

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



**OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLO PARA LA CONSERVACIÓN *IN VITRO* EN
POBLACIONES DE *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.**

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

**SOLANGE ALEJANDRA ALVEAL YAÑEZ
LOS ÁNGELES - CHILE
2023**

**OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLO PARA LA CONSERVACIÓN *IN VITRO* EN
POBLACIONES DE *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.**

Alumno

Solange Alejandra Alveal Yañez
Ingeniero en Biotecnología Vegetal

Profesor Guía

Dra. Marely Cuba Díaz
Profesor Titular
Bióloga

Jefe de Carrera

Profesor Pedro Quiroz Hernández
Profesor Instructor
Ingeniero de Ejecución Forestal

Director Departamento

Dr. Marely Cuba-Díaz
Profesor Titular
Bióloga

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecerle a mí toda mi familia por ser mis pilares en este camino y por su apoyo incondicional hacia mí y Benjita, todo este camino hubiera sido más difícil sin ustedes, los amo inmensamente y siempre estaré para ustedes. A Benjamín que amo con todo mi corazón y todo lo que hago es por ti. A Rodrigo Burgos por compartir tus conocimientos y experiencia sin egoísmo, por estar siempre a mi lado, ser mi compañero de vida y de aventuras, por aparecer en mi vida y dejar la huella más bonita. Sin lugar a duda lo mejor de esta etapa fue encontrarte. A mi profesora guía, Doctora Marely Cuba-Díaz, agradezco su apoyo y confianza, por siempre considerar a sus alumnos, por motivarnos a vivir nuevas experiencias académicas. Por creer en mí y hacerme sentir capaz de lograr mis objetivos, muchas gracias. Al Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales y todos sus colaboradores por trabajar en equipo y los buenos momentos, en especial a Darío Navarrete por siempre estar dispuesto a enseñar y apoyar a todo quién lo necesite y Yadiana Ontivero por sus consejos y motivación para continuar mis estudios de postgrado, y a todos mis compañeros en especial a Fran, Thiare y Vicente, que formaron parte de él durante estos años, por darme la oportunidad de enseñarles y también aprender de ustedes cada día. También a todos los profesores que me formaron durante este período, por ser mis referentes y ganarse mi admiración (Prof. Daniela Muñoz, Carol Peña, Darío Navarrete, Patricio Sandoval). En especial al Profesor Eduardo Navarrete quien se percató de mi naturaleza “outlier” y me dio la oportunidad de participar en un hermoso proyecto conectándome con otra de mis pasiones. Agradezco con todo mi corazón a mis amigas y compañeras de este proceso, Marcela Díaz, Constanza Salgado y Vjeruscka Ruiz, gracias por todos los momentos compartidos, por las alegrías, las penas, las discusiones, consejos y risas. Y finalmente a todos y todas las personitas que conocí en mis años universitarios, por más corto que fuera el tiempo que compartimos créanme que dejó una huella en mi corazón, espero haber dejado una en los suyos.

Dedicada a la memoria de María Jesús Jofre (mi mamagi), gracias por tu amor noble e infinito...

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1 INTRODUCCIÓN	18
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 <i>Colobanthus quitensis</i> , Clavelito antártico.....	22
2.2 Cultivo <i>In Vitro</i>	23
2.3 Conservación <i>In Vitro</i>	24
2.4 Métodos de crecimiento mínimo <i>In Vitro</i>	26
2.5 Tipo de sellado del frasco de cultivo.....	28
2.6 Ácido abscísico (ABA) como inhibidor de crecimiento.....	29
2.7 Agente gelificante en el medio de cultivo.....	30
2.8 Inhibidor de etileno, Tiosulfato de plata (STS)	31
2.9 Antecedentes de la especie en estudio.....	33
3 HIPÓTESIS	35
4 OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo General	35
4.2 Objetivos específicos	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1 Preparación del Material vegetal.....	36
5.2 Medio basal y número de explantes para conservación.....	37
5.3 Etapa 1. Uso distintos tipos de sellado del medio de cultivo en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) como inhibidor de crecimiento.....	37
5.4 Etapa 2. Uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) Inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre las plantas de <i>C. quitensis</i>	38
5.5 Evaluación morfo-fisiológica de los explantes	38
5.6 Diseño experimental.....	40
6 RESULTADOS.....	40

6.1 Etapa 1 pA: Evaluación de distintos tipos de sellado y el uso de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) en el desarrollo morfofisiológico de <i>C. quitensis</i>	
- Población Arctowski (pA) <i>in vitro</i>	41
- Población Conguillio (pC) <i>in vitro</i>	44
6.2 Etapa 2 pA: Uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) y su efecto sobre plantas de <i>C. quitensis</i>	
- Población Arctowski (pA) <i>in vitro</i>	48
- Población Conguillio (pC) <i>in vitro</i>	51
7. DISCUSIÓN	53
7.1 Etapa 1. Uso distintos tipos de sellado del medio de cultivo en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) como inhibidor de crecimiento y su efecto sobre las plantas de <i>C. quitensis</i>	54
7.2 Etapa 2. Uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) Inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre las plantas de <i>C. quitensis</i>	57
8. CONCLUSIONES	62
9. BIBLIOGRAFÍA.....	64
10. ANEXOS	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Análisis de varianza de dos vías con valores p de la combinación de factores tapa y ABA para variables morfofisiológicas de *C. quitensis* para la población Arctowski (pA). El asterisco (*indica valores significativos($p < 0.05$)).....41

Tabla 2: Análisis de varianza de dos vías con valores p de la combinación de factores: tapa y ABA para variables morfofisiológicas de *C. quitensis* para la población Conguillio (pC). El asterisco (*indica valores significativos ($p < 0.05$)).....45

Tabla 3: Análisis de varianza de dos vías con valores p de la combinación de dos factores: concentración de agar y STS para variables morfofisiológicas de *C. quitensis* para la población Arctowski (pA). El asterisco (*indica valores significativos ($p < 0.05$)).....49

Tabla 4: Análisis de varianza de dos vías con valores p de la combinación de factores: concentración de agar y STS para variables morfofisiológicas de *C. quitensis* para la población Conguillio (pC). El asterisco (*indica valores significativos ($p < 0.05$)).....51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el largo foliar de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....42

Figura 2. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el porcentaje de amarillamiento de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....43

Figura 3. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el porcentaje de supervivencia de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....43

Figura 4. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el Fv/Fm de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....44

Figura 5. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico

(ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el Contenido Relativo de Agua (CRA) de *Colobanthus quitensis* para la población Conguillio (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan (p≤0,05), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....45

Figura 6. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el largo foliar de *Colobanthus quitensis* para la población Conguillio (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan (p≤0,05), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....46

Figura 7. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el largo raíz de *Colobanthus quitensis* para la población Conguillio (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan (p≤0,05), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....46

Figura 8. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el número de brotes de *Colobanthus quitensis* para la población Conguillio (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan (p≤0,05), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....47

Figura 9. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el porcentaje de amarillamiento de *Colobanthus quitensis* para la población Conguillio (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*.

Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....48

Figura 10. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 μM) inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el porcentaje de amarillamiento de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....49

Figura 11. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el porcentaje de supervivencia de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....50

Figura 12. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el Fv/Fm de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....50

Figura 13. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el largo foliar de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican

diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....52

Figura 14. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar(0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el largo de raíz de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....52

Figura 15. Comparación fotográfica de variables morfológicas en plantas de *C. quitensis* población Arctowski (pA) a los 30 días en medio de propagación vs a los 90 días en medio de conservación (protocolo completo).....55

Figura 16. Comparación fotográfica de variables morfológicas en plantas de *C. quitensis* población Conguillio (pC) a los 30 días en medio de propagación vs a los 90 días en medio de conservación (protocolo completo).....54

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el largo de raíz de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan (p≤0,05), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....78

ANEXO 2. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mg L⁻¹) sobre el Contenido Relativo de Agua (CRA) de *Colobanthus quitensis* para la población Conguillio (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan (p≤0,05), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....78

ANEXO 3. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mg L⁻¹) sobre el número de brotes de *Colobanthus quitensis* para la población Conguillio (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan (p≤0,05), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....79

ANEXO 4. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mg L⁻¹) sobre el porcentaje de supervivencia de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan (p≤0,05), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....79

ANEXO 5. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mg L⁻¹) sobre el Fv/Fm de *Colobanthus quitensis* para la población

Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....80

ANEXO 6. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0, 0,5 y 10 μM) inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el contenido relativo de agua de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....80

ANEXO 7. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0, 0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el largo foliar de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....81

ANEXO 8. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar(0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0, 0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el largo de raíz de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....81

ANEXO 9. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar(0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0, 0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el número de brotes de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*.

Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....82

ANEXO 10. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0, 0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el contenido relativo de agua de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....83

ANEXO 11. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0, 0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el número de brotes de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....83

ANEXO 12. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0, 0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el porcentaje de supervivencia de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....85

ANEXO 13. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0, 0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el largo de raíz de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican

diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).....85

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	: ácido indolacético
ANDEVA	: análisis de varianza
ANOVA	: análisis de varianza
BAP	: 6-Bencil-aminopurina
cm	: centímetro
F_v/F_m	: relación Fluorescencia variable y máxima de la fluorescencia
LBEA	: Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales
mg	: miligramo
mL	: mililitro
Man	: manitol
MS	: medio Murashige and Skoog
m.s.n.m.	: metros sobre el nivel del mar
mgL^{-1}	: miligramo por litro
mm	: milímetro
pA	: población Arctowski
pC	: población Conguillío
PSII	: fotosistema II
Sac	: Sacarosa
Man	: Manitol
Sorb	: Sorbitol
STS	: Tiosulfato de plata
μL	: Microlitro
μM	: Micromolar
$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$: Micromoles por metro cuadrado por segundo
$^{\circ}\text{C}$: Grados Celsius

RESUMEN

La conservación *in vitro* constituye una herramienta esencial para la mantención e intercambio de recursos fitogenéticos a nivel mundial, ofreciendo una serie de ventajas como condiciones asépticas, disminución de costos por subcultivos y material genético rápidamente disponible. Una alternativa de conservación *in vitro* es el método de crecimiento mínimo, donde se busca disminuir la actividad fisiológica y metabólica de los tejidos vegetales, modificando factores ambientales y la composición del medio de cultivo extendiendo los períodos entre subcultivos de corto a mediano plazo. *Colobanthus quitensis*, planta nativa de la Antártica, es considerada una especie modelo por su capacidad de adaptarse a condiciones abióticas extremas, desplegando mecanismos de tolerancia especializados que resultan interesantes para la ciencia. El objetivo de la investigación fue generar un protocolo para la conservación *in vitro* de la especie, manipulando varios factores ambientales y en el medio de cultivo; p.ej. número de explantes, reducciones minerales, concentraciones del gelificante y adición de otros compuestos, para extender los períodos de subcultivo y obtener plantas en buen estado fisiológico para la colección activa de *C. quitensis*. Se utilizaron explantes *in vitro* de dos poblaciones de *C. quitensis*, y se trabajó en etapas considerando los mejores resultados para la siguiente a partir de evaluaciones morfo-fisiológicas. La reducción de sales minerales al 50%, 12 explantes por frasco, el uso de film como tipo de sellado, la adición de manitol al 4% como osmorregulador, ABA 0,5 mgL⁻¹ como inhibidor de crecimiento, STS 10μM como inhibidor de etileno y agar al 0,7% como agente gelificante, lograron una extensión del tiempo de subcultivo de 30 a 90 días facilitando la conservación de *C. quitensis* con una óptima eficiencia fotosintética. Estos resultados constituyen una herramienta para futuros estudios genéticos y fisiológicos en respuesta a condiciones adversas y de aplicaciones biotecnológicas en esta y otras especies.

ABSTRACT

In vitro conservation is an essential tool for the maintenance and exchange of plant genetic resources worldwide, offering a series of advantages such as aseptic conditions, reduced costs for subcultures and rapidly available genetic material. One alternative for *in vitro* conservation is the minimum growth method, which seeks to reduce the physiological and metabolic activity of plant tissues, modifying environmental factors and the composition of the culture medium, extending the periods between subcultures from short to medium term. *Colobanthus quitensis*, a plant native to Antarctica, is considered a model species for its ability to adapt to extreme abiotic conditions, displaying specialized tolerance mechanisms that are interesting for science. The objective of the research was to generate a protocol for the *in vitro* conservation of the species, manipulating several environmental and culture medium factors, for example: number of explants, mineral reductions, concentrations of the gelling agent and addition of other compounds, to extend the subculture periods and obtain plants in good physiological condition for the active collection of *C. quitensis*. *In vitro* explants of two populations of *C. quitensis* were used, and work was done in stages considering the best results for the next stage based on morpho-physiological evaluations. The reduction of mineral salts to 50%, 12 explants per flask, the use of film or cellophane as sealing type, the addition of 4% mannitol as osmoregulator, ABA 0,5 mgL⁻¹ as growth inhibitor, STS 10µM as ethylene inhibitor and 0,7% agar as gelling agent, achieved an extension of the subculture time from 30 to 90 days, facilitating the conservation of *C. quitensis* with optimal photosynthetic efficiency. These results constitute a tool for future genetic and physiological studies in response to adverse conditions and biotechnological applications in this and other species.

1. INTRODUCCIÓN

La propagación *in vitro* de material vegetal fue propuesta con el objetivo de mejorar la productividad agrícola de muchas especies a partir del mantenimiento de diferentes especies y genes de interés, permite mantener un cultivo en condiciones asépticas y en un ambiente controlado, y las plantas pueden estar rápidamente disponibles cuando se requiera (García et al. 2007). Una de las desventajas de la propagación vegetal es el costo por la demanda de materiales y equipamiento especializado, además de requerir mano de obra constante para los procesos de subcultivo para evitar el envejecimiento vegetal (Suárez 2015). Una alternativa es la conservación *in vitro* mediante el método de crecimiento mínimo, cuyo objetivo es disminuir la actividad fisiológica y metabólica de los tejidos vegetales, modificando las condiciones de crecimiento y extendiendo el período entre subcultivos, permitiendo a los explantes permanecer *in vitro* hasta por 12 meses, garantizando la conservación del patrimonio genético de las especies y sus poblaciones de corto a mediano plazo (Smith 2012). Además, reduce el riesgo de perder germoplasma por errores de manejo y disminuye el riesgo de inestabilidad genética debido a la reducción del número de subcultivos economizando espacio de almacenamiento, mano de obra y reduciendo costos (Benelli et al. 2022). Para lograr un crecimiento mínimo en cultivo *in vitro* se recurre a la modificación de variables como, por ejemplo, la reducción en la concentración de elementos minerales y/o carbohidratos metabolizables en el medio de cultivo, el aumento de las concentraciones del gelificante, el uso de osmorreguladores para aumentar el potencial osmótico del medio, añadir reguladores de crecimiento u otras sustancias adicionales al medio de cultivo para lograr un lento crecimiento vegetal (García et al. 2007; Suárez 2015). Al aplicar métodos como el crecimiento mínimo, se puede prolongar la viabilidad y estabilidad de las líneas genéticas almacenadas, lo que garantiza su disponibilidad para futuros programas de mejora genética, investigación científica, conservación y restauración ambiental. Existen numerosos programas de conservación de germoplasma de distintas especies vegetales en todo el mundo, donde es crucial desarrollar metodologías de recolección, conservación y preservación de las especies vegetales (INIA 2022). La Antártida alberga una variedad única de plantas

