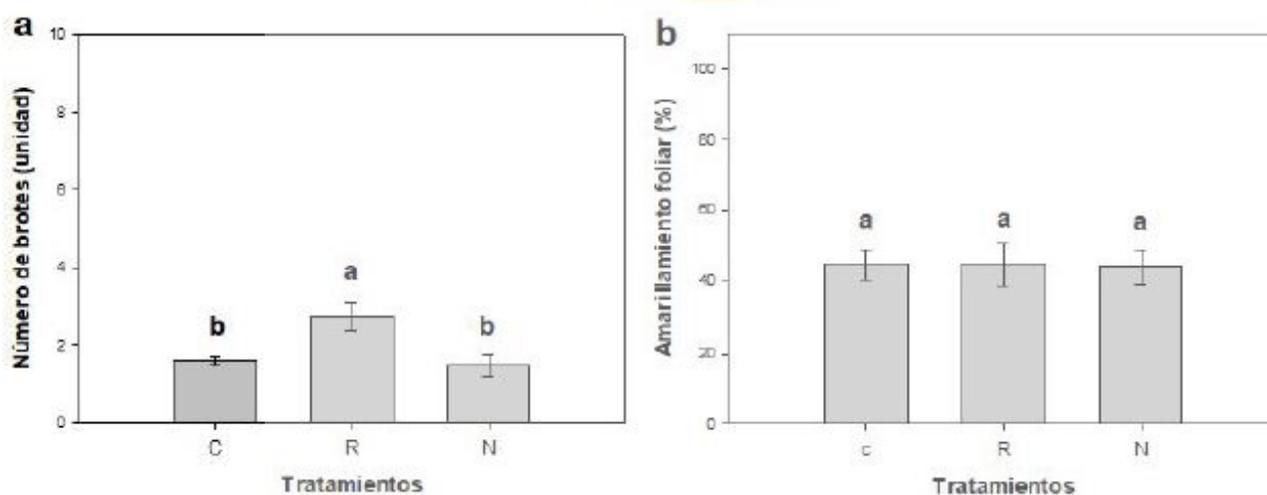


Figura 28. Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski,

después de 90 días de cultivo *in vitro*. **a)** En el número de brotes y **b)** en el porcentaje de amarillamiento foliar. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

El uso de filtro rojo favoreció el estado hídrico de las plántulas con valores de CRA significativamente superiores a las plántulas que crecieron en ausencia de filtro o en presencia de filtro naranja (Fig. 29).

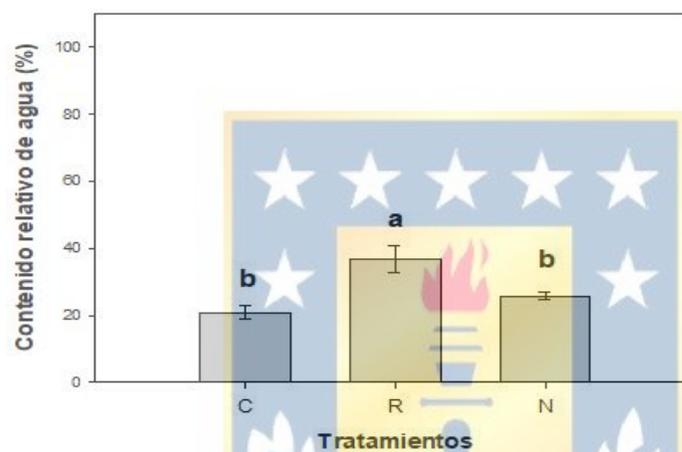


Figura 29. Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski, después de 90 días de cultivo *in vitro*, en el contenido relativo de agua. Tratamientos se realizaron en triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas (One Way ANOVA, test Duncan $p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la media \pm error standard (SE).

Se observó una tendencia a una mayor acumulación de pigmentos en las plántulas que crecieron en frascos cubiertos con filtros rojos (Fig. 30).

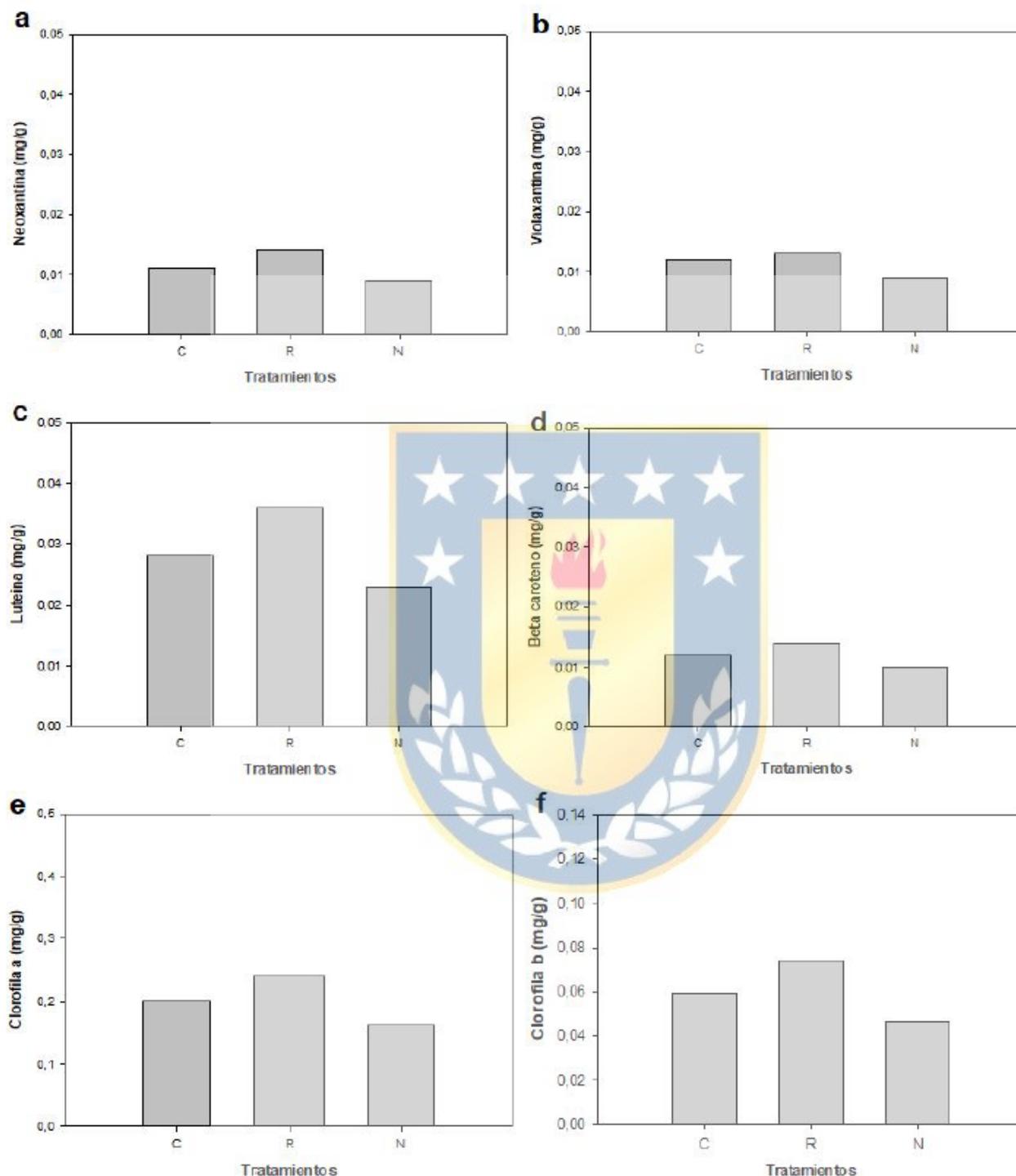


Figura 30. Efecto por el recubrimiento de frascos de cultivo con: C (control sin filtro), R (celofán rojo) y N (celofán naranja) en plantas de *Colobanthus quitensis* población Arctowski, después de 90 días de cultivo *in vitro*: en el acumulación de pigmentos fotosintéticos **a)** neoxantina, **b)** violaxantina, **c)** luteína, **d)** beta caroteno, **e)** clorofila a y **f)** clorofila b. Tratamientos se realizaron en triplicado; columnas representadas con la media.

8. DISCUSIÓN

8.1 Etapa 1 - Evaluación del efecto por uso de diferentes tipos de tapas en el desarrollo morfo-fisiológico de *C. quitensis*.

Después de 60 días de cultivo *in vitro*, el uso de diferentes materiales de sellado en los frascos de cultivo, no afectó al desarrollo de las plántulas de la población Conguillío. Las tapas de doble lámina de aluminio permitieron un menor desarrollo foliar y radicular, en comparación al film plástico, manteniendo un estado fisiológico adecuado para las plántulas, siendo registrado un promedio de Fv/Fm cercano al rango de los 0.79-0.84 (rango considerado adecuado). Este tipo de tapa, permitió obtener un menor porcentaje de amarillamiento foliar en plántulas, en comparación a los otros dos tratamientos (tapa metálica y film de plástico), pero no evitó un mayor desarrollo de ápices florales de las plántulas. Cuando se usó la tapa metálica para sellar frascos de cultivo, se observó en las plántulas una respuesta similar a la registrada al usar tapas de aluminio, respecto al desarrollo radicular, foliar y de nuevos brotes, pero, se observó una reducción del número de ápices generados. Además, se obtuvo un desempeño fotosintético inferior a los otros tratamientos. En cambio, al usar tapas de film de plástico, se registraron valores de desarrollo vegetativo altos, un moderado porcentaje de amarillamiento foliar y bajo desarrollo de ápices florales.