adaptadas a condiciones extremas de frío, viento y radiación solar, sin embargo actualmente no contamos con una colección activa de germoplasma. Estas plantas pueden proporcionar información invaluable sobre cómo las plantas sobreviven y se adaptan a condiciones ambientales extremas, su germoplasma podría contener genes únicos que podrían ser útiles para comprender mejor la biología de las plantas, los mecanismos de adaptación al estrés ambiental como el frío, la sequía o la salinidad del suelo para mejorar cultivos agrícolas por ello es fundamental preservar la biodiversidad única del continente antártico. *Colobanthus quitensis* KUNTH Bartl., es la única planta dicotiledónea que vive de forma natural en la Antártica y además posee una amplia distribución por la cordillera de Los Andes hasta el sur de México (Moore 1970). Dado su amplia distribución y el aislamiento en que se han desarrollado las diversas poblaciones de esta especie es que se han generado ecotipos adaptados a ambientes particulares (Gianoli et al. 2004; Sierra-Almeida et al. 2007; Molina-Montenegro et al. 2012). Esta especie muestra una considerable variabilidad genética y una amplia plasticidad fenotípica entre sus poblaciones y sus diferentes localidades (Gianoli et al. 2004; Sierra-Almeida et al. 2007; Cuba-Díaz et al. 2017a); diferenciación fenotípica que se mantiene incluso después de propagarse en condiciones de jardín común (Cuba-Díaz et al. 2017a). Estas variaciones fenotípicas son atribuibles a la influencia de factores ambientales, pero recientemente se han recopilado antecedentes que permiten relacionarlos con variabilidad genética (Androsiuk et al. 2015, Cuba-Díaz et al. 2017a, b; Koc et al. 2018; Biersman et al. 2020). Se han establecido dos ecotipos para *C. quitensis* clasificándola entre poblaciones antárticas y poblaciones andinas a través de diferentes estudios de adaptación al frío, análisis morfológicos, diversidad genética y análisis moleculares (Gianoli et al. 2004). Dentro de estos ecotipos se encuentran la población Arctowski (pA) situada en la isla Rey Jorge en la Antártica marítima y la población Conguillío (pC) ubicada en el Parque Nacional Conguillío en la Región de la Araucanía de Chile. Ambas poblaciones poseen una clara diferenciación morfológica entre ellas atribuida a la influencia de factores ambientales y condiciones abióticas estresantes a lo largo de su distribución (Cuba-Díaz et al. 2017). Para resistir los cambios ambientales de sus

respectivos sitios de origen, esta especie despliega una serie de mecanismos que le permiten adaptarse a condiciones edafoclimáticas adversas. Se han descrito mecanismos de tolerancia para esta especie relacionados con temperaturas congelantes (Bravo et al. 2001, 2007; Bascuñan-Godoy et al. 2006, 2012), altas intensidades lumínicas (Pérez-Torres et al. 2004), fuertes vientos y adaptación al cambio climático (Sáez et al. 2018), todo esto ha llevado a considerarla un excelente candidato y planta modelo para diversos estudios de mecanismos de tolerancia a condiciones adversas (Cuba-Díaz et al. 2017).

El objetivo de esta investigación fue optimizar protocolos para la conservación *in vitro* de individuos de *C. quitensis*, con el fin de mantener un crecimiento mínimo adecuado de los explantes en condiciones físicas y químicas que permitan extender al máximo el intervalo de subcultivos, evitando síntomas indeseables como el amarillamiento y desarrollando plantas con un buen estado fisiológico para el desarrollo de futuras investigaciones en el laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales (LBEA). El uso de algunas de las variables antes mencionadas puede ser una estrategia importante para controlar el crecimiento de *C. quitensis*. Para esta investigación se utilizaron explantes provenientes de plántulas previamente establecidas en cultivo *in vitro* de dos poblaciones de *C. quitensis*, Arctowski (pA) y Conguillio (pC). Se evaluaron variables morfológicas y fisiológicas en cada una de las etapas como: largo foliar, longitud radicular, número de brotes y número de ápices florales, porcentaje de amarillamiento, porcentaje de supervivencia de los explantes, actividad fotosintética y contenido relativo de agua de las plántulas. Esta investigación contribuye al cumplimiento de Los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 de las Naciones Unidas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Colobanthus quitensis*, Clavelito antártico

Colobanthus quitensis (Kunth) Bartl., también llamada clavelito antártico es una planta vascular de la familia Cariophyllaceae (Alberdi et al. 2004). Es la única dicotiledónea que crece de forma natural en la Antártica y es una de las dos únicas plantas vasculares nativas que habitan en estas condiciones ambientales extremas (Zúñiga et al. 2009). Esta especie tiene una amplia distribución geográfica, desde México 17° N, hasta el norte de la península Antártica 68 °S y desde los 0 hasta 4200 m.s.n.m. (Moore 1970; Greene y Holtom 1971; Lewis-Smith 2003; Convey et al. 2011, Acuña-Rodríguez et al. 2017; Cuba-Díaz et al. 2017a; b) donde siempre está sometida a condiciones edafoclimáticas adversas como: vientos desecantes, temperaturas congelantes, alta radiación ultravioleta, baja disponibilidad de agua y nutrientes, régimen de iluminación estacional, entre otras (Convey 1996, Chwedorzewska 2009). En Chile, ha sido descrita en varias provincias a lo largo de la Cordillera de Los Andes y en O'Higgins (Moore 1970). En el norte está localizada típicamente en vegas a altas latitudes a través de Los Andes chilenos (sobre los 2500 m.s.n.m.), pero muy cercano al nivel del mar en las latitudes más polares (Moore 1970, Lewis-Smith 2003). *C. quitensis*, es una planta perenne muy pequeña con tallos simples o ramificados, crece en forma de cojín, semiesféricas o en forma de esfera llegando a medir varios centímetros (Aubert et al. 2014). Estos cojines compactados crecen de aproximadamente 10 cm de diámetro y alcanzan una altura mínima de 1,5 cm y una altura máxima de 8 cm aproximadamente (Lewis-Smith 2003). Su anatomía foliar es típica de xerófitas con mesófilos gruesos, estomas pequeños y cutículas cerosas. Consta de hojas lignificadas de hasta 225 mm de espesor y alargadas que varían en forma y largo, además de un metabolismo fotosintético, contribuyentes para una exitosa supervivencia en la Antártida (Mantovani y Cardoso 2000). *C. quitensis* en condiciones naturales es capaz de autofecundarse y reproducirse de manera vegetativa (Lewis-Smith 2003; Klagges et al. 2013).

La amplia distribución latitudinal y altitudinal, la variabilidad climática y geográfica ha permitido a esta especie desarrollar plasticidad fenotípica y una amplia diferenciación genética entre sus poblaciones a lo largo de su gradiente de distribución (Gianoli et al. 2004; Cuba-Díaz et al. 2017b) exhibiendo una variación morfológica considerable dependiendo de sus hábitats (Gianoli et al. 2004; Cho et al. 2018). Es esta amplia diferenciación morfológica, lo que sugiere formación de ecotipos en esta especie (Smith 2003; Gianoli et al. 2004; Cordero 2012) con suficiente plasticidad para resistir los cambios ambientales, pero con suficiente diferenciación fenotípica para responder consistentemente a las condiciones ambientales de sus respectivos sitios de origen (Molina-Montenegro et al. 2012). Además, es capaz de ajustar su crecimiento y desempeño fotosintético en respuesta a los efectos (aumento de temperatura y disponibilidad hídrica) del cambio climático en su hábitat (Sáez et al. 2018). Son todas estas características que convierten a *C. quitensis* en un excelente candidato para estudiar mecanismos de tolerancia a las condiciones abióticas extremas y hace considerarla como una planta modelo para estudios sobre mecanismos ecofisiológicos y moleculares de adaptación al estrés (Cuba-Díaz et al. 2014). Se han establecido dos ecotipos para *C. quitensis* clasificándola entre poblaciones antárticas (Base Arctowski, Bahía Almirantazgo, Isla Rey Jorge/Shetland del Sur) y poblaciones andinas (Cerro la Parva/Región Metropolitana, Chile) a través de diferentes estudios de adaptación al frío, características morfológicas, análisis de diversidad genética ITS y análisis moleculares (Gianoli et al. 2004). Dentro de estos ecotipos se encuentran la población Arctowski (pA) situada en la isla Rey Jorge/ islas Shetland del Sur en la Antártica marítima cercana a la base polaca Henry Arctowski (62°09'S; 58°28'W) y la población Conguillío (pC) ubicada en el Parque Nacional Conguillío en la Región de la Araucanía de Chile (38°36'S; 71°36'W). Ambas poblaciones con clara diferenciación morfológica como en longitud y ancho de hoja, longitud de la raíz principal y diámetro de la corona (Cuba-Díaz et al. 2017), todos ellas atribuidos a la respuesta influenciada por factores ambientales y las condiciones abióticas estresantes que soportan en a lo largo de su distribución (Haider et al. 2011). En el laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales de la Universidad Concepción

campus Los Ángeles, se encuentra una Colección Activa de Plantas Vasculares Antárticas (CAPVA), con una amplia representación de individuos de *C. quitensis* de varias ubicaciones geográficas, donde el material vegetal se mantiene en condiciones de jardín común e *in vitro* lo cual permite que este material vegetal y de semillas esté disponible para diversas investigaciones (Cuba-Díaz et al. 2014; Cuba-Díaz et al. 2020) como por ejemplo, para estudios de tolerancia iones cobre (Marín 2015; Cuba-Díaz et al. 2017), estudios de tolerancia a salinidad (NaCl) (Castel 2015; Klagges 2015; Arriagada 2017; Cuba-Díaz et al. 2017; Arroyo 2023), estudios de la respuesta morfo-fisiológica y metabólica de *C. quitensis* frente a cloruro de sodio, iones cobre y frío (Arriagada 2017), estudios de variabilidad fenotípica y diferenciación genética en poblaciones *C. quitensis* (Cuba-Díaz et al. 2017a) entre muchas otros, donde se ha evidenciado que sus poblaciones presentan respuestas morfofisiológicas y bioquímicas diferentes. Algunas de ellas ajustan su crecimiento sin efectos negativos mientras otras realizan ajustes en la síntesis de compuestos compatibles como prolina o azúcares, o despliegan mecanismos de detoxificación celular por incremento de actividades enzimáticas relacionadas con regulación de los niveles de ROS (Castel 2015; Klagges 2015; Cuba-Díaz et al. 2017; Arriagada 2017; Arroyo 2023).

2.2 Cultivo *In Vitro*

Los medios convencionales de propagación tienen varios inconvenientes: en semillas: resistencia en muchas plantas, pérdida de viabilidad después de cierto período, mala germinación en muchas plantas leñosas; en plántulas: crecimiento lento, número limitado, baja supervivencia y ausencia de modo sexual de reproducción, entre otras (Visscher et al. 2022). Frente a esto existe un sistema eficaz para la producción de plantas a gran escala. El cultivo de tejidos vegetales es una técnica biotecnológica que comprende el mantenimiento de plantas o partes de éstas en condiciones controladas, en ausencia de microorganismos asociados, con nutrición heterotrófica y en recipientes de plástico o vidrio (Suárez 2015). El cultivo de tejidos vegetales se ha convertido en una tecnología importante y tiene

aplicaciones más amplias en diversos campos, como la producción de plantas a gran escala y mejoramiento genético de plantas (la producción de híbridos, plantas libres de enfermedades) (Kumari et al. 2023). Además de aplicaciones industriales como la producción de compuestos bioactivos, metabolitos secundarios, cosméticos, biocombustibles, entre otros (Lakhera et al. 2018). El cultivo de tejidos *in vitro* o los sistemas con condiciones ambientales controladas ofrecen magníficas oportunidades para la producción de poblaciones de élite genéticamente superiores (Cruz-cruz et al. 2013; Thangavel et al. 2014). Esta técnica biotecnológica de cultivo es posible debido a la totipotencialidad celular que se basa en que toda célula viva e íntegra de una planta, sin importar el grado de especialización alcanzado, es capaz de regenerar una planta completa igual a la original (Sharry 2020). Se debe considerar la composición del medio de cultivo pues determina la respuesta morfológica, estimula la diferenciación y crecimiento de tejidos vegetales (Leva y Rinaldi 2012). Un medio de cultivo contiene generalmente macro y micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes reguladores del crecimiento y agua que son esenciales para la planta (Isah 2015; Sharry 2020), la capacidad de regeneración de las plantas se puede ver afectada por la composición del medio básico (Sundararajan et al. 2017; Chimesa 2020; Gerdakaneh et al. 2020) así como el tipo de explante (Minutolo et al. 2020). Por lo tanto, la presencia, combinación y concentración de estos múltiples factores que definen el medio de cultivo dependerá de los objetivos de investigación que se persigan. El cultivo *in vitro* como técnica de propagación de plantas, proporciona ciertas ventajas comparativas sobre las técnicas tradicionales de propagación a nivel macro, tales como mayores tasas de multiplicación en períodos de tiempo y espacios más reducidos, la obtención de material libre de patógenos, obtención de plantas con grados de uniformidad genética y fenotípica, reducción de costos y riesgos de pérdidas en el almacenamiento de germoplasma (Mohan 2011; Suárez 2015). Cada especie vegetal necesita un tipo diferente de medio de crecimiento y un protocolo específico, que permita la producción a gran escala de materiales libres de enfermedades y de calidad superior. Según los requisitos, los cultivos se pueden almacenar a corto, mediano o largo plazo mediante subcultivos en varios medios de cultivo

(Rajasekharan y Sahijram 2015; Vijayan et al. 2018). El uso de las técnicas varía en función de la duración y objetivo de almacenamiento, por lo tanto, las técnicas de cultivo *in vitro* pueden usarse para la preservación de especies de plantas económicamente importantes, así como varias especies raras, en peligro y amenazadas (Chandran et al. 2023).

2.3 Conservación *In Vitro*

Uno de los problemas más apremiantes de la biología es la preservación de la diversidad genética de los organismos vivos. La biodiversidad de un hábitat determinado puede verse afectado por varios factores tales como; el efecto del cambio climático, la destrucción de los ecosistemas naturales, los desastres naturales, especies invasoras, entre otras. Diversos estudios sugieren que alrededor del 20% de las plantas del mundo están amenazadas de extinción (Johannes et al. 2019) por ello es muy importante las estrategias de conservación que abarcan la protección, rescate, mantención, estudio y uso sustentable del patrimonio biológico y es vital para mantener la diversidad genética de especies de un país o región, así como sus interacciones y los procesos evolutivos que las originan (MINAGRI 2014). La conservación genética es importante no sólo para los cultivos económicamente importantes sino también para las plantas raras y en peligro de extinción. Su desaparición puede afectar gravemente a otras especies, provocando con ello un desequilibrio ecológico. Los peligros conocidos de la erosión genética de los recursos fitogenéticos han impulsado movimientos políticos y científicos en todo el mundo para conservar los recursos fitogenéticos durante los últimos 50 años (Fu 2017). Las herramientas biotecnológicas modernas se han desarrollado como estrategias más rápidas y eficaces para conservar los recursos fitogenéticos (Nhut 2022). El mantenimiento de plantas o partes de ellas, en condiciones ambientales asépticas y adecuadas, se basa en la multiplicación del material sin perturbar su crecimiento, es decir, la transferencia sucesiva en un medio fresco, mientras que el segundo se basa en la conservación en condiciones de crecimiento lento (Withers 1980; Engelmann 1991; Sarasan et al. 2006; Tokhtar et

al. 2020). La conservación *in vitro* constituye parte esencial de la estrategia general de conservación y el intercambio de recursos genéticos en todo el mundo (García et al. 2007; Corredoira et al. 2011; Ifeanyi et al. 2016). La conservación del germoplasma de una especie es prioridad para mantener la variabilidad genética inter e intraespecífica, así como la de sus accesiones. Las estrategias de conservación *ex situ*, en campo, presentan riesgo de pérdida por condiciones climáticas adversas, ataque de agentes patógenos, altos costos asociados al manejo agronómico, preparación de terreno, insumos y dificultad del manejo e intercambio de material (Trujillo et al. 2019). No obstante, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales permiten mantener las plántulas en bancos de germoplasma *in vitro*, libres de patógenos, en espacio reducido, a bajo costo y condiciones controladas que facilitan el manejo a corto y largo plazo de material vegetal, particularmente, de especies con propagación vegetativa (Bonilla 2015) y facilita el control de factores que afectan el crecimiento de cada especie.