Las plántulas de la población Arctowski cultivadas en frascos sellados con tapas de doble lámina de aluminio después de 60 días de cultivo *in vitro*, mostraron una respuesta favorable, al no verse afectado el desarrollo radicular ni foliar y con un desempeño fotosintético adecuado. Este tipo de tapas, además, promovió un mayor desarrollo de ápices florales y un alto número de nuevos brotes. Estas variables limitan el uso de este tipo de tapas, ya que el protocolo de conservación *in vitro* limita el número de brotes y los ápices florales son indeseables en el cultivo *in vitro*. Cuando se usó la tapa metálica para sellar los frascos de cultivo, se observó en las plántulas un desarrollo radicular y foliar similar a la registrada al usar doble lámina de aluminio. Pero se observó una reducción del número nuevos brotes y un desempeño fotosintético inferior a los otros tratamientos. En cambio, al usar tapas de film de plástico, se observó una tendencia al incremento en

el desarrollo vegetativo de las plántulas en comparación a los otros dos tratamientos y disminución en el número de ápices florales producidos, siendo este último registro crucial, al momento de considerar este tipo de tapa como más favorable para la conservación en crecimiento mínimo de plántulas de *C. quitensis* pA.

Un estudio realizado por Winarto *et al.* (2004), sobre el cultivo *in vitro* de regenerantes de *Dianthus caryophyllus* L. var. Maldives, mostró que, al sellar los frascos con film plástico, en promedio, el número de brotes nuevos disminuyó. Similar tendencia fue observada en plántulas de la población Conguillío, cultivadas en frascos sellados con tapa de film plástico. Cati *et al.* (2014), observaron un menor crecimiento radicular y en altura de plantas en variedades de *Prunus armeniaca* L. cuando los frascos fueron sellados con una tapa metálica en comparación a una tapa de plástico. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos para ambas poblaciones de *C. quitensis*, donde se observó una tendencia al aumento del crecimiento vegetativo cuando las plántulas fueron cultivadas en frascos con sellado de tapa de plástico en comparación a una tapa metálica. Estos resultados pudiesen deberse a que los frascos sellados con film plástico presentan un menor hermetismo que los con tapa metálica con rosca, permitiendo un mayor intercambio gaseoso con el medio externo al frasco, limitando así, la acumulación de compuestos perjudiciales para las plantas en alta concentración dentro del frasco (ejemplo, acumulación de gas etileno). El etileno regula negativamente el alargamiento de la raíz y la formación de raíces laterales y afecta positivamente el inicio y el alargamiento del vello radicular (Alarcón *et al.* 2013). En las plántulas de pC, la longitud radicular fue menor en frascos con tapas metálicas respecto de aquellas que crecieron en frascos cubiertos film plástico. Por otro lado, la acumulación de etileno en altas concentraciones dentro del frasco, genera senescencia y necrosis en tejidos, disminuyendo la sobrevivencia de las plántulas (Horn 1992).

De acuerdo a lo discutido en esta etapa, el uso de film plástico (P) como material de sellado de frascos de cultivo, resultó ser lo más adecuado para la conservación en crecimiento mínimo de ambas poblaciones de *C. quitensis*.

8.2 Etapa 2 - Análisis del efecto por número de explantes y disminución de la concentración de medio MS en el desarrollo morfo-fisiológico de *C. quitensis*.

El uso de las sales minerales y vitaminas del medio basal MS (Murashige y Skoog) a una concentración del 100% en *C. quitensis* ha mostrado previamente resultados positivos en la estimulación del desarrollo vegetativo en esta especie (Acuña 2014; Cuba-Díaz *et al.* 2014). En esta investigación, en plántulas de la población Conguillío, se observaron los mayores registros de crecimiento (radicular y foliar) y el mayor número de nuevos brotes cuando se usó MS al 100%. La reducción de la concentración de MS a un 50%, disminuyó el desarrollo vegetativo en las plántulas de esta población, pero evitó clorosis y amarillamiento foliar, un resultado favorable para un protocolo de crecimiento mínimo. La reducción de la concentración al 25% de sales y vitaminas del medio basal, redujo considerablemente el crecimiento foliar y radicular, y además aumentó los síntomas de clorosis foliar en plántulas de pC, siendo un registro desfavorable para los objetivos de la investigación.

La combinación de un 100% de la concentración de MS con menores densidades de explantes por frascos (7 y 9), favoreció el desarrollo vegetativo. Mientras que en la mayor densidad de explantes (12), los mejores resultados se obtuvieron cuando se combinó con la concentración del MS al 50%, obteniéndose valores de crecimiento menores que en MS 100%, pero en rangos deseables para los objetivos de esta investigación.

Las plantas de *C. quitensis* de la población Arctowski presentan una variación en su morfología (menor tamaño) que las provenientes de la población de Conguillío (Cuba-Díaz *et al.* 2017b), pero la tendencia en el desarrollo vegetativo de las plántulas en esta investigación fue similar al observado en la población Conguillío. No obstante, en ninguno de los tratamientos se pudo evitar la presencia de amarillamiento en hojas de plántulas de pA, demostrando que esta especie es más susceptible al amarillamiento en las condiciones físico-químicas en las que se desarrolló este experimento.

El uso de concentraciones más bajas de sales y vitaminas en el medio basal, permitieron una mayor altura de plantas y número de brotes en *Typhonium flageliforme* (Nur *et al.*

2017). Estos resultados difieren de lo observado en esta investigación, siendo más evidente en la población Conguillío, donde el desarrollo vegetativo disminuyó con la reducción de la concentración de MS. La reducción de la concentración del medio basal causó un menor promedio en el número de brotes generados en *Bacopa monnieri* (L.) Wettst (Naik *et al.* 2017) y disminución en el crecimiento vegetativo en brotes de *Ocimum basilicum* (Monfort *et al.* 2018), por lo que lo observado en *C. quitensis* es coincidente con investigaciones similares.

El incremento en la densidad de explantes *Vaccinium corymbosum* var. Brigitta y Legacy permitió el incremento en el número de nuevos brotes y la disminución en la longitud foliar, en protocolos desarrollados en frascos de cultivo con bajo volumen de medio de cultivo (Rodríguez y Morales 2015). Por su parte, en explantes de brotes de *Mussa* cv. Grande Naine se observó una disminución del crecimiento vegetativo con el aumento de la densidad de explantes y/o microbrotes (Prabhuling y Sathyanarayana (2017). Similar tendencia se muestra en este trabajo, donde el número de brotes tiende a ser mayor en frascos con 12 explantes, al menos en las dos concentraciones más altas de MS. Mientras que, para ambas poblaciones de *C. quitensis* se observó, en promedio, una disminución del crecimiento foliar y radicular al aumentar la densidad de los explantes.

No obstante, los valores medios observados en ambas poblaciones al disminuir al 50% la concentración de sales minerales y vitaminas, favorecen el desarrollo del protocolo de conservación con crecimiento mínimo, disminuyendo, además, el costo y espacio (al combinarlo con mayor número de explantes por frascos-12 explantes) de este protocolo.

8.3 Etapa 3 - Evaluación del efecto por adición de agentes osmo-reguladores en medio basal en el desarrollo morfo-fisiológico de *C. quitensis*.

La adicción al medio de cultivo de compuestos con potencial efecto osmorregulador, produjo respuestas variables en el desarrollo vegetativo de los explantes en ambas poblaciones de *C. quitensis*. Mientras que el incremento en la concentración de sacarosa, produjo una disminución en la longitud foliar en ambas poblaciones y radicular en pC, tiende a favorecer el desarrollo de nuevos brotes. En cambio, el efecto de los polioles

(manitol y sorbitol) usados no es tan claro, con tendencias diferentes tanto para las variables de crecimiento vegetativo analizadas como para las dos poblaciones estudiadas.

En la población Conguillío, el uso de manitol (en ambas concentraciones estudiadas), en general no mostró resultados favorables en las variables evaluadas. El sorbitol permitió valores medios en el desarrollo vegetativo de las plántulas, que facilitan el desarrollo de un protocolo de crecimiento mínimo para esta población. La concentración de 4% de sorbitol permitió, además, un desempeño fotosintético superior a 7,4 y un contenido hídrico promedio de 41%, lo que permite considerar esta concentración adecuada para esta población.

En las plántulas la población Arctowski, en general, se observaron los mismos efectos y tendencias respecto de los polioles estudiados. En cambio, para esta población, el uso de sorbitol al 6%, mostró los mejores valores promedios, tanto en las variables que dan cuenta del desarrollo vegetativo (longitud foliar y radicular y número de brotes) como en variables fisiológicas como desempeño fotosintético (Fv/Fm) y contenido relativo de agua.

El efecto de estos agentes osmorreguladores es variable entre especies y de acuerdo a las condiciones en que estos son adicionados a los medios de cultivos. El incremento en la concentración de sorbitol en el medio de cultivo, provocó un aumento de la longitud foliar y de raíz en *Dioscorea alata* (Díaz *et al.* 2015) y reducción significativa de la tasa de crecimiento de papa de *Chilotanum* (Muñoz *et al.* 2019) en comparación con medios de cultivos suplementados sólo con sacarosa. Esta respuesta puede ser debida a que el polioliol, al no ser metabolizable por la planta, genera una reducción permanente del potencial osmótico del medio basal, reduciendo el crecimiento y desarrollo de plántulas (Shibli *et al.* 2006). Dicho potencial va disminuyendo en función del aumento de la concentración del osmo-regulador.