El principal objetivo de los bancos de germoplasma *in vitro* es evitar la erosión genética conservando la biodiversidad las especies vegetales que presentan semillas botánicas de corta y poca viabilidad, cultivos de propagación vegetativa o clonal, o que son altamente heterocigóticos y requieren ser propagados vegetativamente para conservar su integridad genética (García et al. 2007) y permite la gestión, la producción a gran escala y el intercambio internacional de colecciones de élite de germoplasma libre de enfermedades en una forma genéticamente estable mediante cultivo de tejidos (Chandran et al. 2023).

Existen varios métodos de conservación *in vitro* y se pueden agrupar por períodos de tiempo: corto plazo, mediano plazo y largo plazo. La conservación de corto a mediano plazo (3-12 meses), generalmente se logra reduciendo el crecimiento de los cultivos *in vitro* mediante la aplicación de medios mínimos y retardantes de crecimiento o almacenamiento a bajas temperaturas, lo que resulta en intervalos prolongados entre los subcultivos (Chauhan et al. 2019). Para la conservación a largo plazo de especies vegetales (>12 meses), comúnmente se emplea la criopreservación (almacenamiento en nitrógeno líquido a -196°C) para conservar el patrimonio genético de las especies y sus poblaciones (Corredoira et al. 2011;

Bhojwani y Dantu 2013). Sin embargo, las principales dificultades asociadas a la criopreservación son el mantenimiento de los cultivos *in vitro*, ya que el procedimiento es muy técnico y costoso, ya que implica una gran cantidad de recursos y mano de obra (Pence 2011; Chauhan et al. 2019). Por lo tanto, el almacenamiento *in vitro* de crecimiento lento permite una posible solución para la conservación a medio y largo plazo de materiales vegetales en un espacio limitado y también a costes reducidos. El uso de las técnicas varía en función de la especie, la duración y objetivo.

2.4 Métodos de crecimiento mínimo *In Vitro*

El método de crecimiento mínimo *in vitro* es un método de conservación a corto o mediano plazo. El método de crecimiento lento se considera el método de conservación a mediano plazo más aceptado y recomendado, que restringe directamente el crecimiento y desarrollo del tejido (Raghu et al. 2018). Los procedimientos de crecimiento lento permiten la conservación de plantas clonales durante varios meses o años (dependiendo de la especie) en condiciones asépticas, lo que requiere transferencias sucesivas poco frecuentes de los cultivos (Chauhan et al. 2019). Este método se basa en disminuir la actividad fisiológica y metabólica de los tejidos vegetales, al modificar las condiciones de crecimiento para extender el período entre subcultivos y mantener los explantes *in vitro* hasta 12 meses sin afectar la viabilidad de los tejidos ni las tasas de crecimiento y desarrollo del material una vez transferido a condiciones ideales de cultivo. Para ello se recurre a la manipulación de la composición del medio de cultivo y/o la modificación de las condiciones de incubación (Sharry 2020). Entre estos enfoques, se puede aumentar el potencial osmótico del medio mediante el uso de carbohidratos no metabolizables, tales como el manitol, mayor concentración de gelificantes y adición/supresión de reguladores de crecimiento, por lo anterior el explante absorbe los nutrientes de manera lenta reduciendo el crecimiento (Sánchez-chiang y Jiménez 2010; Engelmann 2011). Lo anterior combinado con otros factores físicos

de acuerdo con la especie como: intensidad lumínica, disminución en la disponibilidad de oxígeno del recipiente y temperaturas relativamente bajas ($<10^{\circ}\text{C}$), disminuyen la velocidad de las reacciones internas de los tejidos vegetales, lo cual conduce a los tejidos a un estado cercano al reposo total (Normah et al. 2011; Suárez et al. 2011). Varios parámetros influyen en la eficiencia de los procedimientos de almacenamiento de crecimiento lento *in vitro* que incluyen la selección de explantes, su estado químico/fisiológico durante el almacenamiento, el tipo de recipiente de cultivo, su volumen, así como el volumen de un medio de cultivo utilizado para el almacenamiento (Niino y Arizaga 2015). 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).

2.5 Tipo de sellado del frasco de cultivo

Los tejidos vegetales cultivados *in vitro* producen compuestos gaseosos que pueden acumularse en niveles elevados en sistemas de cultivo cerrados y semicerrados. El microambiente gaseoso (Lambardi et al. 1997; Kumar et al. 1998) y, en particular, el tipo de vaso cerrado puede afectar fuertemente la morfogénesis y el crecimiento de los cultivos de plantas (Marino y Noferini 2013; Cati et al. 2014). Para el desarrollo del cultivo *in vitro* es necesario garantizar tanto las condiciones físicas como químicas para la proliferación y buen desarrollo del cultivo. Dentro de los parámetros físicos destacan la luz, la temperatura y el recipiente donde el cultivo se desarrolla (Bhojwani y Dantu 2013). En el mercado se dispone de una amplia variedad de recipientes para el desarrollo del cultivo de tejidos, desde frascos de vidrio hasta recipientes de diferentes tipos de plásticos; ejemplo: policarbonato, polipropileno y más recientemente poliestireno. Generalmente, los más usados son frascos de vidrio de diferentes volúmenes y frascos plásticos "Magenta TM", el uso de éstos incluye además los diferentes tipos de coberturas, que pueden incluir

tapones de algodón no absorbentes, tapones de espuma de ponganretano, tapones de plástico, papel aluminio, tapas de acero inoxidable, y más recientemente varios tipos de tapas de plástico de polipropileno, PVC, formado por películas de polietileno, etc. (Prakash et al. 2004). La selección del recipiente y la cobertura adecuada dependen de muchos factores, donde destacan los físicos y biológicos tales como: la entrada de la luz adecuada para el desarrollo del cultivo, el intercambio de gases y que impida la entrada de microorganismos potencialmente contaminantes; los factores químicos relacionados con la toxicidad que ciertos materiales pueden producir al cultivo, fundamentalmente con reiterados usos y esterilizaciones; y hasta los factores económicos relacionados con el alto costo de algunos de estos recipientes y sus coberturas (Prakash et al. 2004). Es por todo lo anterior que para fines de conservación de germoplasma no sólo son importantes los parámetros como el estado metabólico y fisiológico del explante en el momento del almacenamiento, sino también los tipos de recipientes que estamos utilizando y su volumen, el cierre de los frascos, entre otros, tienen un papel importante en la tasa de éxito del almacenamiento de crecimiento lento (Engelmann 2011).

2.6 Ácido abscísico (ABA) como inhibidor de crecimiento

Los retardantes del crecimiento son compuestos químicos naturales/sintéticos que se pueden aplicar en el medio de cultivo para cambiar procesos vitales modificando el equilibrio hormonal en una planta *in vitro* (Espindula et al. 2009). La adición de inhibidores del crecimiento en función de su concentración, reducen el desarrollo del cultivo *in vitro* ya que reducen el metabolismo celular (Sánchez-Chiang y Jiménez 2010). Tales inhibidores incluyen ácido abscísico (ABA), hidrazida maleica, paclobutrazol y algunos otros (Sharma et al. 2012; Trejgell et al. 2015). El ácido abscísico es una hormona inhibidora que ayuda a las plantas a adaptarse al estrés. Es uno de los inhibidores de crecimiento más usado en condiciones *in vitro*, pues limita la elongación y división celular, y estimula el cierre estomático, lo cual disminuye la capacidad fotosintética y reduce el crecimiento vegetal (Barrueto y Carvalho 2008; Bello-Bello et al. 2014). También mantiene el equilibrio hídrico, evita

que los embriones de semillas germinen e induce la senescencia foliar (Liang et al. 2014), la latencia de las semillas y los brotes (Kalra et al. 2018). El ABA ha sido propuesto para desempeñar un papel en la adaptación a estreses abióticos ambientales, como pueden ser la sequía y las bajas temperaturas (Azcón-Bieto y Talon 2008; Zhao et al. 2016). En el endurecimiento de las plantas se exhibe un aumento endógeno de ABA, lo que implica que esta fitohormona está posiblemente asociada con el consiguiente aumento de la tolerancia a la congelación, razón por la cual el ABA ha sido empleado en mejoramiento, en la desecación y en la tolerancia a temperaturas bajas en muchas especies (Pimda y Bunnag 2010; Bunnag y Khonkayan 2010). En condiciones *in vitro* inhibe la formación de callos y es utilizado para inducir la maduración de embriones somáticos y la formación de órganos de almacenamiento y dormancia como cormos y microtubérculos. (Suárez y Otero 2016; Suárez et al. 2017; Carmona 2017). La adición de ABA en el medio de cultivo se aplicó eficazmente para inhibir el crecimiento en *Ipomea batatas*, donde se probaron concentraciones de 0.1, 1.0 y 2.0 mgL⁻¹ de ABA obteniendo los mejores resultados la adición de 1.0 mgL⁻¹ (Jarret y Gawel 1991) al igual que en *Cedrela odorata* L. (Renau-Morata et al. 2006). Espinoza y colaboradores (2003), conservaron cuatro cultivares de boniato durante un año en medio de cultivo con 10.0 mg l⁻¹ de ABA con altos porcentajes de supervivencia ($\geq 85.5\%$) y recuperación ($\geq 97.5\%$), entre los que se encontraba el cultivar 'Cautillo'. Sin embargo, Arrigoni-Blank et al. (2014), estudiando el efecto de concentraciones de ABA en varios cultivares de boniato concluyeron que podrían conservarse durante 180 días con 2.0 mg l⁻¹ de ABA, con una supervivencia del 78%. En vainilla (*Vanilla planifolia*) se probaron cuatro concentraciones 0, 1, 2 y 3 mgL⁻¹ de dos inhibidores del crecimiento vegetal: ácido abscísico (ABA) y paclobutrazol (PAC), los mejores resultados se obtuvieron al utilizar ABA a 3 mgL⁻¹, los brotes mostraron valores menores en las variables evaluadas: longitud de planta, número de hojas y raíces de los brotes cultivados *in vitro* y un 90% de supervivencia (Bello-bello et al. 2015). Para la conservación y regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* Lindl, una orquídea, los mejores resultados se observaron con la adición de 0,5 mgL⁻¹ de ABA al medio de cultivo (Ramírez-Mosqueda 2019).

2.7 Agente gelificante en el medio de cultivo

En el cultivo *in vitro* uno de los factores más importantes que afectan las características químicas y físicas del medio, es el tipo y concentración de gelificante (Bhojwani y Dantu 2013). Entre ellos se encuentran el Agar Agar, Agarosa, Bacto agar, Carregina, Alginato, Gelrite, Phitagel, Xantana, Goma Guar, entre otros. Los agentes gelificantes hacen que el medio sea firme e influyen en las características de difusión de éste (Mohamed et al. 2021). Deben tener algunas propiedades especiales para uso en medios de cultivo. Entre estos se encuentran que deben ser inertes para no afectar el desarrollo de los explantes, soportar la esterilización por el autoclave, debe ser líquido cuando el medio de cultivo este caliente para su posterior dispensación (Bhojwani y Dantu 2013). Además no debe reaccionar con los compuestos del medio y debe solidificar el medio de cultivo a temperatura ambiente (Sharry et al. 2020), ya que estos pueden afectar significativamente la respuesta morfogénica, el crecimiento y el desarrollo del material vegetal cultivado en tejidos (Das et al. 2015). Además, pueden contribuir a la aparición de hiperhidricidad también conocida como vitrificación, que es una alteración fisiológica común que hace que los brotes y las hojas se vuelvan quebradizos, con un aspecto vidrioso (Amer y Omar 2019). El agente solidificante más usado debido a su grado de dureza es el agar, permite sostener los cultivos en su sitio y permite el flujo de nutrientes del medio hacia los tejidos debido a su inactividad iónica (Suárez 2020). El agar es una mezcla de polisacáridos que se extraen de las paredes de las algas rojas *Pterocladia*, *Gelidiella* (Mohamed et al. 2021) y su concentración puede variar entre 0.7 y 1.5%, lo que determina la dureza del medio (Bhojwani y Dantu 2013). La consistencia del agar puede también influir en el crecimiento. Altas concentraciones de agar provocan un medio duro. Si una concentración baja de agar es empleada (0.4%) o si el pH es bajo, el medio estará tan suave y no gelificará apropiadamente. Si el medio es muy duro, el crecimiento de la planta será reducido. Si es muy suave, pueden resultar plantas hiperhídricas. Para gelificar apropiadamente, un medio con 0.6% de agar debe tener un pH por encima de 4.8 (Thorpe 2012). A medida que el

medio de cultivo es más denso, el crecimiento del inóculo es más lento, lo que unido al incremento del potencial hídrico del medio reduce el crecimiento del cultivo; de esta forma se extiende el período de subcultivo sin que afecte la viabilidad del explante o su capacidad de reemprender el crecimiento una vez que éste se devuelve a las condiciones de crecimiento normales (Sharry 2020).

2.8 Inhibidor de etileno, Tiosulfato de plata (STS)

Uno de los factores más importantes en el entorno físico-químico del medio de cultivo es el etileno, un gas sintetizado a partir del aminoácido metionina que se produce en la mayoría de los tejidos vegetales de forma natural (Chae et al. 2012). En condiciones naturales, el etileno regula la maduración de los frutos y la senescencia vegetal, la abscisión de hojas y flores, la formación de raíces adventicias y elimina la dormancia de semillas y yemas (Ortuño et al. 2015). Mientras que su acumulación en el frasco durante el cultivo *in vitro* afecta el crecimiento vegetal al producir amarillamiento y muerte de los explantes (Verdugo y Riffo 2003; Suárez 2020). Para prevenir los daños ocasionados por el etileno se pueden emplear los inhibidores de su síntesis y/o de su acción (Cubillos et al. 2001). La biosíntesis de etileno se conoce como el ciclo de la metionina que se inicia cuando la metionina se asocia a la adenosina conformando la S-adenosilmetionina (AdoMet). Seguido de la conversión de este AdoMet en ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) el cual produce etileno con liberación de CO₂ (Jordan y Casaretto 2007). Los efectos beneficiosos de los inhibidores de etileno sobre la organogénesis para la regeneración de plantas se han informado ampliamente (Hemadri et al. 2012). Inhibidores de la síntesis de etileno son el AVG (aminoetoxivinilglicina) y el AOA (ácido aminooxicético) que bloquean la conversión de AdoMet a ACC, mientras que el ión Co⁺² bloquea la ACC-oxidasa. Otros ejemplos son compuestos volátiles que compiten por el sitio del receptor de etileno, anulando igualmente su acción en forma inespecífica y no bien determinada; altos niveles de CO₂ bajo condiciones de almacenamiento parece igualmente reducir el nivel de etileno (Jordan y Casaretto 2007). Se ha evidenciado que el ácido

indolacético (AIA) puede inducir la síntesis de etileno al promover la síntesis de ACC-sintasa (Glick 2014). Al igual que el ión plata (Ag^+) que inhibe fuertemente la acción de etileno, anulando sus efectos como se ha demostrado en la preservación de pétalos de varias especies florales. El tiosulfato de plata (STS) tiene amplia aplicación en productos de tipo comercial porque retarda los efectos deletéreos del etileno en plantas florecidas (Cameron y Reid 1981; Cubillos et al. 2001). En estudios realizados para la conservación *in vitro* de *Lippia filifolia* (Verbenaceae) se evaluaron los efectos de la inhibición de la síntesis de etileno usando concentraciones de 6, 12 y 18 μM . Se observó que independientemente de su concentración se obtuvo un retraso de la senescencia y la reducción de la frecuencia de subcultivos, contribuyendo a la conservación del germoplasma de esta especie siendo más favorable la concentración de STS más alta (Pimenta et al. 2013). Chae et al. (2012) evaluaron tres diferentes inhibidores de etileno en organogénesis de los brotes de Gloxinia (*Sinningia speciosa*), donde la adición de STS mejoró significativamente la frecuencia de regeneración dando mayor número brotes y mayor longitud de brotes por explante. El crecimiento de los brotes aumentó con el incremento de las concentraciones de STS de 3 hasta 15 μM , pero disminuyó la cantidad de brotes a medida que aumentaban las concentraciones de 30 a 60 μM de STS.

2.9 Antecedentes de la especie en estudio

La capacidad de *C. quitensis* de adaptarse a condiciones abióticas tan diversas, hace considerarla como una planta modelo para estudios sobre mecanismos ecofisiológicos y moleculares de adaptación al estrés (Cuba-Díaz et al. 2014). En el laboratorio de Biotecnología y estudios Ambientales (BEA) debido a la limitada accesibilidad a sus hábitats naturales, *C. quitensis* se propaga vegetativamente en condiciones controladas y se realizan diferentes estudios como por ejemplo: estudios de tolerancia iones cobre (Marín 2015; Cuba-Díaz et al. 2017) y salinidad (NaCl) (Castel 2015; Klagges 2015; Arriagada 2017; Cuba-Díaz et al. 2017; Arroyo

2023), estudios de la respuesta morfo-fisiológica y metabólica de *C. quitensis* frente a cloruro de sodio, iones cobre y frío (Arriagada 2017), estudios de variabilidad fenotípica y diferenciación genética en poblaciones *C. quitensis* (Cuba-Díaz et al. 2017a), entre muchos otros, por lo tanto, se debe garantizar un número de plantas que permitan desarrollar investigaciones. Entre los estudios realizados en la especie en el laboratorio, se mencionan algunos como: mecanismos de tolerancia (bioquímicos y morfo-fisiológicos) a diferentes concentraciones de iones de cobre en respuesta a cloruro de sodio (Castel 2015; Klagges 2015; Arriagada 2017; Cuba-Díaz et al. 2017c; Arroyo 2023), iones cobre (Marin 2015; Cuba-Díaz et al. 2017), ensayos sobre la respuesta morfo-fisiológica y metabólica de *C. quitensis* frente a cloruro de sodio, iones cobre y frío (Arriagada 2017); ensayos de variabilidad fenotípica y diferenciación genética entre poblaciones (Cuba-Díaz et al. 2017a), entre otros. Se han establecido protocolos de propagación en el banco de germoplasma activo *in vitro* que permite contar con una colección de individuos de diferentes poblaciones, permitiendo la propagación masiva de plantas libres de contaminación por patógenos y disponibles rápidamente, estableciendo parámetros generales en el cultivo *in vitro* y optimizando algunos parámetros críticos en la propagación relacionados con aspectos físicos y químicos para evitar efectos negativos como el amarillamiento y muerte de explantes y mejorar el condicionamiento de las nuevas plántulas, así como la respuesta a diferentes combinaciones hormonales (Cuba-Díaz et al. 2014). Acuña (2014), con el propósito de incrementar intercambio de gases para disminuir el amarillamiento de los brotes evaluó el efecto de las condiciones de cultivo *in vitro* sobre el desarrollo de las plántulas en tres poblaciones de *C. quitensis*, utilizando cobertura de los frascos con doble capa de papel Kraft y doble capa de papel aluminio, donde este último evitó la pérdida de agua en el medio y en los tejidos, disminuyendo también el amarillamiento de los brotes. Acuña (2014) además evaluó el uso Tiosulfato de plata (STS) en medio MS a concentraciones de 0 μM (control), 1 μM , 10 μM y 30 μM , donde la adición de STS al medio estimuló la regeneración de brotes y raíces y la concentración de 10 μM inhibió en un 50% y un 25% el amarillamiento y la muerte de explantes, respectivamente para todas las poblaciones. Como respuesta al

medio de cultivo usó distintas concentraciones de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal como AIA y BAP a 1.0, 0.5 y 0.25 mgL⁻¹ y kinetina a 2.0 mgL⁻¹, y la exposición a diferentes intensidades lumínicas en tres poblaciones de *C. quitensis*. En base a estas investigaciones se logró establecer un medio de cultivo de propagación más eficiente para las poblaciones, que contenía AIA (0.25 mgL⁻¹) +BAP (0.5 mgL⁻¹) y pH 5.7 con aplicación de STS, diferenciando a la población pPAR (La Parva) con un medio que contenía Kinetina (2 mgL⁻¹, pH 4.5) como regulador de crecimiento. Por otro lado, Burgos (2020), con el fin de establecer protocolos para la conservación *in vitro* en condiciones de crecimiento mínimo de dos poblaciones de *C. quitensis* con óptimas condiciones fisiológicas, se realizó una investigación de cuatro etapas: 1) Tipo de sellado del frasco 2) Número de explantes en combinación con la concentración de sales minerales en el medio basal 3) La adición de agentes osmorreguladores 4) Cobertura de frascos con papel celofán como filtro de luz roja y naranja; donde la combinación de factores que regulan el crecimiento vegetativo y la fisiología vegetal tuvieron un efecto positivo en la disminución de la longitud foliar y radicular, una disminución en el porcentaje de amarillamiento foliar y con una menor cantidad de brotes manteniendo la eficiencia fotosintética en un rango óptimo para cultivo *in vitro*. Los mejores resultados se obtuvieron al disminuir la concentración del medio basal al 50% MS y 12 explantes por frasco, con la adición de sorbitol al 6% en pA y sorbitol al 4% en pC. El contenido de pigmentos fotosintéticos fue mayor y varió al usar filtros de color en comparación al no uso de ellos, siendo mejor usar papel celofán naranja para pC y papel celofán rojo para pA. Considerando los antecedentes de las investigaciones realizadas en el laboratorio y con el fin de continuar con el trabajo de Burgos (2020), establecimiento de un protocolo para la conservación *in vitro* de *C. quitensis* en condiciones de crecimiento mínimo, es que en la presente investigación se consideraron algunos de sus mejores resultados como base para completar este protocolo de conservación para la especie abarcando todos los posibles factores que respondan al objetivo de lento crecimiento y establecer una óptima combinación eficiente de estos para conseguir extender en período de subcultivo de las plantas

con el fin de desarrollar un completo protocolo de conservación en crecimiento mínimo de la especie.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El uso en conjunto de variables como reducciones de minerales, aumento de las concentraciones del gelificante, adición de osmorreguladores, uso de inhibidores de crecimiento y de etileno en el medio de cultivo permiten un mínimo crecimiento para la conservación *in vitro* a mediano plazo en *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

-Establecer un protocolo para la conservación *in vitro* en condiciones de crecimiento mínimo de *C. quitensis* (Kunth) Bartl. para la población Arctowski y Conguillio.

4.2 Objetivos específicos

- Generar protocolos para la conservación a mediano plazo del germoplasma *in vitro* de dos poblaciones de *C. quitensis* bajo condiciones de crecimiento mínimo.

- Evaluar las respuestas morfo-fisiológicas para cada una de las modificaciones de las condiciones de cultivo de *C. quitensis*.

-Establecer el tiempo de conservación *in vitro* de *C. quitensis* en adecuadas condiciones morfofisiológicas para la especie.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Preparación del Material vegetal

La propagación del material vegetal previo a los experimentos se realizó con los protocolos de propagación y mantención usados en el Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales de la Universidad de Concepción Campus Los Ángeles (Acuña 2014; Cuba-Díaz et al. 2014). Como material vegetal se utilizaron plántulas cultivadas *in vitro* de las poblaciones de *Colobanthus quitensis*, Arctowski (pA) y Conguillio (pC), propagadas en frascos de vidrio de 250 mL con 25 mL de medio de cultivo basal MS completo (Murashige y Skoog 1962) y con doble cobertura de papel aluminio. El medio basal fue complementado con BAP (bencil-amino-purina) 0.5 mgL⁻¹ y AIA (ácido indol acético) 0,25 mgL⁻¹, sacarosa al 3% y agar al 0,7%, STS 10 µM a un pH 5.7. Los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C (Huxley® HL-340) y 1 atm. de presión por 15 minutos. Posteriormente los explantes se dispusieron en los frascos el medio de cultivo y se mantuvieron bajo condiciones de cámara de crecimiento a una temperatura de 20 ± 2°C, con intensidad lumínica entre 28-45 µmol m⁻² s⁻¹ y con fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad por un período de tiempo de 30 días.

5.2 Medio basal y número de explantes para conservación

Es necesario recordar que esta investigación se realizó en dos partes por la gran cantidad de factores evaluados que pueden incidir en el crecimiento y por el período de tiempo necesario para evaluarlas. La primera parte fue desarrollada por Burgos (2020), donde midieron los factores por etapas como: porcentaje de medio de cultivo basal, uso de osmoregulador, densidad de explantes y calidad de luz, de las cuales se seleccionaron los mejores resultados con un objetivo de crecimiento mínimo. Por lo tanto, para desarrollar esta segunda parte y para todas las etapas, se utilizó como medio de cultivo base los mejores resultados de la primera parte descritos por Burgos (2020) para conservación de *C. quitensis*. El cual está definido por 50% de

MS (Murashige y Skoog 1967), hormonas reguladoras del crecimiento vegetal como BAP 1 mgL^{-1} y AIA $0,5 \text{ mgL}^{-1}$, manitol al 4%, agar al 0,7% y un pH final de 5,7 y con una densidad de 12 explantes por frasco para ambas poblaciones de *C. quitensis*, Arctowski (pA) y Conguillio (pC). Por lo tanto, de aquí en adelante para desarrollar esta segunda parte, a este medio de conservación se consideraron los mejores resultados en cada una de las etapas.

5.3 Etapa 1. Uso distintos tipos de sellado del medio de cultivo en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) como inhibidor de crecimiento

Se evaluó en conjunto el uso de dos factores que pueden influir el desarrollo *in vitro* de plantas: distintos tipos de sellado y el uso de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) como inhibidor de crecimiento y su efecto, en los explantes de ambas poblaciones. Para definir el tipo de sellado que evite la contaminación y la deshidratación de los explantes en el medio de cultivo, que permita un adecuado intercambio gaseoso y evite la acumulación de gases tóxicos que provocan amarillamiento o muerte de plántulas, se consideraron diferentes tipos de sellado. Se utilizó como base el medio de conservación previamente descrito (Burgos 2020). Se sellaron los frascos con 3 tipos de tapas: una doble tapa de polipropileno de 20 μm de espesor (Papel Celofán transparente), 4 tapas (capas) de polietileno (film plástico transparente) y como control se usó doble tapa de aluminio. En combinación con las tapas se evaluaron tres concentraciones diferentes de ABA: 0.0 (control), 0.5 y 1 mgL^{-1}). Para esta etapa se utilizó como base una concentración de MS al 50 %, una densidad de explantes será de 12 plantas por frasco y la adición de manitol al 4% (Burgos 2020). Se evaluaron 324 explantes por población de *C. quitensis* y se realizaron evaluaciones morfofisiológicas a los 90 días.

5.4 Etapa 2. Uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) Inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre las plantas de *C. quitensis*.

Para esta etapa se consideró el mejor resultado de la etapa anterior y así como en la etapa 1 también se evaluó el uso en conjunto de otros dos factores que pueden influir el desarrollo *in vitro* de plantas. El uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar con la adición de distintas concentraciones de STS al medio de cultivo. Para el factor gelificante se usó agar al 0.7% (control), agar al 0.9 y al 1.0% como tratamientos y para evaluar el factor inhibidor de etileno se utilizó como control 10 μM de STS, concentración establecida para medios de propagación de la especie (Acuña 2014; Cuba-Díaz et al. 2014) y los tratamientos fueron de 0 μM y 30 μM de STS. Al finalizar el ensayo se evaluaron variables morfofisiológicas para un total 324 explantes por población de *C. quitensis* luego de 90 días en cámara de crecimiento.

5.5 Evaluación morfo-fisiológica de los explantes

Se evaluó el desarrollo morfofisiológico en cada etapa y para ambas poblaciones cada 90 días. Las variables a medir fueron largo foliar (mm), longitud de raíz (mm), número de brotes (unidad emergida), número de ápices florales (unidad emergida). Para la obtención de los datos se extrajeron las plantas desde los frascos, se dispusieron sobre papel absorbente para eliminar los restos del medio de cultivo. La medición del largo radicular se realizó extendiendo el tejido y midiendo desde la división del tallo y el inicio de la raíz, y hasta el ápice radicular más largo. El largo foliar fue medido desde la separación entre el inicio de formación de la raíz y el tallo, y hasta el ápice central de la planta. Para ambas mediciones se utilizó un pie de metro digital marca Kamasa (KM-447). Para determinar actividad fotosintética se determinó por medio de un fluorómetro portátil modelo Pocket PEA marca Hansatech, que mide F_v/F_m (Fluorescencia variable/máxima). Las mediciones se realizaron durante las primeras horas de la mañana, luego de un período de aclimatación de las plantas en oscuridad (30 a 45 minutos), para garantizar que todos los centros de reacción del PSII estén abiertos utilizando cinco hojas al azar plenamente desarrolladas de 6 plantas por cada tratamiento. En paralelo, se contabilizó el número de brotes y ápices florales generados por cada explante considerando la unidad emergida. El porcentaje de supervivencia se determinó

como el número de (plantas vivas/número de plantas totales) * 100. El porcentaje de amarillamiento se obtuvo mediante método de observación del tejido foliar según una escala de 0 a 100%, establecida por Arroyo 2023 proporcional a la cantidad de hojas de la planta, siendo 0% ausencia de amarillamiento y 100% totalidad de amarillamiento. Para determinar el contenido relativo de agua (CRA), se midió el peso fresco (Pf) de los explantes en miligramos mediante una balanza analítica (RADWAG AS 220/C/2). Para determinar peso seco (Ps) las muestras se dispusieron en sobres de papel y se dejaron 4 días en una estufa de secado a $37 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$, con el fin de deshidratar los explantes para determinar Ps. Con los datos anteriores se determinó el CRA mediante la ecuación $\text{CRA} = (\text{Pf} - \text{Ps}) / \text{Pf} * 100$ y los resultados fueron expresados en porcentajes, considerando un rango 20-40% como plantas deshidratadas y entre 50-70% como plantas con contenido de agua normal en hojas. Es importante mencionar que un mínimo crecimiento de los explantes significa una respuesta positiva frente a los tratamientos y un alto crecimiento una respuesta negativa para los objetivos de conservación *in vitro*.

5.6 Diseño experimental

En esta investigación se utilizaron explantes provenientes de plántulas de dos poblaciones de *C. quitensis*, previamente establecidas en cultivo *in vitro* y fue desarrollada en dos etapas sucesivas seleccionando como base los mejores resultados de la primera etapa para desarrollar la segunda. Para la etapa uno, se evaluó la interacción de dos factores, tipo de sellado del frasco y diferentes concentraciones de ABA y para la etapa dos, se evaluó el efecto del aumento del agente gelificante en el medio de cultivo y el uso de diferentes concentraciones de STS. Los ensayos fueron completamente aleatorios considerando 3 réplicas por cada tratamiento, utilizando una unidad muestral de 6 plantas por réplica. Para evaluar las diferencias estadísticas para los factores y los niveles (tratamientos), primeramente, se realizó un análisis de varianza factorial (ANOVA) por cada una de las variables medidas y así determinar si los factores y/o la interacción entre ellos es significativa según una Prueba F (Pr(F)). Posteriormente se consideraron sólo

aquellas variables que mostraron uno o dos valores significativos ($p < 0.05$) para aplicar pruebas de rango post hoc y determinar niveles de significancia entre las medias de los tratamientos. Se realizaron pruebas de rango múltiple Duncan ($\alpha = 0.05$), utilizando el software STATISTICA (v12.0) y el software Sigma plot (v14.0) para la elaboración de los gráficos.