Por su parte, el incremento de la concentración de manitol en el desarrollo de protocolos de conservación por crecimiento mínimo de *Stevia rebaudiana*, mostró una disminución en la sobrevivencia, altura de plantas y longitud de raíces (Zayova *et al.* 2017). Similares efectos observamos en este estudio al ocupar manitol en el desarrollo de los protocolos para *C. quitensis*.

La combinación de polioles con sacarosa y el incremento de estos en los medios de cultivo durante el desarrollo de protocolos para la conservación por crecimiento mínimo de *Solanum tuberosum* L., mostraron que el uso de sacarosa, por si sola, no favorece en la reducción del crecimiento vegetativo. En cambio, la combinación de manitol y sorbitol y el incremento de la concentración estos en el medio de cultivo, causaron una reducción de la altura de las plantas y de la longitud radicular a los 3 meses de (Nasiruddin y Rafiul 2018). Estos resultados concuerdan con los nuestros, ya que al comparar el crecimiento vegetativo en ambas poblaciones de *C. quitensis* en medios con solamente sacarosa versus los con presencia de manitol o sorbitol, el crecimiento se vio reducido, producto del efecto osmo-regulador que ambas fuentes de carbono (sacarosa-manitol/sorbitol) ejercen en el medio (Shibli *et al.* 2006).

Los valores medios de las variables evaluadas, permiten recomendar que para *C. quitensis*, el uso de sorbitol como agente osmorregulador permite un crecimiento mínimo sin perjuicio del estado fisiológico de las plántulas que favorece la conservación de esta. Las diferencias en las respuestas respecto a la concentración de sorbitol, puede deberse a mecanismos de respuestas diferentes inherentes a las poblaciones de esta especie, los cuales han sido documentados en otros estudios comparativos entre poblaciones de *C. quitensis* (Klagges 2015, Castel 2015, Marín 2015, Arriagada 2017, Cuba-Díaz *et al.* 2017 a, b).

8.4 Etapa 4 - Evaluación del efecto por recubrimiento con filtros de luz roja en el desarrollo morfo-fisiológico y fotoquímico de *C. quitensis*.

Al recubrir frascos de cultivo con filtros de color, se ha observado una disminución del crecimiento de las plántulas por la ausencia de la longitud de onda del rojo y el naranja, no permitiendo el efecto de estas longitudes de onda sobre el desarrollo morfológico en ambas poblaciones de *C. quitensis*. Esto, además de generar una disminución del rendimiento fotosintético, no tuvo un impacto negativo respecto de los objetivos de la investigación, manteniéndose la media dentro del rango de desempeño adecuado (para plántulas de pC) y solo, para el uso del color naranja en plántulas de pA, se observó un desempeño bajo el rango adecuado (0.74-0.84). Excepto para la variable sobrevivencia de plántulas, donde las plántulas que crecieron en frascos sin cobertura con filtros de

color, mostraron valores medios más altos, en el resto de las variables evaluadas se pudo observar que el uso de estos filtros favoreció el cultivo.

En la población Conguillío, en general, no se observaron diferencias significativas entre las plántulas que crecieron en frascos cubiertos con filtros para ambos colores (rojo y naranja). Aunque en tendencia, el filtro naranja resultó ser más favorable para las plántulas de esta población.

En plantas de *Solanum esculentum* var. Cerasiforme expuestas a longitudes de luz roja y naranja, la longitud foliar fue mayor en comparación al resto de los tratamientos (Xiaoying *et al.* (2012). Yiang *et al.* (2017), observaron reducción del crecimiento vegetativo y de Fv/Fm en plantas de *Nicotiana tabacum* L. al exponerlas a luz monocromática (roja) en comparación a plantas expuestas a luz blanca. En *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, la luz roja condujo a una mayor longitud de brotes y radicular en comparación a otras longitudes de onda (Silva *et al.* 2017). Esto evidencia que longitudes cercanas al rojo y rojo lejano, influyen en la elongación de tallos y brotes (Saebo *et al.* 1995). La inhibición de la luz roja y naranja en este trabajo, mediante el uso de filtros, produjo una reducción en la longitud foliar y radicular en ambas las poblaciones de *C. quitensis*. Estos efectos pueden deberse a que el inhibirse la longitud de onda roja-naranja, la exposición es a otras longitudes como amarillo y verde, en menores proporciones, no influyen significativamente en el crecimiento vegetativo (Kim *et al.* 2006). Mientras que; la disminución del Fv/Fm puede ser un indicador de que existe una inactivación del centro de reacción de PSII por efecto de la ausencia de la longitud roja (Kreslavski *et al.* 2016)

La calidad de la luz tuvo un impacto positivo (respecto a los objetivos de esta investigación) en la respuesta fisiológica de las plantas, que se reflejó en el contenido de pigmentos fotosintéticos en los tejidos analizados. El contenido total de pigmentos fotosintéticos varió dependiendo de las condiciones de luz, generando un aumento cuando los frascos con plántulas de pC fueron recubiertos con filtro color rojo y para pA cuando los frascos fueron recubiertos con filtros de color rojo y naranja.

En hojas de *Solanum esculentum* var. Cerasiforme, expuestas a una longitud de onda de luz azul, se observó una mayor acumulación de clorofila (a y b) y carotenos (alfa y beta)

en comparación a otras longitudes aplicadas (Xiaoying *et al.* 2012). Estos resultados concuerdan con los obtenidos para ambas poblaciones de *C. quitensis* con filtros de color rojo (luz roja fue inhibida, ver anexo figura 4), donde la acumulación de pigmentos fotosintéticos fue mayor en comparación al control y al usar filtro de color naranja. Xiaoying *et al.* (2012), observaron la misma tendencia en la acumulación de pigmentos de clorofila y carotenos al usar luz naranja. En este trabajo, en la población pC, se obtienen altos contenidos de estos pigmentos fotosintéticos en comparación al control, pero no superiores que los obtenidos con un filtro de luz roja.

En el registro de la absorbancia de los filtros de color rojo y naranja, se pudo observar una mayor absorbancia de las longitudes cercanas al ultravioleta (violeta y azul), siendo mayor del filtro naranja que el rojo (más afín a absorber luz azul y verde), reflejando ambos filtros, los colores cercanos al infrarrojo (naranja, rojo y rojo lejano) (Anexos Fig. 4). Estos resultados nos permiten corroborar que las plantas cubiertas con filtros de ambos colores, crecen con una inhibición de estas 3 últimas longitudes de onda, lo cual según discusiones anteriores afecta tanto al crecimiento vegetativo como a la acumulación de pigmentos fotosintéticos, vitales en el desarrollo de las plantas. Pawlowska *et al.* (2018), al evaluar el efecto de varias longitudes de onda de luz (rojo lejano, rojo, azul y blanco) en el desarrollo y contenido de pigmento fotosintético de *Gerbera jamesonii* cv. Dura, observaron que el contenido de carotenos y clorofila a y b fue mayor en presencia de luz azul. La acumulación de estos pigmentos fue concordante con nuestros resultados, ya que al inhibir las longitudes cercanas al rojo lejano en hojas de plantas de la población pC (con filtro rojo o naranja), se observó una mayor acumulación de todos los pigmentos medidos en comparación al control. En la población pA, la acumulación de estos pigmentos fue menor al usar filtro naranja y mayor que el control, usando filtro rojo.

Según Vijay *et al.* (2017), las plantas con poca luz (sombra) contienen más clorofila b por cloroplasto que clorofila a y tienen menos contenido de clorofila a y b que las plantas con mucha luz (expuesta al sol). Además, señalan que la relación clorofila a y b también se usa para caracterizar el estado fisiológico de las plantas bajo condiciones de estrés hídrico y salino. Esto lo podemos relacionar para ambas poblaciones de *C. quitensis*,

donde la acumulación de clorofila b fue muy superior a la clorofila a, esto debido a que en plantas cubiertas con filtros de color naranja y rojo, la exposición a luz azul es constante, disminuyendo la actividad fotosintética, por evasión de los cloroplastos a dicha longitud y una disminución de la conductancia del mesófilo (Wada *et al.* 2003; Loreto *et al.* 2009), ocasionando una disminución del crecimiento vegetativo en plántulas (un efecto positivo en relación a los objetivos de ésta investigación).

La luteína es una xantofila que cumple varias funciones importantes: estabilización estructural de proteínas de antena, recolección de luz (transferencia de energía de excitación a la clorofila) y enfriamiento de los estados de la Clorofila (Jahns y Holzwarth 2012). Según lo antes mencionado, se registró para ambas poblaciones de *C. quitensis*, una mayor acumulación de luteína en plantas cubiertas con filtro rojo o naranja. Esto se pudo atribuir a que al estar en presencia de una mayor energía (longitudes del azul y violeta), la respuesta de foto-protección es una mayor acumulación de dicho pigmento para proteger al fotosistema II. Kopsell *et al.* (2016), al medir la acumulación de pigmentos fotosintéticos por efecto de la calidad de luz (luz blanca, roja y azul) en *Brassica oleracea* var. Green Lance, mostró una mayor acumulación de luteína, violaxantina, neoxantina y carotenos, pero una disminución de clorofila a y b, cuando la exposición de las plantas era a una mayor proporción de luz azul que roja. Esta investigación concuerda en la acumulación de los pigmentos fotosintéticos, excepto las clorofilas, ya que la acumulación de pigmentos fue mayor en plantas de pC y pA con filtro en comparación al control.

En esta etapa, el uso de filtros para la longitud de onda del rojo y el naranja, permitió reducir el crecimiento vegetativo sin afectar el crecimiento (mínimo) ni el estado fisiológico de las plantas de *C. quitensis* población pC y pA cultivadas *in vitro* por 90 días. Si bien, no se observaron marcadas diferencias entre los filtros usados y para algunas variables las diferencias fueron imperceptibles al compararlas con las plántulas que crecieron en ausencia de filtros, la acumulación de pigmentos combinada con la tendencia a disminuir el crecimiento en ausencia de luz roja o roja lejano, permitiría proteger el cultivo de posibles efectos oxidativos sobre los fotosistemas.

La evaluación de los diferentes factores a lo largo de las 4 etapas, permitió aumentar el período de cultivo desde 60 días a 90 días tras lo cual las plantas permanecieron en un crecimiento mínimo por el efecto combinado de factores físicos y químicos que influyen en el crecimiento. La disminución de la concentración de sales minerales y vitaminas en un 50% en el medio basal, el incremento en la densidad de explantes por frascos y la adición de agentes osmorreguladores permitió la disminución del potencial hídrico en el medio sin afectar el desarrollo vegetativo y el desempeño fotosintético de las plántulas. Finalmente, al recubrir los frascos con filtro de color naranja o rojo, se observó que las plantas de ambas poblaciones presentaron una disminución en su crecimiento, pero se favoreció la acumulación de pigmentos fotoprotectores (carotenos, xantófilas) que evitaron un potencial daño en el aparato fotosintético, por lo que el control en el uso de estas variables permite el ajuste en los protocolos de conservación en plántulas de las poblaciones Conguillío y Arctowski de *C. quitensis*.

Protocolos similares se han realizado en otras especies vegetales para conservarlas *in vitro* más eficientemente. Así, por ejemplo, Rahayu y Habibah (2016), optimizaron un protocolo de conservación *in vitro* para *Carica pubescens* Lenne & K. Koch, mediante regulación entre otros factores, de la concentración del medio basal con resultados similares a los nuestros (50% de MS).

9. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación de memoria de título nos permiten concluir que es posible optimizar la conservación *in vitro* para *Colobanthus quitensis* de las poblaciones Arctowski (pA) y Conguillío (pC), considerando aspectos físicos, químicos y biológicos que puedan adecuarse, mediante la manipulación de variables que regulan el crecimiento vegetal. De acuerdo a este análisis los mejores resultados por etapa y para una propuesta de crecimiento mínimo sin afectar el desempeño fotosintético son:

- Para la primera etapa los mejores resultados para ambas poblaciones fueron el uso de una tapa de film plástico (P).
- Para la segunda etapa los mejores resultados para ambas poblaciones fueron el uso de una concentración al 50% de medio basal MS en combinación con una densidad de 12 explantes por frasco.
- Para la tercera etapa los mejores resultados fueron la adición al medio de cultivo de sorbitol al 4% para pC y sorbitol 6% para pA.
- Para la cuarta etapa los mejores resultados fueron el recubrimiento de los frascos con papel celofán naranja para pC y el recubrimiento de los frascos con papel celofán rojo para pA.

Como una última conclusión, se recomienda el uso de los mejores resultados obtenidos en cada etapa de esta investigación, pudiendo realizarse nuevos estudios usando la combinación de todos ellos. Además, para poder seguir optimizando este protocolo de conservación, el estudio de otros factores que regulan el crecimiento y desarrollo en plantas, como son la reducción de la concentración de las hormonas reguladoras del crecimiento, la modificación de la presión del oxígeno y la disminución de la temperatura, son recomendados.

9. GLOSARIO

Abs	: absorbancia
AIA	: ácido indolacético
ANDEVA	: análisis de varianza
BAP	: 6-Bencil-aminopurina
cm	: centímetro
FR	: luz roja-lejana
Fv/Fm	: relación Fluorescencia variable y máxima de la fluorescencia
mg	: miligramo
mL	: mililitro
Man	: manitol
MS	: medio Murashige and Skoog
m s.n.m.	: metros sobre el nivel del mar
mm	: milímetro
N	: coordenada norte
“N”	: papel celofán naranja
pA	: población Arctowski
pC	: población Conguillío
PSII	: fotosistema II
R	: Luz roja
“R”	: papel celofán rojo
S	: coordenada sur
Sac	: Sacarosa
Sorb	: Sorbitol
STS	: Tiosulfato de plata
μL	: Microlitro
μmol m ⁻² s ⁻¹	: Micromoles por metro cuadrado por segundo
°C	: Grados Celsius



10. BIBLIOGRAFÍAS

Acuña D (2014) Optimización de protocolos para la propagación *in vitro* en diferentes poblaciones chilenas de *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. [Tesis de Pregrado. Ing. Biotecnología Vegetal]. Universidad de Concepción, Chile: 1–66.

Alarcón M, Lloret P, Salguero J (2013) Auxin–ethylene interaction in transversal and longitudinal growth in maize primary root. *Botany* 91: 680–685.

Arriagada P (2017) Cambios morfo-fisiológicos y del metabolismo en poblaciones de *Colobanthus quitensis* en respuesta a cloruro de sodio, iones cobre y frío. [Tesis de Pregrado. Ing. Biotecnología Vegetal]. Universidad de Concepción, Chile: 7–64.

Assis K, Pereira F, Rodríguez J, Silva F, Silva J, dos Santos S (2012) *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: effects of salt concentration and culture medium volume. *Acta Sci-Agron* 34: 77–83.

Ballaré C, Mazza C, Austin A, Pierik R (2012) Canopy light and plant health. *Plant Physiol* 160: 145–155.

Bascuñán-Godoy L, García-Plazaola J, Bravo L, Corcuera L (2010) Leaf functional and micro-morphological photoprotective attributes in two ecotypes of *Colobanthus quitensis* from the Andes and Maritime Antarctic. *Polar Biol* 33: 885–896.

Bhojwani S, Dantu P (2013) Conservation of Phytodiversity. En: Bhojwani S, Dantu P (eds) *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*, 1rd edn. Springer, India, pp 287–298.

Bjorkman O, Demmig B (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plant of diverse origins. *Planta* 170: 489–504.

Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 28: 25–30.

Calamar A, De Klerk G (2002) Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 70: 207–212.

Carvalho S, Schwieterman M, Abrahan C, Colquhoun T, Folta K (2016) Light quality dependent changes in morphology, antioxidant capacity, and volatile production in Sweet Basil (*Ocimum basilicum*). *Front Plant Sci* 7: 1328.

Castel K (2015) Evaluación de tolerancia a la salinidad (NaCl) de tres poblaciones de *Colobanthus quitensis* *in vitro*. [Tesis de Pregrado. Ing. Biotecnología Vegetal]. Universidad de Concepción, Chile: 10–70.

Cati M, Gennari F, Marino G (2014) Effect of culture jar seal on *in vitro* rooting and subsequent acclimatization of three Italian apricot varieties. *Sci Hort* 168: 120–123.

Chandel K, Pandey R (1991) Plant genetic resources conservation—recent approaches. En: Paroda R, Arora A (eds) *Plant genetic resources conservation and management concepts and approaches*, International Board For Plant Genetic Resources, Italy, pp 248–272.

Cha-Um S, Kirdmanee C (2007) Minimal growth *in vitro* culture for preservation of plant species. *Fruit, Veg Cereal Sci Biotech* 1: 13–25.

Chen C (2004) Humidity in plant tissue culture vessels. *Biosyst Eng* 88: 231–241.

Cheon C, Hoon K, Sang U (2012) Ethylene inhibitors enhance shoot organogenesis of *Gloxinia* (*Sinningia speciosa*). *Sci World J* 2012: 1-4.

Christie J, Briggs W (2001) Blue light sensing in higher plants. *J Biol Chem* 276: 11457–11460.

Cosgrove D (1981) Rapid suppression of growth by blue light. *Plant Physiol* 67: 584–590.

Costigan S, Warnasooriya S, Humphries B, Montgomery B (2011) Root-localized phytochrome chromophore synthesis is required for photoregulation of root elongation and impacts root sensitivity to jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 157: 1138–1150.

Cousins M, Adelberg J (2008) Short-term and long-term time course studies of tumeric (*Curcuma longa* L.) microrhizome development *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 93: 283–293.

Cousson A, Toubart P, Than Thanh Van K (1989) Control of morphogenetic pathways in thin cell layers of tobacco by pH. *Can J Bot* 67: 650–654.

Cruz-Cruz C, González-Arno M, Engelman F (2013) Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources* 2: 73–95.

Cuba-Díaz M (2011) El clavelito antártico y los mecanismos que lo protegen del frío polar. *Bol Antart Chil* 30: 8–9.

Cuba-Díaz M, Acuña D, Cordero C, Klagges M (2014) Parameters optimization for *in vitro* propagation of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Gayana Bot* 71: 58–67.