6. RESULTADOS

Una estrategia para la conservación *in vitro* es el crecimiento lento, el cual tiene como objetivo reducir la actividad fisiológica y metabólica de los tejidos vegetales mediante la modificación de factores ambientales y la composición del medio de cultivo, prolongando los intervalos entre subcultivos de corto a mediano plazo. Al emplear esta estrategia un mínimo crecimiento de los explantes significa una respuesta positiva frente a los tratamientos evaluados y un mayor crecimiento significa una respuesta no deseada para los objetivos de conservación de *C. quitensis in vitro*. Sin embargo, en esta investigación se seleccionaron como mejores resultados aquellos tratamientos que responden los objetivos de conservación para la especie. Para las variables morfológicas como: longitud foliar y largo de raíz se consideraron como adecuados los valores medios. Para variables fisiológicas como: supervivencia, CRA y Fv/Fm se considerando adecuados los valores altos y para otras variables como: porcentaje de amarillamiento, número de ápices y número de brotes se consideraron como adecuados los valores menores. Para evaluar las diferencias estadísticas frente a la combinación de los factores y los tratamientos, primeramente, se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) por cada una de las variables morfofisiológicas medidas y así determinar si los factores y/o la interacción entre ellos es significativa $Pr(F)$. Luego de este análisis previo y para presentar los resultados más significativos, se consideraron sólo aquellas variables que mostraron significancia para dos factores y/o la interacción entre ellos ($p < 0.05$) y se realizaron pruebas de rango post hoc y determinar significancia entre las medias de los tratamientos de las variables seleccionadas. Hay que mencionar, además, que se seleccionó el mejor tratamiento de la primera etapa como medio base para desarrollar la segunda etapa.

6.1 Etapa 1 pA: Evaluación de distintos tipos de sellado y el uso de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) en el desarrollo morfofisiológico de *C. quitensis* pA *in vitro*.

El análisis de varianza para pA arrojó valores significativos para algunas variables respuesta para la combinación de tapas y ABA y/o la interacción de ambas. Se escogieron las variables de largo foliar, porcentaje de amarillamiento, porcentaje de supervivencia y F_v/F_m (Tabla 1) para determinar el mejor tratamiento que responda a los objetivos de esta investigación.

Tabla 1: Análisis de varianza de dos vías con valores p de la combinación de factores tapa y ABA para variables morfofisiológicas de *C. quitensis* población Arctowski (pA). El asterisco (*indica valores significativos($p < 0.05$)).

Pr (F)	CRA (%)	Largo Foliar	Largo Radicula	N° Brotes	N° Ápices florales	Amarillamiento (%)	Supervivencia (%)	Fv/Fm
Tapa	<0,0001 *	0,0694	0,9638	0,1401	0	0,1883	0,9294	<0,0001 *
ABA	0,9680	0,0037 *	<0,0001 *	0,0023 *	0	<0,0001 *	0,0098 *	<0,0001 *
Tapa*ABA	0,0840	0,0004 *	0,1298	0,1290	0	<0,0001 *	0,0073 *	<0,0001 *

ANOVA FACTORIAL $p < 0,05^*$, Contenido relativo de agua (CRA), Fluorescencia fotosintética de clorofila (Fv/Fm).

El uso de diferentes concentraciones de ABA en combinación con los diferentes tipos de tapas mostró diferencias en la longitud foliar de las plántulas en pA. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con tapa Aluminio y las tapas con papel film y papel celofán, evidenciando una menor longitud foliar en estos dos últimos; no obstante, entre las diferentes concentraciones de ABA para ambas tapas no se observaron diferencias significativas para las concentraciones más bajas de ABA. Los valores medios de longitud foliar se observaron en los tratamientos con tapa Celofán y tapa Film en combinación con 1 mgL^{-1} y $0, 0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de ABA respectivamente (Fig. 1).

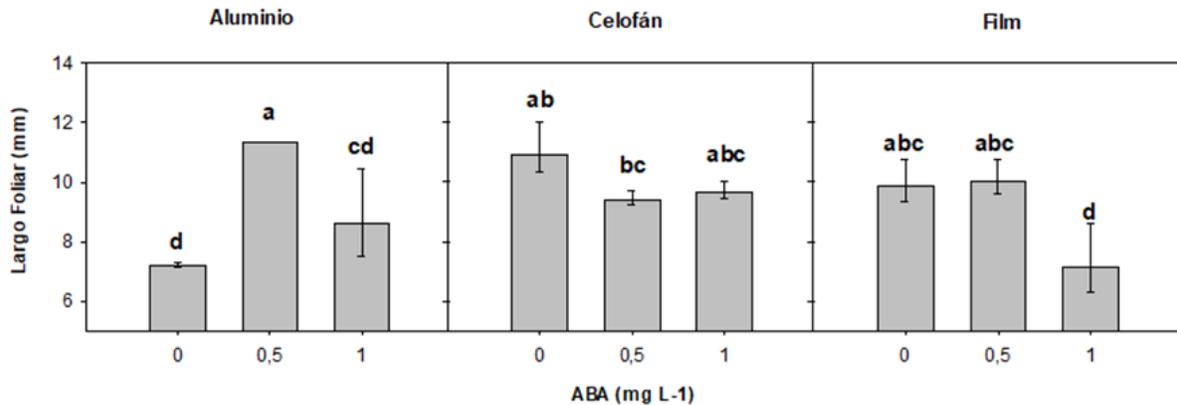


Figura 1. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el largo foliar de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

El menor porcentaje de amarillamiento se obtuvo usando tapa Celofán sin la adición de ABA (< al 50%) a diferencia de los demás tratamientos cuyo porcentaje de amarillamiento fue mayor (Fig. 2). El porcentaje de supervivencia de las plántulas fue superior al 50% en la mayoría de los tratamientos. La mayor tasa de supervivencia se observa en los tratamientos con 0,5 mgL⁻¹ de ABA en todos los tipos de tapas (Fig. 3) y los valores más bajos se presentaron con el uso de Celofán sin la adición de ABA y tapa Film con adición de 1 mgL⁻¹ de ABA.

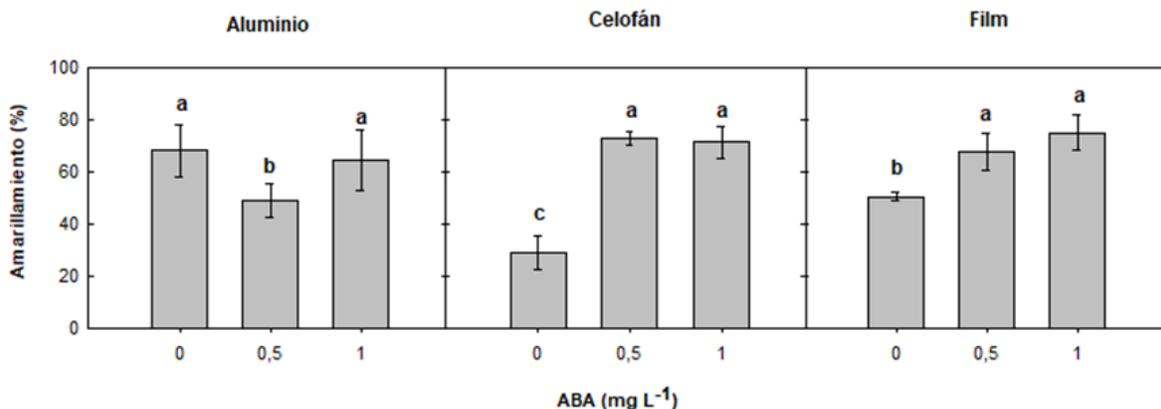


Figura 2. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el porcentaje de amarillamiento de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan (p≤0,05), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

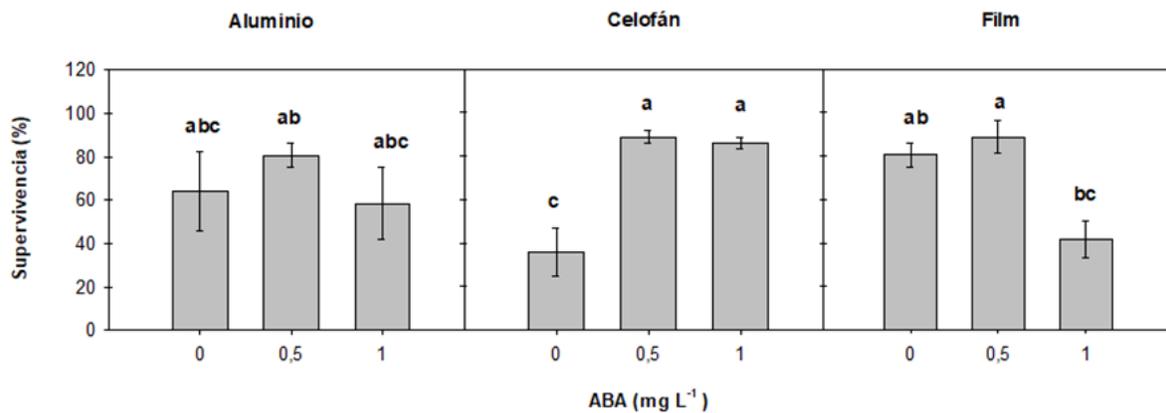


Figura 3. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el porcentaje de supervivencia de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan (p≤0,05), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

La combinación de ambos factores, tipo de tapas y ABA en todos los tratamientos no tuvo efectos negativos sobre actividad fotosintética de las plántulas de *C. quitensis* pA. La mayoría de los valores de F_v/F_m (Fluorescencia variable/máxima) se encontraron en valores óptimos por sobre 0,7, a excepción del tratamiento tapa Aluminio y 0 mgL⁻¹ de ABA, donde la capacidad fotosintética disminuyó considerablemente (Fig. 4).

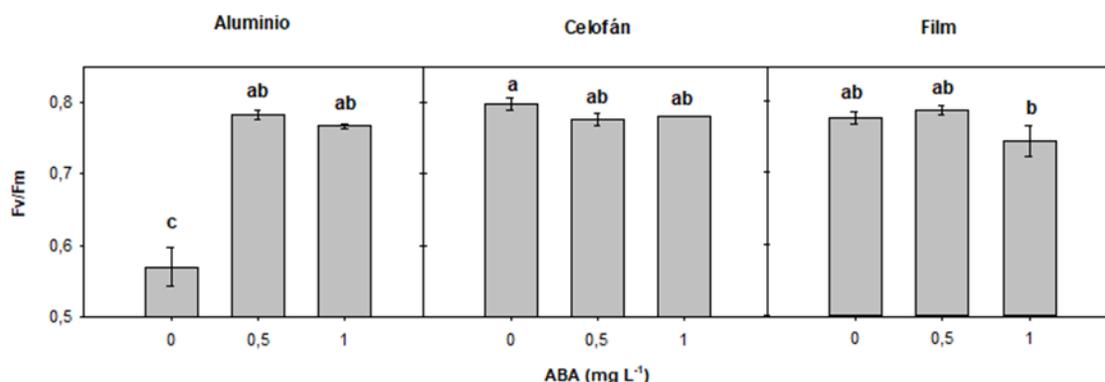


Figura 4. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el F_v/F_m de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan (p≤0,05), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

6.2 Etapa 1 pC: Evaluación de distintos tipos de sellado y el uso de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) en el desarrollo morfofisiológico de *C. quitensis* pC *in vitro*.

El análisis de varianza para pC arrojó significancia para las variables morfofisiológicas contenido relativo de agua (CRA), largo foliar, largo raíz, número de brotes y porcentaje de amarillamiento (Tabla 2).

Tabla 2: Análisis de varianza de dos vías con valores *p* de la combinación de factores: tapa y ABA para variables morfofisiológicas de *C. quitensis* para la población Conguillio (pC). El asterisco (*) indica valores significativos (p<0.05).

Primera Etapa Pobl. Conguillio									
Pr (F)	CRA (%)	Largo Foliar	Largo Radicula	N° Brotes	N° Apices florales	Amarillamiento (%)	Supervivencia (%)	Fv/Fm	
Tapa	0,1333	<0,0001 *	0,2520	0,0241 *	0	<0,0001 *	0,5272	0,2556	
ABA	0,0016 *	<0,0001 *	<0,0001 *	0,0006 *	0	<0,0001 *	0,0078 *	0,0016 *	
Tapa*ABA	0,0018 *	0,0703	0,0199 *	0,0063 *	0	<0,0001 *	0,5465	0,0850	

ANOVA FACTORIAL p < 0,05*, Contenido relativo de agua (CRA), Fluorescencia fotosintética de clorofila (Fv/Fm).

Todos los tratamientos presentaron un contenido relativo de agua (CRA%) entre 50-70% considerado como contenido de agua normal en hojas, siendo la tapa Film el que evidenció valores de CRA% mayores al 70% en todos los tratamientos con ABA (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) (Fig.5).

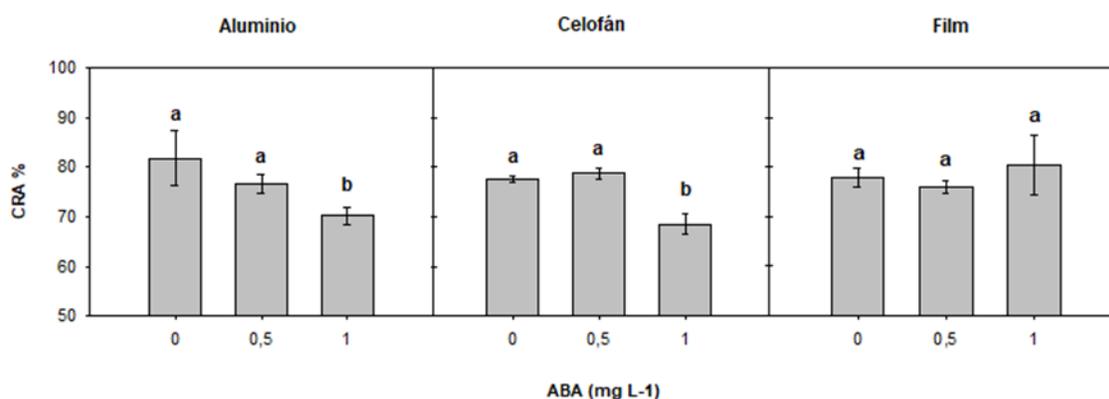


Figura 5. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el Contenido Relativo de Agua (CRA%) de *Colobanthus quitensis* para la población Conguillio (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

El uso de diferentes concentraciones de ABA y tipos de tapas mostró diferencias en la longitud foliar de las plántulas de la población pC. Se observaron diferencias significativas entre tipos de tapa, evidenciando una menor longitud foliar con tapa Film y Celofán; no obstante, nuestro objetivo no son los valores más pequeños, sino valores medios observados en los tratamientos con 0 y 0,5 mgL⁻¹ ABA para ambas tapas (Film y Celofán), y en los tratamientos con 0 y 1 mgL⁻¹ de ABA para tapa Aluminio (Fig.6).