Cuba-Díaz M, Cerda G, Rivera C, Gomez A (2017a) Genome size comparison in *Colobanthus quitensis* populations show differences in species ploidy. *Polar Biol* 40: 1475–1480.

Cuba-Díaz M, Klagges M, Fuentes-Lillo E, Cordero C, Acuña D, Opazo G, Troncoso-Castro J (2017b) Phenotypic variability and genetic differentiation in continental and island populations of *Colobanthus quitensis* (Caryophyllaceae: Antarctic pearlwort). *Polar Biol* 40: 2397–2409.

Cuba-Díaz M, Acuña D, Fuentes-Lillo E (2019) Antarctic pearlwort (*Colobanthus quitensis*) populations respond differently to pre-germination treatments. *Polar Biol* 42: 1209–1215.

Cuba-Díaz M, Rivera-Mora C, Navarrete E, Klagges M (2020) Advances of native and non-native Antarctic species to *in vitro* conservation: improvement of disinfection protocols. *Sci Rep* 10: 3845.

Cybularz-Urban T, Hanus-Fajerska E, Świdorski A (2007) Effect of light wavelength on *in vitro* organogenesis of a *Cattleya* hybrid. *Acta Biol Cracov* 49: 113–118.

Demo P, Kuria P (2008) Table sugar as an alternative low-cost medium component for *in vitro* micro-propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Afr J Biotechnol* 7:2578–2584.

Díaz L, Carmona W, Elías O, Beltrán J (2015) Optimización de la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea* spp por crecimiento mínimo. *Rev Colomb Biotecnol* 17: 32–39.

Du Toit E, Robbertse P, Niederwieser J (2004) Plant carbohydrate partitioning of *Lachenalia* cv Ronina during bulb production. *Sci Hortic* 102: 433–440.

Dutta Gupta S, Jatothu B (2013) Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnol Rep* 7: 211–220.

Edwards J (1975) Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. and *Deschampsia antarctica* Desv. VII. Cyclic changes related to age in *Colobanthus quitensis*. *Br Antarct Surv Bull* 40: 1–6.

El Boullani R, Lagram K, El Mousadik A, Serghini M (2017) Effect of explants density and size on the *in vitro* proliferation and growth of separated shoots of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.). *J Mater Environ Sci* 8: 2469–2473.

Elias K (1998) *In vitro* culture and plant genetic resources. A new approach: *in vitro* collecting. *Lettere d' Informazione. Istituto Agronomico Mediterraneo* 3: 33–34.

Engelmann F (1991) *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. *Euphytica* 57: 227–243.

Engelmann F (1997) *In vitro* conservation methods. En: Callow JA, Ford BV, Newbury HJ (eds) *Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use*, vol 19., *Biotechnology in agriculture series CAB International*, Oxfordshire: 119–141.

Engelmann F (1998) *In vitro* germplasm conservation. *Acta Hort* 461: 41–47.

Engelmann F (2004) Plant Cryopreservation: Progress and Prospects. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40: 427–433.

Engelmann F (2011) Cryopreservation of embryos: an overview. *Methods Mol Biol* 710: 155–184.

Engelsma G (1974) On the mechanism of the changes in phenylalanine ammonia-lyase activity induced by ultraviolet and blue light in *Gherkin hypocotyls*. *Plant Physiol* 54: 702–705.

Fay M (1994) In what situation is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodivers Conserv* 3: 176–183.

Ferreira F (2011) Germplasm of fruit crops. *Rev Bras Frutic* 33: 1–6.

Fortes G, Scherwinski-Pereira J (2001) Preservação *in vitro* de batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. *Pesq agropec bras* 36: 1261–1264.

Garcia R, Pacheco G, Vianna M, Mansur E (2011) *In vitro* conservation of *Passiflora suberosa* L.: slow growth and cryopreservation. *Cryo Lett* 32: 377–388.

Green T, Schroeter B, Sancho L (2007) Plant life in Antarctica. *Funct Plant Ecol* 2: 389–433.

Grobe C, Ruhland C, Day T (1997) A new population of *Colobanthus quitensis* near Arthur Harbor, Antarctica: correlating recruitment with warmer summer temperatures. *Arct Antarct Alp Res* 29: 217–221.

He J, Qin L, Chong ELC, Choong T-W, Lee SK (2017) Plant growth and photosynthetic characteristics of *Mesembryanthemum crystallinum* grown aeroponically under different blue- and red-LEDs. *Front Plant Sci* 8: 361.

Healy W, Lang D (1985) *Alstroemeria* planting density. *Research Bulletin*, Colorado Greenhouse Growers Association 415: 2–3.

Horn W (1992) Micropropagation of rose (*Rosa* L). In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry vol 20 high-tech and micropropagation IV. Germany, Springer: 320–342.

Hung C, Hong C, Kim S, Lee K, Park J, Nam M, Choi D, Lee H (2016) LED light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important high bush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Physiol Plant* 38: 152.

Inácio M, Bertoni B, Suzelei F, Soares A (2011) *In vitro* conservation and low cost micropropagation of *Cochlospermum regium* (Mart. Ex. Scharank). *J Med Plants Res* 5: 4999–5007.

Jahns P, Holzwarth A (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1817: 182–193.

Karami O, Deljou A, Esna-Ashari M, Ostad-Ahmadi P (2006) Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Sci Hortic* 110: 340–344.

Keller E, Senula A, Leunufna S, Grube M (2006) Slow growth storage and cryopreservation - tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *Int J Refrig* 29: 411–417.

Khoury C, Bjorkman A, Dempewolf H, Ramirez-Villegas J, Guarino L, Jarvis A, Rieseberg L, Struik P (2014) Increasing homogeneity in global food supplies and the implications for food security. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 4001–4006.

Kim H, Wheeler R, Sager J, Goins G, Norikane J (2006) Evaluation of lettuce growth using supplemental green light with red and blue light emitting diodes in a controlled environment: a review of research at Kennedy Space Center. *Acta Hortic* 711: 111–119.

Klagges M (2015) Evaluación de tolerancia al estrés salino en diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Cariophyllaceae). [Tesis de Pregrado. Ing. Biotecnología Vegetal]. Universidad de Concepción, Chile: 6–64.

Kopsell D, Sams C, Morrow R (2016) Interaction of light quality and fertility on biomass, shoot pigmentation and xanthophyll cycle flux in Chinese kale. *J Sci Food Agric* 97: 911–917.

Kreslavski V, Schmitt F, Keuer C, Shirshikova G, Zharmukhamedov S, Kosobryukhov A, Allakhverdiev S (2016) Response of the photosynthetic apparatus to UV-A and red light in the phytochrome B-deficient *Arabidopsis thaliana* L. *hy3* mutant. *Photosynthetica* 54: 321–330.

Kumar P, Lakshmanan P, Thorpe T (1998) Regulation of morphogenesis in plant-tissue culture by ethylene. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 34: 94–103.

Kwasniewska E, Pawłowska B (2017) Efficient *in vitro* propagation of historical roses for biodiversity conservation. *Propag Ornament Plants* 17: 3–11.

Lefsrud M (2008) Irradiance from distinct wavelength light-emitting diodes affect secondary metabolites in kale. *HortScience* 43: 2243–2244.

Lentini Z, Mussell H, Mutschler M, Earle E (1988) Ethylene generation and reversal of ethylene effects during development *in vitro* of rapid cycling *Brassica campestris* L. *Plant Sci* 54: 75–81.

Lichtenthaler H, Wellburn A (1983) Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 11: 591–592.

Liu M, Xu Z, Guo S, Tang C, Liu X, Jao X (2014) Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets *in vitro* under different light spectra. *Sci Hort* 174: 112–118.

Lopez-Puc G (2013) An Effective *in vitro* slow growth protocol for conservation of the orchid *Epidendrum chlorocorymbos* Schltr. *Trop Subtrop Agroecosyst* 16: 61–68.

Loreto F, Tsonev T, Centritto M (2009) The impact of blue light on leaf mesophyll conductance. *J Exp Bot* 60: 2283–2290.

Lumsden P, Pryce S, Leifert C (1990) Effect of mineral nutrition on the growth and multiplication of *in vitro* cultured plants. In: *Progress in plant cellular and molecular biology*. (Nijkamp H, Van Der Plas L, Van Aartrijk J, Eds). *Proceedings of the 7^o International Congress on Plant Tissue and Cell Culture*, Springer, Dordrecht, pp 108–113.

Maluta F, Bordignon S, Rossi M, Ambrosano G, Rodrigues P (2013) *In vitro* culture of sugar cane under different light sources. *Pesqui Agropecu Bras* 48: 1303–1307.

Mantovani A, Cardoso R (2000) Leaf micromorphology of Antarctic pearlwort *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Polar Biol* 28: 531–538.

Mantovani A, Vieira R (2000) Leaf micromorphology of Antarctic pearlwort *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Polar Biol* 23: 531–538.

Marín C (2015) Efecto de los iones cobre (II) sobre los mecanismos bioquímicos y morfo-fisiológicos de tolerancia en cuatro poblaciones de *Colobanthus quitensis*. [Tesis de Pregrado. Ing. Biotecnología Vegetal]. Universidad de Concepción, Chile: 8–65.

Marino G, Noferini M (2013) Effect of the type of closure for culture bottles on micropropagation efficiency of apricot. *Sci Hort* 161: 306–313.