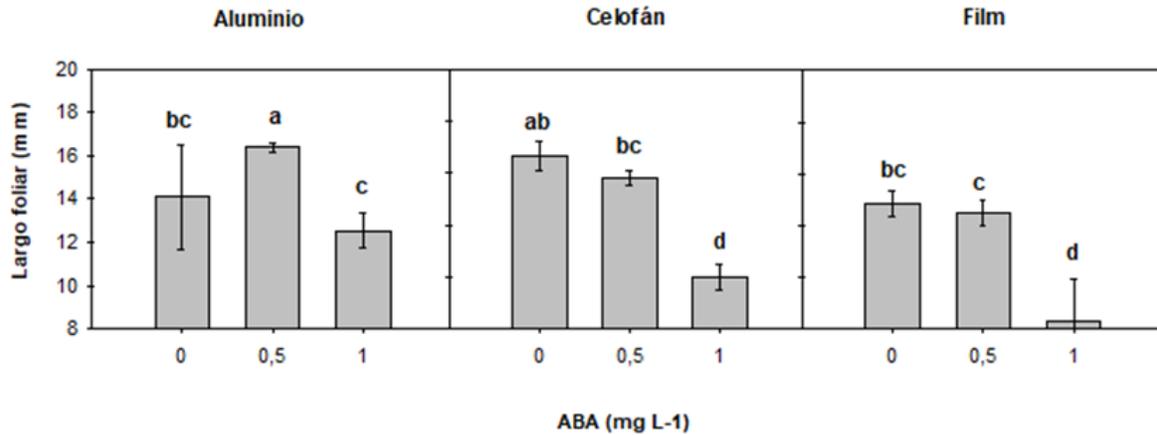


Figura 6. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el largo foliar de *Colobanthus quitensis* para la población Conguillio (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

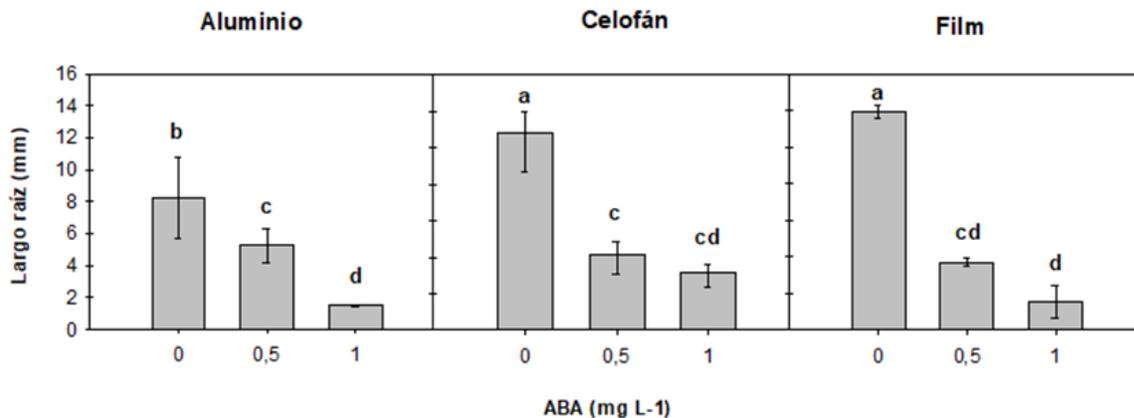


Figura 7. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el largo raíz de *Colobanthus quitensis* para la población Conguillio (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

En el largo de raíz se puede apreciar una disminución en la longitud de está usando ABA en todos los tipos de tapas. Sin embargo, los mejores resultados (los valores

medios de raíz) se obtuvieron usando $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de ABA (Fig.7). Los tratamientos que contienen ABA ($0,5$ y 1 mgL^{-1}) presentaron un menor número de brotes (Fig. 8).

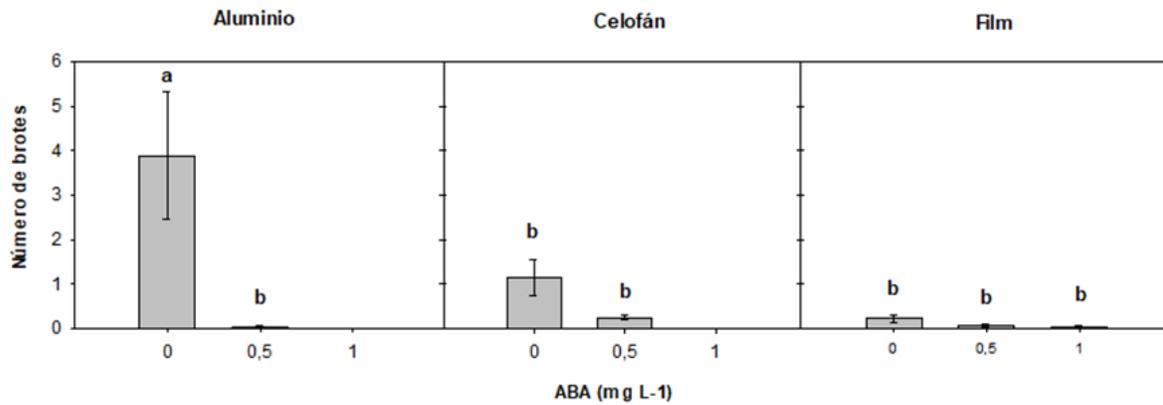


Figura 8. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0 , $0,5$ y 1 mgL^{-1}) sobre el número de brotes de *Colobanthus quitensis* para la población Conguillio (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

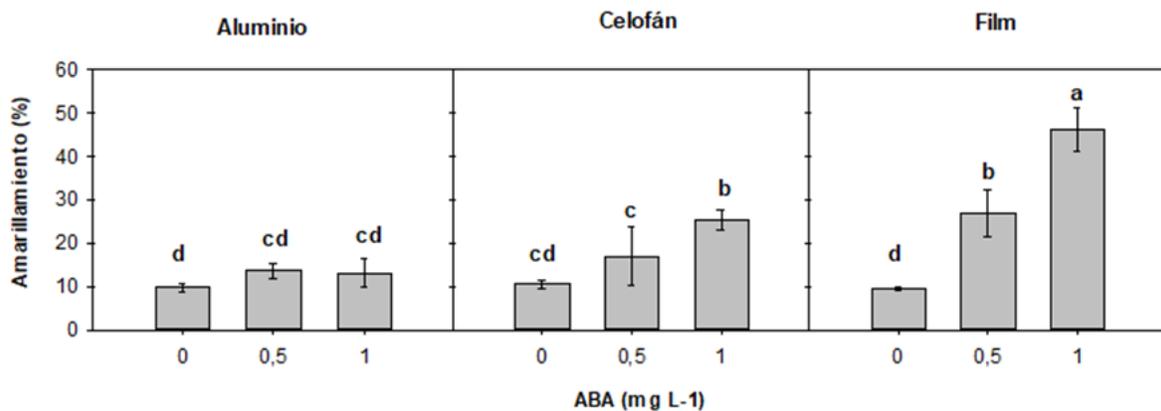


Figura 9. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0 , $0,5$ y 1 mgL^{-1}) sobre el porcentaje de amarillamiento de *Colobanthus quitensis* para la población Conguillio (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

Se observa que el uso de 1 mgL⁻¹ de ABA en conjunto con el uso de Aluminio presenta un alto porcentaje de amarillamiento en pC en comparación con los demás tratamientos cuyos valores se encuentran bajo un 30% de amarillamiento. El uso de distintos tipos de sellado del frasco de cultivo y de diferentes concentraciones de ABA en el desarrollo morfofisiológico de *C. quitensis* no afectó el desarrollo vegetativo de las plántulas en ninguna de las poblaciones pA o pC. Los valores medios para desarrollo de longitud foliar y radicular se obtuvieron principalmente usando Celofán y/o Film en combinación con la adición de ABA al medio de cultivo. Así mismo estas combinaciones también presentan bajo desarrollo de brotes y valores adecuados para variables fisiológicas como CRA y F_v/F_m en pA y pC (ver anexo). Sin embargo, se determina como mejor tratamiento el uso de ABA 0,5 mgL⁻¹ en combinación con tapa Film para la primera etapa porque su costo es menor.

6.3 Etapa 2 pA: Uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) y su efecto sobre plantas de *C. quitensis* pA *in vitro*.

El análisis de varianza para pA arrojó valores de significancia para las variables porcentaje de amarillamiento, porcentaje de supervivencia y F_v/F_m (Tabla 3).

Tabla 3: Análisis de varianza de dos vías con valores *p* de la combinación de dos factores: concentración de agar y STS para variables morfofisiológicas de *C. quitensis* para la población Artowski (pA). El asterisco (*indica valores significativos (p<0.05)).

Segunda Etapa Pobl. Artowski								
Pr (F)	CRA (%)	Largo Foliar	Largo Radicula	N° Brotes	N° Ápices florales	Amarillamiento (%)	Supervivencia (%)	Fv/Fm
AGAR	0,1251	0,0110 *	0,6429	0,0739	0	<0,0001 *	0,0307 *	0,0407 *
STS	0,0174 *	0,6915	0,0223 *	0,0498 *	0	<0,0001 *	0,0053 *	0,0017 *
AGAR*STS	0,1156	0,2673	0,7718	0,2124	0	0,1444	0,6956	0,8290

ANOVA FACTORIAL p < 0,05*, Contenido relativo de agua (CRA), Fluorescencia fotosintética de clorofila (Fv/Fm).

El uso de diferentes concentraciones de agente gelificante agar en combinación con el uso de distintas concentraciones de STS en el medio de cultivo mostró diferencias

significativas en el porcentaje de amarillamiento para las plántulas de pA, evidenciando menor amarillamiento foliar al utilizar agar al 0,7% sin la adición de STS y al usar 10 μM de STS (Fig.10).

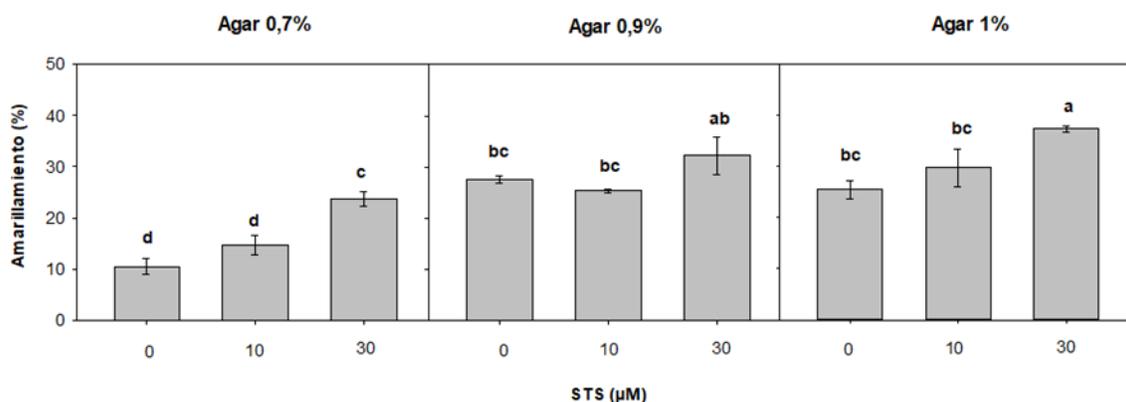


Figura 10. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 μM) inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el porcentaje de amarillamiento de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

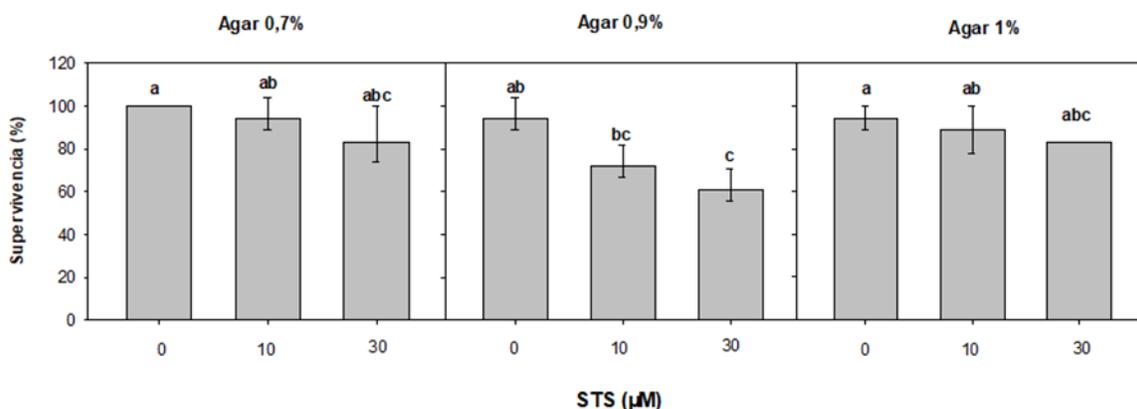


Figura 11. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el porcentaje de supervivencia de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

La mayor tasa de supervivencias de plántulas se evidencio con 0 y 10 μM de STS usando agar al 0,7% (Fig. 11). El desempeño fotosintético se mantuvo en valores óptimos cercanos a 0.8 en todos los tratamientos para F_v/F_m en pA (Fig. 12).

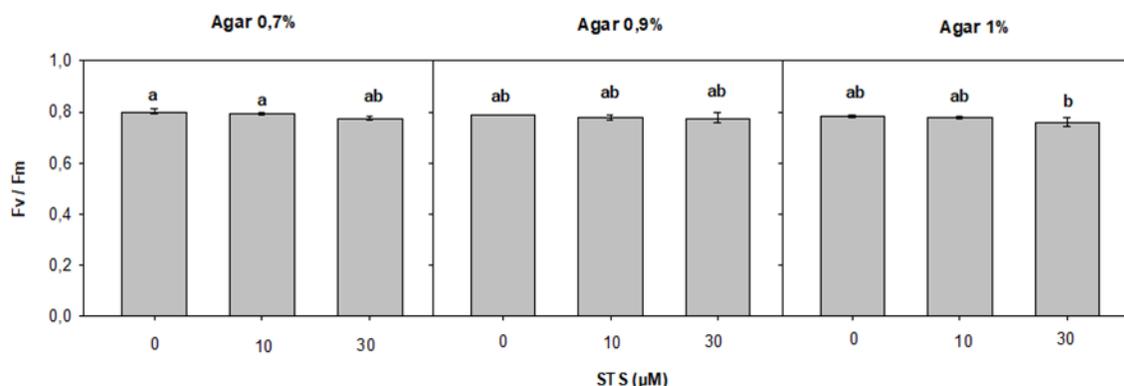


Figura 12. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el F_v/F_m de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

6.4 Etapa 2 pC: Uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) y su efecto sobre las plantas de *C. quitensis* pC *in vitro*.

En la población Conguillio (pC) el análisis de varianza arrojó valores significativos para algunas variables en respuesta al uso de factor agar, factor STS y/o la interacción de ambos (Tabla 4). Por lo tanto, se escogieron dos variables morfológicas, largo foliar y porcentaje de amarillamiento como variables morfo-fisiológicas, para ser evaluadas y elegir el mejor tratamiento que responda a los objetivos de esta investigación.

Tabla 4: Análisis de varianza de dos vías con valores p de la combinación de factores: concentración de agar y STS para variables morfofisiológicas de *C. quitensis* para la población Conguillio (pC). El asterisco (*indica valores significativos ($p < 0.05$)).

Segunda Etapa Pobl. Conguillio								
Pr (F)	CRA (%)	Largo Foliar	Largo Radicula	N° Brotes	N° Apices florales	Amarillamiento (%)	Supervivencia (%)	Fv/Fm
AGAR	0,0112 *	0,0002 *	0,7919	0,1659	0	<0,0001 *	0,5392	0,1722
STS	0,2206	0,9565	0,0743	0,1252	0	<0,0001 *	0,7257	0,0244 *
AGAR*STS	0,0539	0,0095 *	0,0478 *	0,5602	0	<0,0001 *	0,2104	0,6284

ANOVA FACTORIAL $p < 0,05^*$, Contenido relativo de agua (CRA), Fluorescencia fotosintética de clorofila (Fv/Fm).

Para el desarrollo foliar de pC a pesar de las diferencias significativas observadas en esta variable al aplicar diferentes concentraciones de agar, los valores de largo foliar no muestran deficiencias o son adecuados para los objetivos de la investigación donde Los valores medios para largo foliar se observaron en los tratamientos que contenían agar al 0,7 y 1%, con 0 y 30 μM de STS respectivamente (Fig.13).