Mathur S (2013) Conservation of biodiversity through tissue culture. *Research and Reviews: J Microbiol Biotechnol* 2: 1–6.

McClelland M, Smith M (1990) Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. *HortScience* 25: 797–800.

Monfort L, Bertolucci S, Lima A, de Carvalho A, Mohammed A, Blank A, Pinto J (2018) Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*. *Ind Crops Prod* 116: 231–239.

Monteiro-Hara A, Jadão A, Mendes B, Trevisan F, Rezende J, Vieira M, Meletti L, Piedade S (2011) Genetic transformation of passionflower and evaluation of R1 and R2 generations for resistance to Cowpea aphid borne mosaic virus. *Plant Dis* 95: 1021-1025.

Moore D (1970) Antarctic terrestrial plants and their ecology. *Br Antarct Surv Bull* 23:63-80.

Mukherjee P, Husain N, Misra S, Rao V (2010) *In vitro* propagation of a grape rootstock, deGrasset (*Vitis champinii* Planch.): Effects of medium compositions and plant growth regulators. *Sci Hort* 126: 13–19.

Muneer S, Kim E, Park J, Lee J (2014) Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light Intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). *Int J Mol Sci* 15: 4657.

Muñoz M, Diaz O, Reinún W, Winkler A, Quevedo R (2019) Slow growth *in vitro* culture for conservation of Chilotanum potato germplasm. *Chil J Agric Res* 79: 26–35.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497.

Murillo-Talavera M, Pedraza-Santos M, Gutiérrez-Rangel N, Rodríguez-Mendoza M, Lobit P, Martínez-Palacios A (2016) Led light quality and *in vitro* development of *Oncidium tigrinum* and *Laelia autumnalis* (Orchidaceae). *Agrociencia* 50: 1065–1080.

Naik P, Godbole M, Nagella P, Murthy H (2017) Influence of different media, medium strength and carbon sources on adventitious shoot cultures and production of bacoside A in *Bacopa monnieri* (L.). *Ceylon J Sci* 46: 97–104.

Nasiruddin M, Rafiul A (2018) *In vitro* slow-growth conservation for two genotypes of *Solanum tuberosum* L. *Bangladesh J Bot* 47: 369–380.

Ni W, Xu S, Tepperman J, Stanley D, Maltby D, Gross J, Burlingame A, Wang Z, Quail P (2014) A mutually assured destruction mechanism attenuates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* 344: 1160–1164.

Niino T, Arizaga M (2015) Cryopreservation for preservation of potato genetic resources. *Breed Sci* 65: 41–52.

Nur I, Norrizah J, Azani S, Nurul I, Nurul A (2017) The effects of different strength of MS media in solid and liquid media on *in vitro* growth of *Typhonium flageliforme*. *Asian Pac J Trop Biomed* 7: 151–156.

Pawłowska B, Żupnik M, Szewczyk-Taranek B, Cioć M (2018) Impact of LED light sources on morphogenesis and levels of photosynthetic pigments in *Gerbera jamesonii* grown *in vitro*. *Hortic Environ Biotechnol* 59: 115–123.

Pedroso R, Branquinho N, Hara A, Costa A, Silva F, Pimenta L, Silva M, Cunha W, Pauletti P, Januario A (2017) Impact of light quality on flavonoid production and growth of *Hyptis marruboides* seedlings cultivated *in vitro*. *Rev Bras Farmacogn* 27: 466–470.

Pereira M, Corrêa F, Polo M, de Castro E, Cardoso A, Pereira F (2016) Seed germination of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) as related to its anatomy and dormancy alleviation. *Seed Sci Res* 26: 351–361.

Prabhuling G, Sathyanarayana B (2017) Optimization of explants density for tissue culture propagation of banana cv. 'Grande Naine'. *Int J Agric Sci* 13: 71–76.

Pieczynski M, Marczewski W, Hennig J, Dolata J, Bielewicz D, Piontek P, Wyrzykowska A, Krusiewicz D, Strzelczyk-Zyta D, Konopka-Postupolska D (2013) Down-regulation of CBP80 gene expression as a strategy to engineer a drought-tolerant potato. *Plant Biotechnol J* 11: 459–469.

Pigliucci M, Murren C, Schlichting C (2006) Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J Exp Biol* 209: 2362–2367.

Pisano E (1972) Comunidades vegetales del área de Bahía Morris, Isla Capitán Aracena, Tierra del Fuego (Parque Nacional "Hernando de Magallanes"). *Ans Inst Pat* 3: 104–130.

Prudente D, Nery F, Paiva R, Santos P, Nery M, Paiva P (2015) *In vitro* germination and cryopreservation of *Zinnia elegans* seeds. *Ornam Hortic* 21: 243–250.

Rahayu E, Habibah N (2016) Optimization of *in vitro* conservation protocol of *Carica pubescens* Lenne & K. Koch through medium concentration, temperature and irradiation duration decrease. *Biosaintifika* 8: 85–93.

Rajasekharan P, Sahijram L (2015) *In Vitro* conservation of plant germplasm. In: Bahadur B, Venkat Rajam M, Sahijram L, Krishnamurthy K (eds) *Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology*, Springer, New Delhi, pp 417–443.

Ramsay J, Galitz D, Lee C (2003) Basal medium and sucrose concentration influence regeneration of eastern lily in ovary culture. *HortSci* 38: 404–406.

Reed B, Engelmann F, Dulloo E, Engels J (2004) Technical guide lines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. Rome, Italy; International plant genetic resources institute/Food Agriculture Organization/System-wide Genetic Resources Programme: 95.

Rezali N, Sidik N, Saleh A, Osman N, Adam N (2017) The effects of different strength of MS media in solid and liquid media on *in vitro* growth of *Typhonium flagelliforme*. *Asian Pac J Trop Biomed* 7:151–156.

Rodríguez M, Morales D (2015) Effect of explant density and volume of cultivation medium on *in vitro* multiplication of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) varieties "Brigitta" and "Legacy". *Sci. Agropecu* 6: 31–40.

Saebo A, Krekling T, Appelgren M (1995) Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 41: 177–185.

Sarasan V, Cripps R, Ramsay M, Atherton C, McMichen M, Prendergast G, Rowntree J (2006) Conservation *in vitro* of threatened plants - Progress in the past decade. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42: 206–214.

Shibli R, Shatnawi M, Subaih W, Ajlouni M (2006) *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review. *World J Agric Sci* 2: 372–382.

Silva S, Bertolucci S, da Cunha S, Tavares M, Pinto J (2017) Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 129: 501–510.

Smith H (2000) Phytochromes and light signal perception by plants: an emerging synthesis. *Nature* 407: 585–591

Smith R (1984) Terrestrial plant biology of the sub-Antarctic and Antarctic. In: Laws R (ed) *Antarctic biology*, Academic Press, New York, pp 61–162.

Smith R (2003) The enigma of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica*. In Huiskes A, Gieskes W, Rozema J, Schoro R, Van der Vies S, Wolff W (eds) *Antarctic Biology in a Global Context*. Leiden, Backhuys Publishers, pp 34–239.

Sotiropoulos T, Molassiotis A, Mouhtaridou G, Papadakis I, Dimassi K, Therios I, Diamantidis G (2006) Sucrose and Sorbitol effects on shoot growth and proliferation *in vitro*, nutritional status and peroxidase and catalase isoenzymes of M 9 and MM 106 apple (*Malus domestica* Borkh.) rootstocks. Eur J Hortic Sci 71: 114–119.

Tanaka M, Takamura T, Watanabe H, Endo M, Yanagi T, Okamoto K (1998) *In vitro* growth of *Cymbidium* plantlets cultured under super red and blue light-emitting diodes (LEDs). J Hortic Sci Biotech 73: 39–44.

Tavazza R, Rey A, Papacchioli V, Pagnotta M (2015) A validated slow-growth *in vitro* conservation protocol for globe artichoke germplasm: a cost-effective tool to preserve from wild to elite genotypes. Sci Hort 197: 135–143.

Tripathy B, Brown C (1995) Root-shoot interaction in the greening of wheat seedlings grown under red light. Plant Physiol 107: 407–411.

Tyagi R, Agrawal A, Mahalakshmi C, Hussain Z, Tyagi H (2007) Low-cost media for *in vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. In Vitro Cell Dev Biol Plant 43: 51-58.

Vijay P, Rakesh P, Mandan P (2017) Manual of ICAR Sponsored Training Programme for Technical Staff of ICAR Institutes on “Physiological Techniques to Analyze the Impact of Climate Change on Crop Plants”. Division of Plant Physiology, ICAR-Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India, pp 8-9.

Wada M, Kagawa T, Sato Y (2003) Chloroplast movement. Annu Rev Plant Biol 54: 455–468.

Wallaart R (1980) Distribution of sorbitol in Rosaceae. Phytochemistry 19: 2603–2610.

Wang X, Catt S, Pangestu M, Smith P (2011) Successful *in vitro* culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. Reproduction 141: 183–191.

Wang Y, Fan M, Liaw S (2005) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. Bot Bull Acad Sinica 46: 29–34.

West T, Ravindra M, Preece J (2006) Encapsulation, cold storage, and growth of *Hibiscus moscheutos* nodal segments. Plant Cell Tissue and Organ Cult 87: 223–231.

Winarto B, Aziz M, Rashid A, Ismail M (2004) Effects of permeable culture closure and gelling agents on reduction of hyperhydricity on *in vitro* culture of carnation. *Indones J Agric Sci* 5: 11–19.