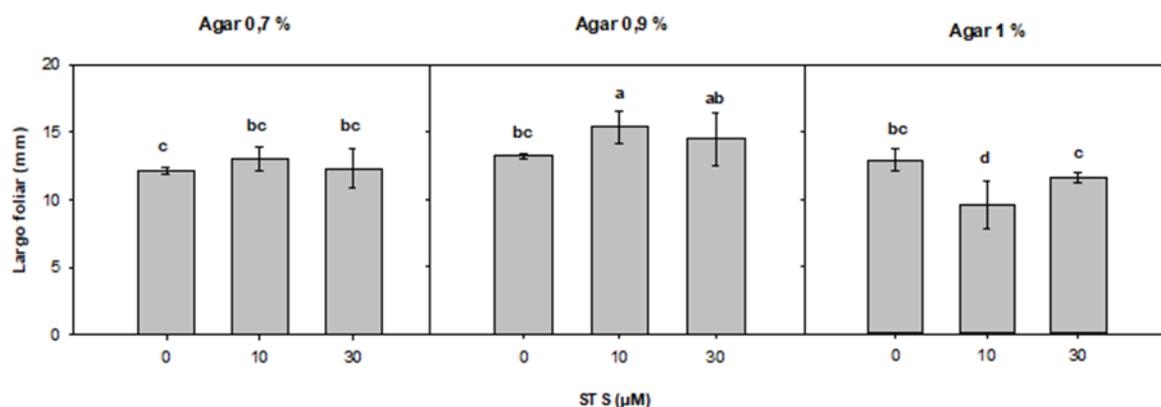


Figura 13. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el largo foliar de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican

diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

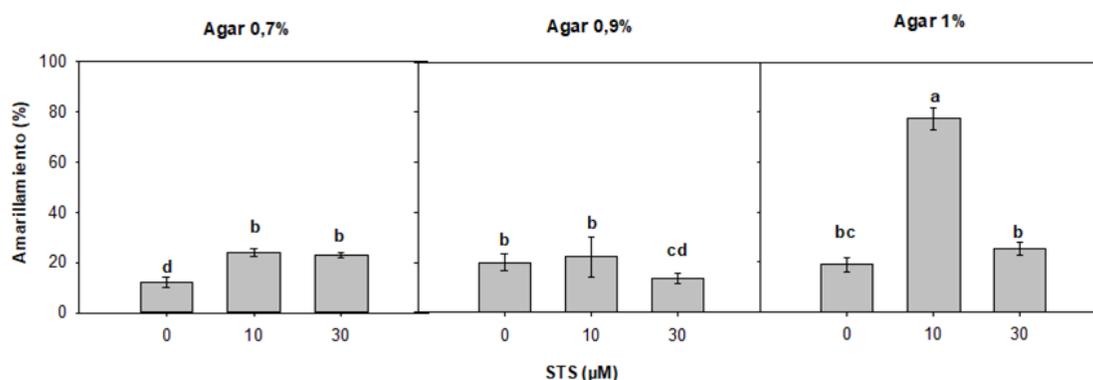


Figura 14. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0, 10 y 30 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el porcentaje de amarillamiento de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

Los menores valores en el porcentaje de amarillamiento se observaron en los tratamientos con 0,7 y 0,9% para todas las combinaciones de STS en el medio de cultivo (Fig. 14). En la segunda etapa el uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar en combinación con diferentes concentraciones de STS como inhibidor de etileno al medio de cultivo fue favorable para mantener el desarrollo morfofisiológico de *C. quitensis*. Sin embargo, para pC y pA la variable común amarillamiento mostro menor porcentaje al usar agar 0,7% en combinación con las concentraciones más bajas de STS (0,0 y 10 μM) con un buen desempeño morfofisiológico (F_v/F_m). El mayor porcentaje de amarillamiento se obtuvo al usar 1% de gelificante, incrementando el amarillamiento a medida que aumentaba la concentración de STS en el caso de pA. Por lo tanto usar agar 0,7% con 0,0 y 10 μM de STS son la mejor opción, ya que además de tener bajo % de amarillamiento su uso no incurre en un mayor costo para la aplicación de este método de

conservación (Ver figura 15 y 16). No obstante, se sugiere realizar un ensayo complementario para definir cuál concentración de STS se recomienda usar ya que ambas combinaciones también presentan bajo desarrollo de brotes y valores adecuados para variables fisiológicas como CRA y F_v/F_m en pA y pC (ver anexos).

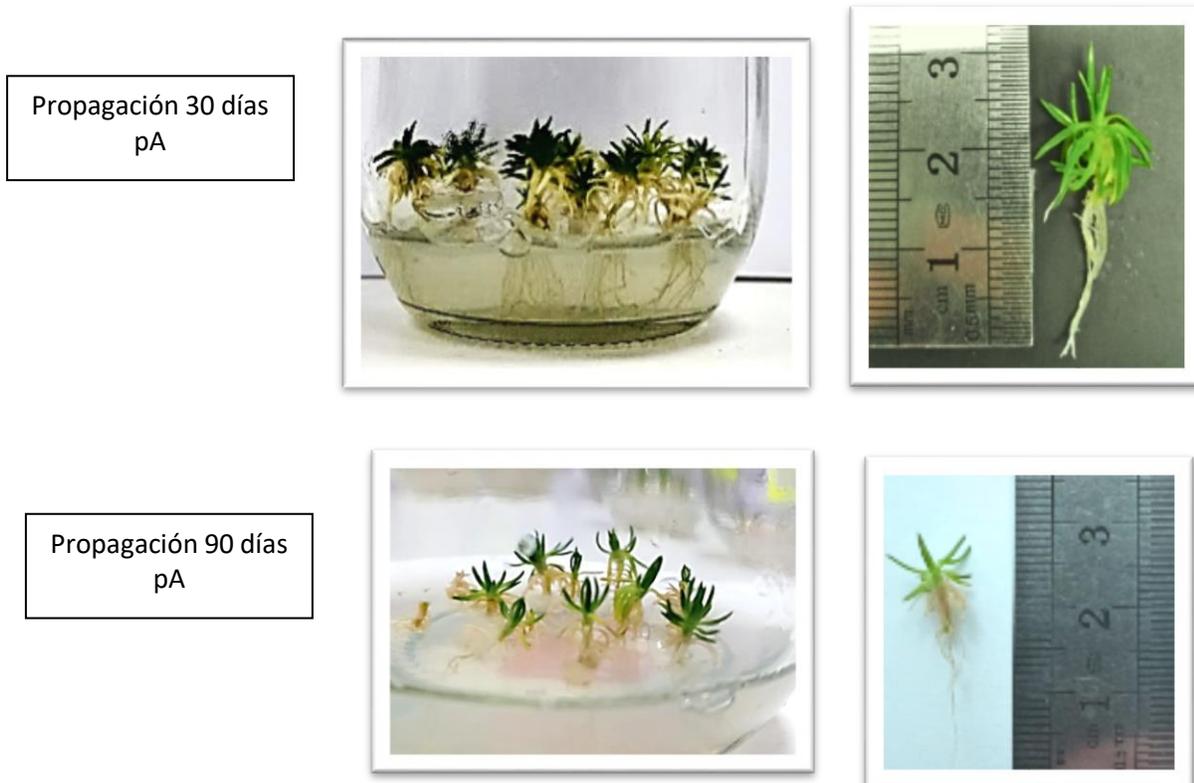


Figura 15: Comparación fotográfica de variables morfológicas en plantas de *C. quitensis* población Arctowski (pA) a los 30 días en medio de propagación vs a los 90 días en medio de conservación (protocolo completo).

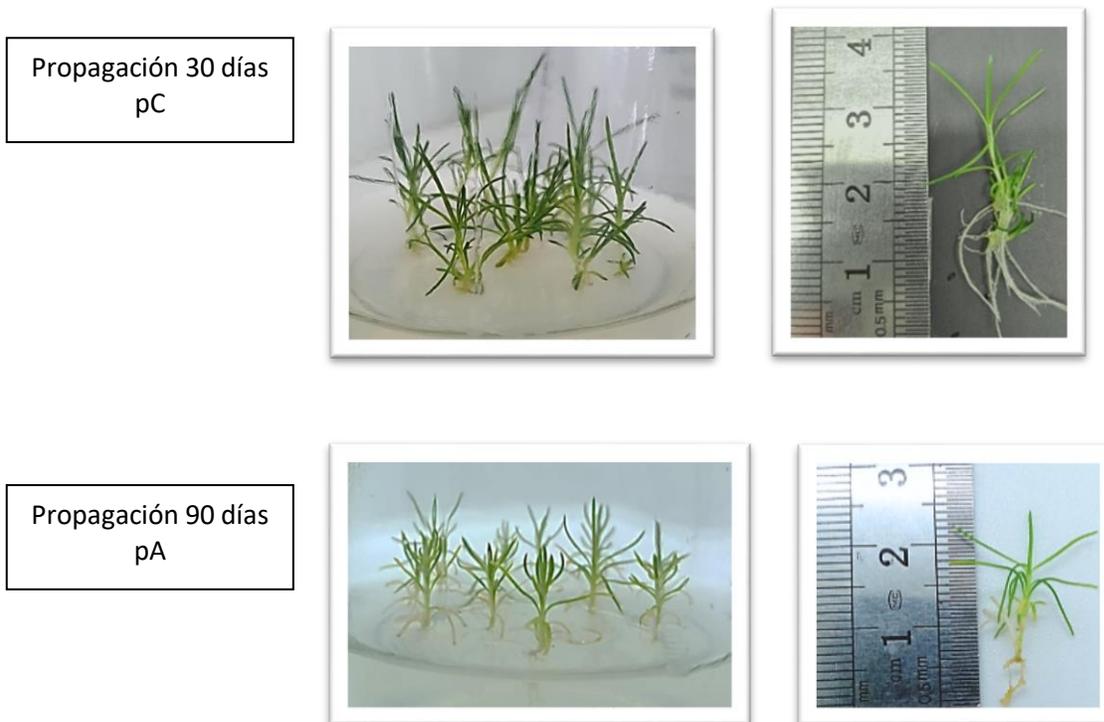


Figura 16: Comparación fotográfica de variables morfológicas en plantas de *C. quitensis* población Conguillio (pC) a los 30 días en medio de propagación vs a los 90 días en medio de conservación (protocolo completo).

7. Discusión

La conservación *in vitro* no es eficiente cuando se dan altas tasas de crecimiento por esto se han realizado investigaciones para lograr reducirlas evaluando los factores que podrían influir en las características del medio de cultivo para lograr un crecimiento mínimo de la especie de interés (Burgos 2020). Uno de los objetivos de esta investigación era evaluar varios factores que podrían incidir en la disminución de las tasas de crecimiento en *C. quitensis* sin altos costos de reproducción. Por lo tanto, debido a la cantidad de factores escogidos y por los período de tiempo que se requerían para evaluar la respuesta de las plantas frente a cada factor o la

combinación de estos, fue necesario dividir la investigación en dos partes y a su vez en etapas donde cada una de estas etapas tuvo una duración de 90 días. La primera parte de la investigación fue desarrollada por Burgos (2020), donde los factores evaluados fueron: (Etapa 1) Disminución de la concentración del medio basal y densidad de explantes en el medio de cultivo, (Etapa 2) Adición de agentes osmo-reguladores (como azúcares o polioles en diferentes concentraciones al medio de cultivo, (Etapa 3) Calidad de luz y cantidad de luz. La combinación de los estos factores que regulan el crecimiento vegetativo y la fisiología vegetal tuvieron un efecto positivo en la disminución de crecimiento vegetal foliar y radicular, así como también una disminución del amarillamiento con una eficiencia fotosintética dentro del rango óptimo para cultivo *in vitro*. Los mejores resultados de las etapas 1 y 2 (MS 50%, 12 explantes por frasco y manitol al 4%) se consideraron como componentes base del medio de cultivo para desarrollar esta segunda parte de la investigación y seguir evaluando factores.

7.1 Etapa 1. Uso distintos tipos de sellado del medio de cultivo en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) como inhibidor de crecimiento y su efecto sobre las plantas de *C. quitensis*.

Para lograr un crecimiento lento en plantas *in vitro* se recurre al control de los entornos físicos y químicos del entorno. Dentro de los factores que se pueden modificar para conseguir un crecimiento reducido de los explantes encontramos el uso de diferentes tipos de sellado del medio de cultivo y el uso de ABA para inhibir el crecimiento del tejido vegetal. Al combinar estos dos factores luego de los 90 días en cámara de crecimiento ambas poblaciones pA y pC no se vieron afectadas negativamente y ambas poblaciones mantuvieron altos contenidos de humedad, con valores por sobre el 80 % en la población Arctowski (pA y valores mayores al 70% para población Conguillio (pC). El largo foliar tuvo valores más irregulares para los tratamientos cuando se usó tapa de aluminio en ambas poblaciones. Sin embargo, al usar tapa celofán o film el largo foliar tendió a disminuir a medida que aumentaba la concentración de ABA con respecto al control, mostrando valores medios en los tratamientos con $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ABA en ambas tapas y en ambas

poblaciones (pC y pA). Al incorporar ABA en el medio de cultivo se produjo una reducción del largo radicular también al aumentar la concentración de ABA. Este resultado es opuesto a lo observado en *Solanum tuberosum* (Lugo et al. 2009), donde se evaluó el efecto del intercambio gaseoso sobre el crecimiento de vitroplantas de papa sometidas a tres condiciones de intercambio gaseoso: alto (tapas de gasa), medio (tapa plástica) y bajo (tapa sellada con envoltura plástica) sin la adición de ningún tipo de regulador u inhibidor de crecimiento. Las plantas tuvieron mayor desarrollo en condiciones de alto intercambio gaseoso, posiblemente debido a que al incrementarse la concentración de CO₂ se estimuló la fotosíntesis y con ello el crecimiento de las plantas; Por lo tanto, se sugiere que el ABA si podría tener un efecto en la disminución del largo foliar y radicular en esta especie. El número de brotes también disminuyó a medida que incrementó la concentración de ABA, produciéndose la mayor cantidad de brotes en el control con doble tapa de aluminio sin ABA. Se ha reportado en varias especies el uso de ABA en la conservación *in vitro*, debido a su efecto como retardante del crecimiento vegetal (Rai et al. 2011). Gopal et al. (2005) observaron que el crecimiento de *Solanum tuberosum in vitro* se redujo al adicionar 2 mgL⁻¹ de ABA, mientras que en *Garcinia mangostana* al usar 1 mgL⁻¹ de ABA redujo el crecimiento sin afectar la supervivencia y el número de brotes (Keatmetha et al. 2006). Barrueto y Carvalho (2008), al evaluar el efecto de ABA sobre la conservación *in vitro* de la yuca (*Manihot esculenta* Grantz), observaron que el número y la longitud de los brotes se reducían al usar concentraciones de 5 y 8 mg L⁻¹, sugiriendo que estas concentraciones son adecuadas para la inducción *in vitro* de la dormancia de brotes para esta especie. Otro estudio sugiere que, las altas concentraciones de ABA (3 mgL⁻¹) pueden llegar a afectar la supervivencia, longitud de brotes y número de brotes por explante, en especies como *Piper aduncum* y *Piper hispidinervum* pero en una concentración de 2 mgL⁻¹ mantuvo 100% de supervivencia, lo que sugiere que esta concentración es adecuada para la inducción de la dormancia *in vitro* del género (Loureiro Da Silva y Scherwinski-Pereira 2011). Similar a lo observado en ambas poblaciones estudiadas con respecto al número de brotes el cual disminuyó al usar ABA y al aumentar su concentración. El ABA tiene efecto sobre varios procesos fisiológicos

de las plantas como es el cierre de estomas, coordinando la conductancia estomática y el agua disponible, evitando la pérdida de agua por transpiración (Helander y Cutler 2018), provocando el cierre de los estomas (Lim et al. 2015), lo cual puede disminuir la capacidad fotosintética y la fijación de carbono (Rai et al. 2011) lo que a su vez reduce el crecimiento vegetal. Además, participa en la regulación endógena de la síntesis de auxinas, citoquininas y giberelinas (Swamy y Smith 2005).