Withers L (1991) Biotechnology and plant genetic resources conservation. In: Paroda R, Arora R (eds) *Plant genetic resources conservation and management concepts and approaches*. International Board For Plant Genetic Resources, New Delhi, pp 273.

Xia J, Zhao H, Liu W, Li L, He Y (2009) Role of cytokinin and salicylic acid in plant growth at low temperatures. *Plant Growth Regul* 57: 211–221.

Xiaoying L, Shirong G, Taotao C, Zhigang X, Tezuka T (2012) Regulation of the growth and photosynthesis of cherry tomato seedlings by different light irradiations of light emitting diodes (LEDs). *Afr. J. Biotechnol* 11: 6169–6177.

Xiong F, Mueller E, Day T (2000) Photosynthetic and respiratory acclimation and growth response of Antarctica vascular plants to contrasting temperatures regimes. *Am J Bot* 87: 700–710.

Xiong F, Ruhland C, Day T (1999) Photosynthetic temperature response of the Antarctic vascular plants *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica*. *Physiol Plant* 106: 276–286.

Yang L, Wang L, Ma J, Ma E, Li J, Gong M (2017) Effects of light quality on growth and development, photosynthetic characteristics and content of carbohydrates in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants. *Photosynthetica* 55: 467–477.

Yeong W, Kong S, Seon K, Paek K (2006) Light quality affects *in vitro* growth of grape 'Teleki 5BB'. *J Plant Biol* 49: 276–280.

Zhang N, Wen B, Ji M, Yan Q (2014) Low-temperature storage and cryopreservation of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad.) seeds. *CryoLetters* 35: 418–426.

Zayova E, Nedev T, Dimitrova L (2017) *In vitro* storage of *Stevia rebaudiana* Bertoni under slow growth conditions and mass multiplication after storage. *Bio Bulletin* 3: 30–38.

Zobayed S, Armstrong J, Armstrong W (1999) Evaluation of a closed system, diffusive and humidity-induced convective throughflow ventilation on the growth and physiology of cauliflower *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Cult* 59: 113–123.

11. ANEXOS

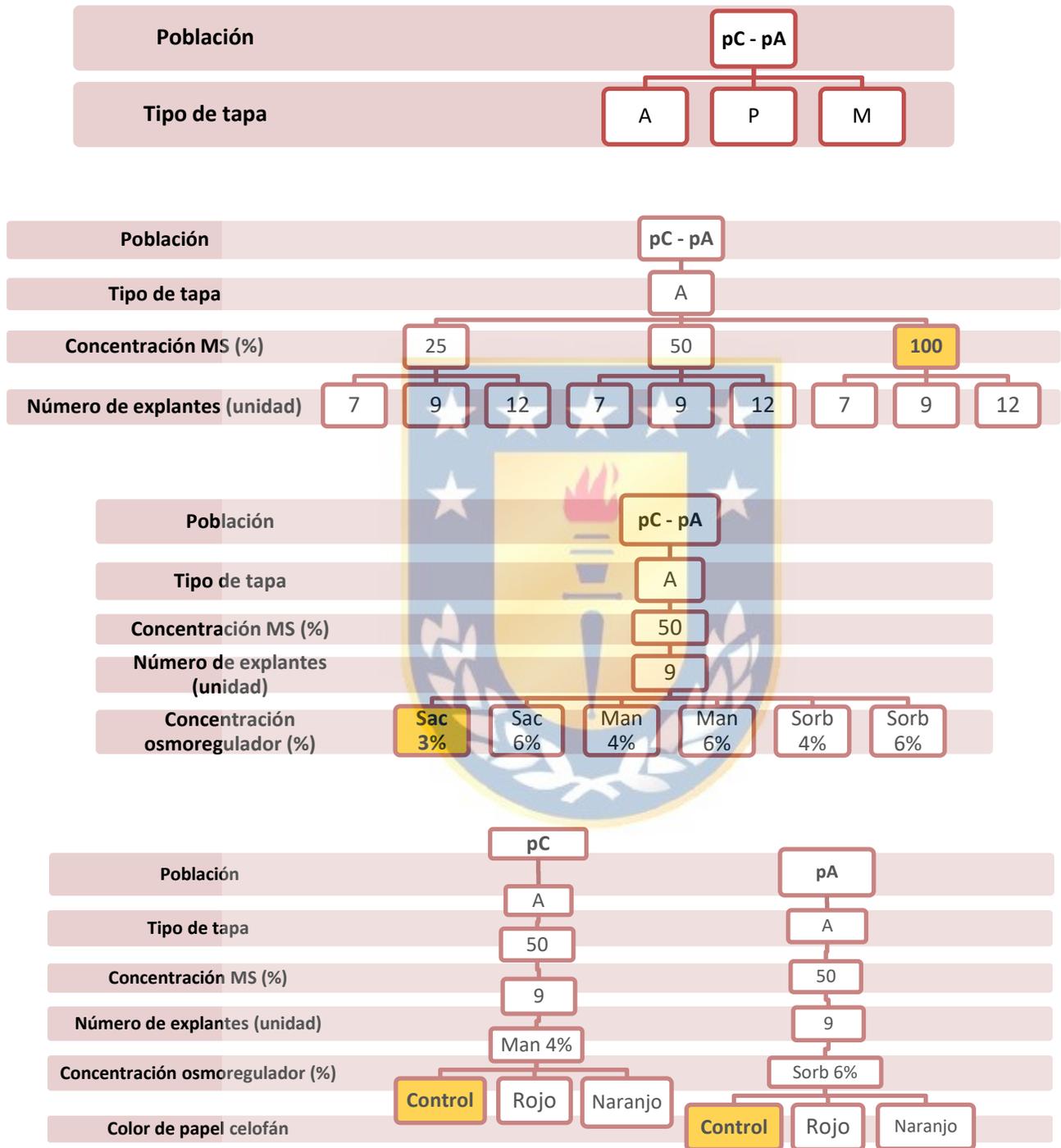


Figura 1. Esquema de las 4 etapas aplicadas en la conservación *in vitro* de *C. quitensis* poblaciones Arctowski (pA) y población Conguillío (pC), de arriba abajo, las etapas son etapa 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Las casillas en color amarillo son consideradas controles.

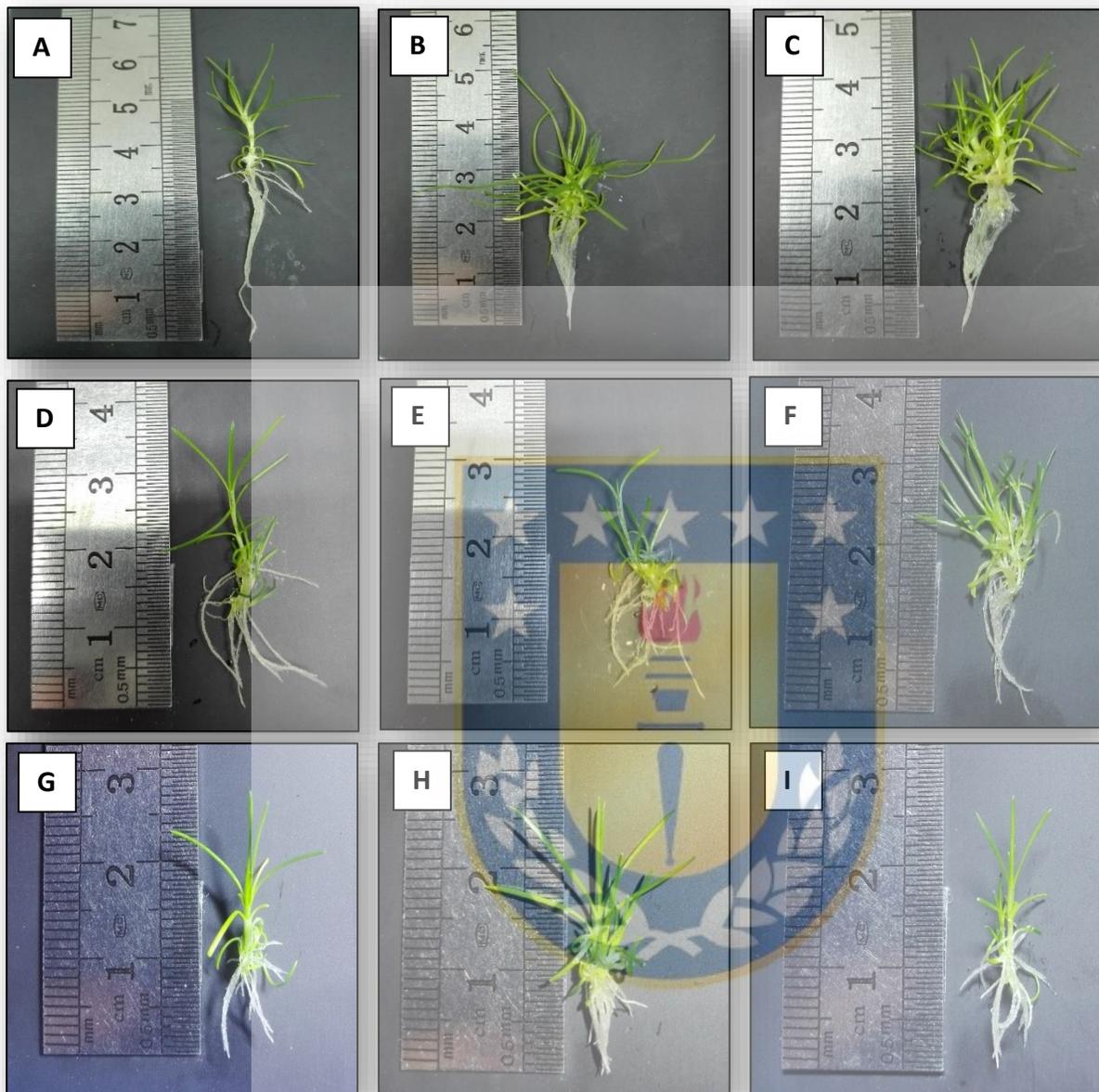


Figura 2. Efecto del uso de diferentes concentraciones de MS (100%, 50% y 25%) en plantas de *C. quitensis* pC, después de 30 días de cultivo. A, B, C: 100% de MS con 7, 9 y 12 explantes respectivamente. D, E, F: 50% de MS con 7, 9 y 12 explantes respectivamente. G, H, I: 25% de MS con 7, 9 y 12 explantes respectivamente.

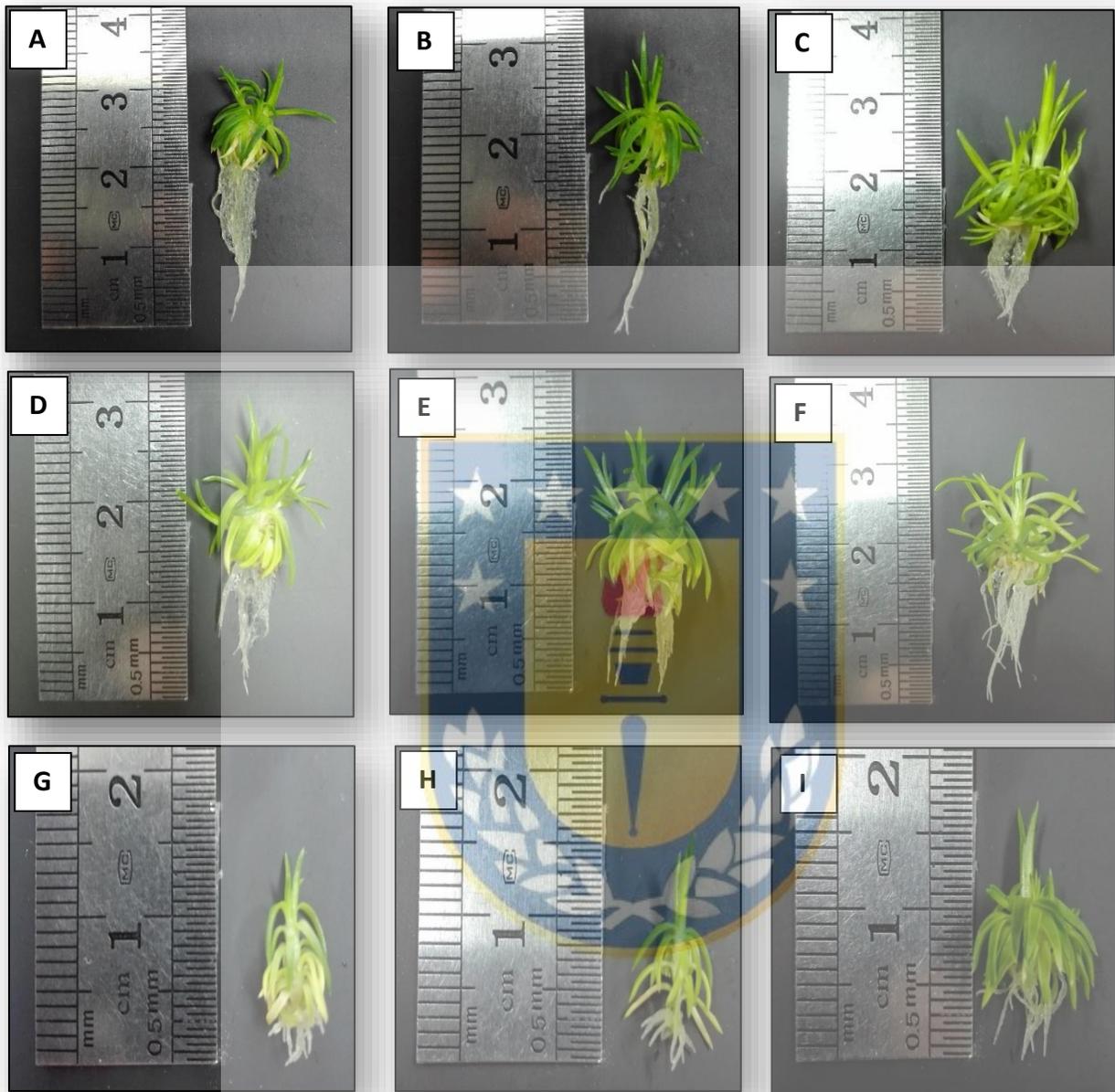


Figura 3. Efecto del uso de diferentes concentraciones de MS (100%, 50% y 25%) en plantas de *C. quitensis* pA, después de 30 días de almacenamiento. A, B, C: 100% de MS con 7, 9 y 12 explantes respectivamente. D, E, F: 50% de MS con 7, 9 y 12 explantes respectivamente. G, H, I: 25% de MS con 7, 9 y 12 explantes respectivamente.

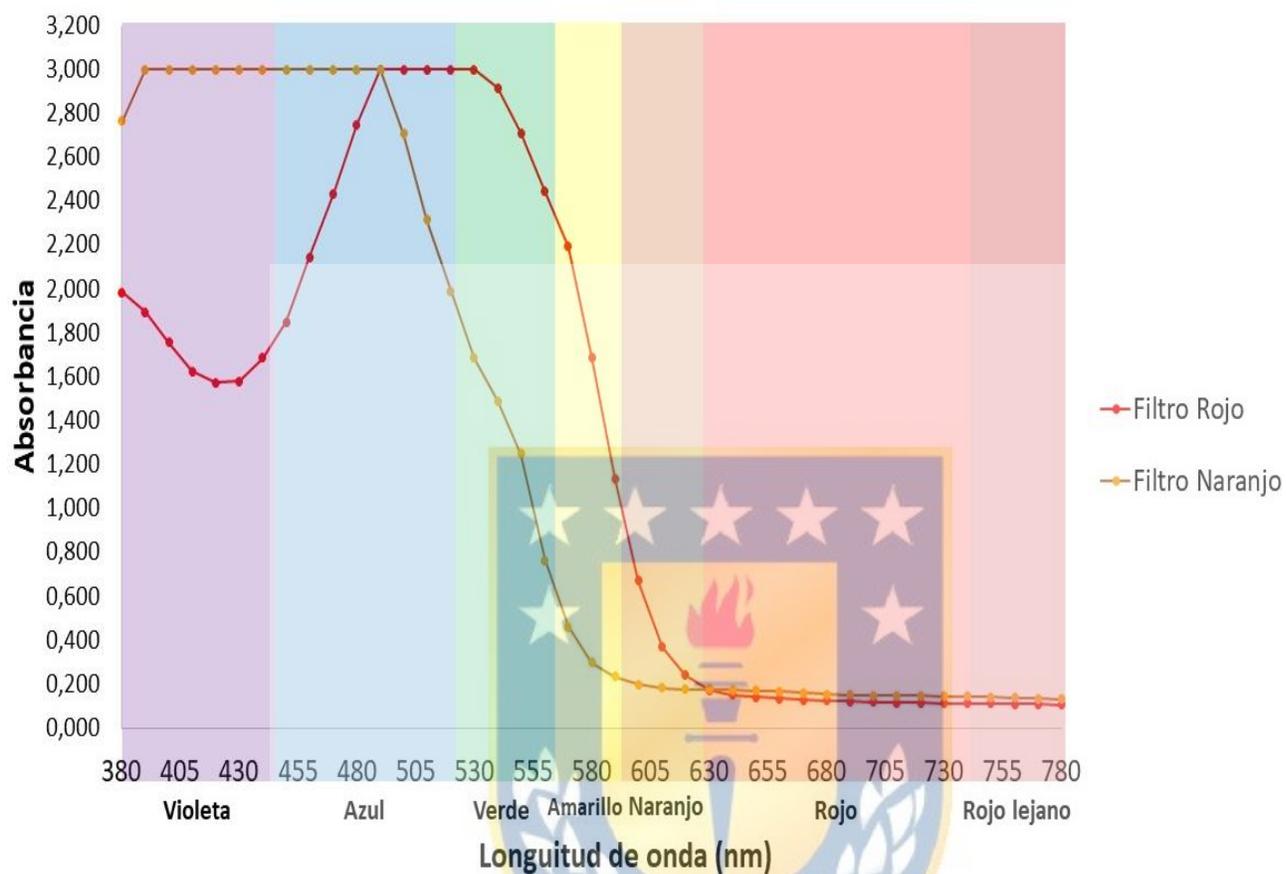


Figura 4. Curva de absorbancia de luz en papel celofán naranja y rojo. Rango de absorbancia establecido entre los 380 nm y los 780 nm (rango del espectro visible de la luz). Datos de absorbancia medidos en Espectrofotómetro Genesis 10S UV vis.