El porcentaje de amarillamiento fue mayor para pA en todos los tratamientos. Así mismo, pA presentó una menor supervivencia en comparación con pC, donde la supervivencia fue de sobre el 80%. Sin embargo, a pesar de que para pA el % de amarillamiento fue superior al 40% en casi todos los tratamientos, el desempeño fotosintético fue adecuado según los valores de Fv/Fm (Ver figura 4). Estos porcentajes de amarillamiento en ambas poblaciones podrían tener relación con el tipo de tapa utilizado y podría deberse a la acumulación de compuestos gaseosos perjudiciales para los tejidos vegetales *in vitro* dentro del frasco, por ejemplo, gas etileno que en una alta concentración pueden causar un aumento en el amarillamiento de las plantas. Se ha reportado que el tipo de tapa del frasco de cultivo afecta a la composición gaseosa interna (Lentini et al. 1988) por ende, puede afectar fuertemente la morfogénesis y el crecimiento de los cultivos vegetales (Marino y Noferini 2013), así como la fisiología y morfología de los brotes. El intercambio gaseoso entre el interior y exterior del recipiente es limitado creando algunas condiciones físicas y químicas que dificultan los procesos normales de crecimiento (Bairu 2009), la diferenciación y el envejecimiento de las plantas cultivadas *in vitro*. Según Marino y Noferini (2013) la acumulación de etileno dentro de los recipientes de cultivo afectó positivamente la proliferación de brotes y el aumento de peso en *Prunus armeniaca* L. en tres cultivares de damasco, San Castrense, Boreale y Vitillo, sin afectar negativamente el enraizamiento posterior, mientras que tuvo efectos totalmente opuestos sobre la regeneración de las hojas de *Pyrus communis* L. (menor regeneración) y *Cydonia oblonga* Mill. (mayor regeneración) (Marino et al. 2008). Sin embargo, según la literatura los efectos que la acumulación de etileno provoca en el crecimiento vegetal depende de la especie,

pudiendo actuar como inhibidor o promotor (Biddington 1992), ya sea estimulando el crecimiento, la regeneración (Van Dijk et al. 1988) y el enraizamiento (Marino y Ventura 1997) o provocando efectos no deseados en cultivo *in vitro* como hiperhidricidad (Park et al. 2004), inhibición de la morfogénesis, disminución del número de brotes (George 1993) o signos indeseados como amarillamiento del tejido. Es por ello que es necesario incorporar en el medio de cultivo algún inhibidor de etileno que permita disminuir los síntomas de estrés vegetal (amarillamiento) en ambas poblaciones. Por consiguiente, los tratamientos que mostraron valores medios para las variables morfológicas y valores adecuados para las variables fisiológicas para esta primera etapa fueron tapa de papel film más la adición de 0.5 mg L⁻¹ ABA.

7.2 Etapa 2. Uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) Inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre las plantas de *C. quitensis*.

Luego de los 90 días en cámara de crecimiento ambas poblaciones pA y pC no se vieron afectadas negativamente frente al uso de diferentes concentraciones de agar en combinación con la incorporación de tiosulfato de plata como inhibidor de etileno en el medio de cultivo. Después de 90 días de cultivo *in vitro* en ambas poblaciones no se observaron mayores diferencias entre los tratamientos de 0,7,0,9 y 1% sin la adición de STS donde las variables como largo foliar y largo de raíz mantuvieron longitudes similares. Se logró observar una disminución promedio de 1 a 2 mm en todos los tratamientos con respecto a la etapa anterior (Ver anexos, imagen 1 y 2). No obstante, al agregar STS la respuesta morfológica de las plantas varió en el tratamiento con agar al 1% con 10µM de STS, donde el largo foliar y de raíz disminuyó mucho más. Cabe recalcar que los valores adecuados elegidos para las variables morfológicas y para conservación de esta especie son los valores medios, ya que valores muy bajos pueden no ser suficientes para la supervivencia en condiciones de crecimiento mínimo. Los valores medios para todas las variables se

presentaron en las concentraciones de agar 0,7 y 0,9%. La literatura plantea que el tipo y la concentración del agente gelificante afecta significativamente la respuesta del material vegetal *in vitro* (Tsay et al. 2006). Estas afecciones están relacionadas con las alteraciones producidas por el agente gelificante sobre la disponibilidad de agua en el medio de cultivo (Ivanova y van Staden, 2011). Ghashghaei et al. (1991) y Beruto et al. (1999a) señalan que el agar es el responsable del componente mátrico del potencial hídrico del medio de cultivo y genera una fuerza del gel que será diferente debido a sus propiedades fisicoquímicas, esta fuerza influye en la liberación de agua, limita la movilidad de los solutos en el medio e influyen en el crecimiento de los tejidos *in vitro* (Veitía et al. 2012). En este caso, al comparar los tratamientos que contenían solo agar en concentraciones de 0,7, 0,9 y 1,0% no se evidenció una respuesta diferencial de las plantas en ambas poblaciones. No obstante, la concentración de gelificante escogida es de 0,7%. Debido a sus propiedades físico-químicas, el agar es el agente gelificante más utilizado en el cultivo de microorganismos y plantas (Amer 1982; Dobranski et al. 2011; Montilla-Escudero et al. 2011), pero es el componente más caro en la preparación del medio de cultivo (Babbar et al. 2005), ya que incrementa en un 70% el costo total del medio (Prakash 1993 citado por Mohamed et al. 2010). Por lo tanto, al usar una concentración mayor a 0,7% incurrirá en un gasto innecesario ya que no se evidencia un efecto significativo sobre el crecimiento mínimo en ambas poblaciones. La adición de STS en general provocó una disminución del porcentaje de amarillamiento, sin embargo, los valores medios se observaron con las concentraciones 0 y 10 μM en agar 0,7%. Para la supervivencia y para el rendimiento fotosintético todos los tratamientos mostraron valores adecuados para la especie. Según la literatura el STS se ha utilizado para mejorar la organogénesis foliar (Chae et al. 2012) y para el control de enraizamiento y la formación de nuevos brotes *in vitro* (Steinitz et al. 2010). En estudios realizados para la conservación *in vitro* de *Lippia filifolia* (Verbenaceae) se evaluó el STS y su efecto sobre la inhibición de la síntesis de etileno y se observó que el tiosulfato de plata junto a otros inhibidores, tuvieron efectos protectores sobre el estrés oxidativo en tejidos cultivados *in vitro* (Pimenta et al. 2013). En estudios previos del LBEA realizados

por Acuña (2014) y para optimizar algunos parámetros críticos en la propagación *in vitro* de *C. quitensis* como el amarillamiento, se probaron distintas concentraciones de STS 0 μM (control), 1 μM , 10 μM y 30 μM en el medio de cultivo, donde STS a 10 μM mostró un menor porcentaje de amarillamiento foliar y muerte de plántulas, junto a una mayor regeneración de brotes y raíces.

Según la literatura la incorporación del STS al medio de cultivo resulta efectiva para la disminución de síntomas de amarillamiento probablemente causados por la acumulación de etileno en el frasco. Pero en esta ocasión se requiere un nuevo análisis para definir si la incorporación o no del tiosulfato de plata tiene alguna incidencia sobre los síntomas de estrés vegetal para la especie en método de crecimiento mínimo *in vitro*, pudiendo evaluar otras concentraciones de STS en combinación con ABA para evaluar si a interacción de estos influye en el amarillamiento. Junto a lo anterior, es necesario evaluar el tiempo máximo en que pueden permanecer los explantes en crecimiento mínimo *in vitro* al usar todos los factores evaluados (etapa final), debido a que la combinación de los mejores resultados de todas las etapas podría extender por más de 90 días el período de tiempo en que los explantes mantengan su actividad fisiológica y metabólica al mínimo reduciendo su crecimiento sin síntomas de estrés vegetal.

8. CONCLUSIONES

La adición de ácido abscísico (ABA) en una concentración de 0.5 mg L⁻¹ en el medio de cultivo retarda significativamente el crecimiento *in vitro* de *C. quitensis* en las poblaciones Arctowski y Conguillio, observándose una reducción del largo foliar, largo de raíz y del número de brotes en presencia de todos los tipos de tapas, pero más significativamente al usar tapa de papel film. Esta combinación de variables permitió un buen desempeño fotosintético en las plantas, sin mostrar incidencia sobre el número de ápices foliares.

- No se evidenció un efecto significativo en el crecimiento mínimo de las plantas para ambas poblaciones al aumentar las concentraciones de agar. Por lo tanto, se

recomienda usar agar 0,7% por ser la concentración más baja y económica usada en el laboratorio

- La adición de STS podría haber influido en la disminución del porcentaje de amarillamiento con respecto a la etapa anterior sobre todo en la población Arctowski, donde el porcentaje de amarillamiento en la primera etapa fue sobre el 50%. De todas formas, el menor porcentaje de amarillamiento se observó en las concentraciones de 0 y 10 μM para ambas poblaciones. Pero son necesarios más análisis para evaluar la incorporación del tiosulfato de plata y su efecto sobre los síntomas de estrés vegetal para la especie en método de crecimiento mínimo *in vitro*.

El crecimiento mínimo *in vitro* representa una solución para el almacenamiento del material vegetal de mediano a largo plazo en un espacio limitado y a costos reducidos. Además, la aplicación de este tipo de método de cultivo de tejidos permite la conservación de plantas clonales durante varios meses o años (dependiendo de la especie) en condiciones asépticas, lo que requiere subcultivos poco frecuentes. Por lo tanto y en cuanto a los resultados obtenidos en esta investigación se cumplen los objetivos planteados de establecer un completo protocolo para la conservación *in vitro* en condiciones de crecimiento mínimo para *C. quitensis* (Kunth) Bartl con un buen desarrollo morfofisiológico de las plantas y con una extensión del tiempo de subcultivo de 30 a 90 días y con una óptima eficiencia fotosintética. La aplicación de este protocolo de conservación para *C. quitensis* facilita el mantenimiento de plántulas con costos reducidos, además de propiciar el desarrollo de todo tipo de investigaciones evitando la recolección excesiva de material vegetal en su hábitat natural; por lo que representa una herramienta de alto valor científico.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña D (2014) Optimización de protocolos para la propagación *in vitro* en diferentes poblaciones chilenas de *Colobanthus quitensis* (KUNTH) Bartl. Tesis de Pregrado. Ingeniería en Biotecnología Vegetal. Universidad de Concepción, Chile:1-66
- Acuña-Rodríguez I, Torres-Díaz C, Hereme R, Molina-Montenegro M (2017) Asymmetric responses to simulated global warming by populations of *Colobanthus quitensis* along a latitudinal gradient. PeerJ 5: e3718
- Alberdi M, Bravo L, Corcuera L (2004) Ecofisiología de las plantas vasculares antárticas. Marino H. (Ed) Fisiología ecológica en plantas, Valparaíso, Chile: 249-265
- Amer J (1982) Influence of agar Concentration on *in vitro* Shoot Proliferation of *Malus* sp. *Almely* and *Pyrus communis* Seckel. Journal of the American Society for Horticultural Science 107: 657-660
- Amer A, Omar H (2019) *In vitro* propagation of the multipurpose Egyptian medicinal plant *Pimpinella anisum*. Egyptian Pharmaceutical 18: 254-262
- Androsiuk P, Chwedorzewska K, Szandar K, Giełwanowska I (2015) Genetic variability of *Colobanthus quitensis* from King George Island (Antarctica). Polish Polar Research 36
- 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
- Arrigoni-Blank M, Tavares F, Blank A, Santos M, Menezes T, Santana A (2014) *In vitro* Conservation of Sweet Potato Genotypes. The Scientific World Journal 2014: 1-7
- Arroyo F (2023) Respuestas diferenciales en la tolerancia a la salinidad en poblaciones de *Colobanthus quitensis* Kunth (Bartl.). Tesis de Pregrado. Ing. Biotecnología Vegetal]. Universidad de Concepción, Chile

- Aubert S, Boucher F, Lavergne S, Renaud J, Choler P (2014) 1914–2014: A revised worldwide catalogue of cushion plants 100 years after Hauri and Schröter. *Alpine Botany* 124: 59–70
- Azcon-Bieto J, Talon M (2008) *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2da edición. Mc Graw-Hill. New York
- Babbar S, Jain R, Walia N (2005) Guar gum as a gelling agent for plant tissue culture media. *In Vitro Cell Developmental Biology - Plant* 41: 258-261
- Bairu M, Stirk W, Van Staden J (2009) Factors contributing to *in vitro* shoot-tip necrosis and their physiological interactions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 98:239-248
- Bascuñán-Godoy L, Uribe E, Zúñiga-Feest A, Corcuera LJ, Bravo LA (2006) Low temperature regulates sucrose-phosphate synthase activity in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. by decreasing its sensitivity to Pi and increased activation by glucose-6- phosphate. *Polar Biology* 29: 1011–1017
- Bascuñán-Godoy L, Sanhueza C, Cuba M, Zúñiga G, Corcuera L, Bravo L (2012) Cold-acclimation limits low temperature induced photoinhibition by promoting a higher photochemical quantum yield and a more effective PSII restoration in darkness in the Antarctic rather than the Andean ecotype of *Colobanthus quitensis* Kunt Bartl (Cariophyllaceae). *BMC Plant Biology* 12: 114-128
- Barrueto L, Carvalho L (2008) Importance of abscisic acid (ABA) in the *in vitro* conservation of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Chilean journal of agricultural research* 68: 304-308
- Bello-Bello J, Poot-Poot W, Iglesias-Andreu L, Caamal-Velázquez H, Diaz-Sanchez M (2014) Comparación del efecto de osmorreguladores e inhibidores del crecimiento en la conservación *in vitro* de caña de azúcar. *Agrociencia* 48: 439-446
- Benelli C, Tarraf W, Izgu T, De Carlo A (2022) *In Vitro* Conservation through Slow Growth Storage Technique of Fruit Species: An Overview of the Last 10 Years. *MDPI Plants* 11: 3188

- Bello-Bello J, García-García G, Iglesias-Andreu L (2015) Conservación de vainilla (*vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. Revista Fitotecnia Mexicana 38: 165-171
- Beruto M, Beruto D, Debergh P (1999a) Influence of agar on *in vitro* cultures: I Physicochemical properties of agar and agar gelled media. *In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant* 35: 137-143
- Biddington N (1992) The Influence of Ethylene in Plant Tissue Culture. *Plant Growth Regulation* 11: 173-187
- Biersma E, Torres-Díaz C, Molina-Montenegro M, Newsham K, Vidal M, Collado G, Acuña-Rodríguez I, Ballesteros G, Figueroa C, Goodall-Copestake W, Leppe M, Cuba-Díaz M, Valladares MA, Pertierra L, Convey P (2020) Multiple late-Pleistocene colonisation events of the Antarctic pearlwort *Colobanthus quitensis* (Caryophyllaceae) reveal the recent arrival of native Antarctic vascular flora. *Journal Of Biogeography* 47: 1663-1673
- Bhojwani S, Dantu P (2013) Conservation of Phytodiversity. In: *Plant Tissue Culture: An introductory text*. Springer: 287-298
- Bonilla M (2015) Conservación *in vitro*: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos. *Revista De Investigación Agraria y Ambiental* 6: 67-82
- Bravo L, Ulloa N, Zuñiga G, Casanova A, Corcuera L, Alberdi M (2001) Cold resistance in antarctic angiosperms. *Physiologia Plantarum* 111: 55–65
- Bravo L, Saavedra-Mella F, Vera F, Guerra A, Cavieres L, Ivanov A, Huner N, Corcuera L (2007) Effect of cold acclimation on the photosynthetic performance of two ecotypes of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Journal of Experimental Botany* 58: 3581-3590
- Bunnag S, Khonkayan S (2010) Long-term preservation of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. using encapsulation method. *Extreme Life, Biospeology and Astrobiology* 2: 45-50
- Burgos R (2020) Establecimiento de un protocolo para la conservación *in vitro* de *Colobanthus quitensis* en condiciones de crecimiento mínimo. Tesis de Pregrado Ing. en Biotecnología Vegetal. Universidad de Concepción, Los Ángeles, Chile: 1-84

- Cameron A, Reid M (1981) The use of silver anionic complex as a foliar spray to prevent flower abscission of *Zigocactus*. *HortScience* 16: 761-762
- Carmona O (2017) Microtuberización en la especie *Dioscorea rotundata* cultivar botón. Tesis Magister en ciencias de la Biotecnología, Universidad de Córdoba:1-70
- 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: 1-70
- Cati M, Gennari F, Marino G (2014) Effect of culture jar seal on *in vitro* rooting and subsequent acclimatization of three Italian apricot varieties. *Scientia Horticulture* 168 :120-123
- Chae S, Kim H, Park S (2012) Ethylene inhibitors enhance shoot organogenesis of gloxinia (*Sinningia speciosa*). *The Scientific World Journal*: 10-13
- Chandran S, Raghu A, Mohanan K (2023) *In Vitro* Conservation of Rare, Endangered, and Threatened Plants. In: Sukumaran S (eds) *Conservation and Sustainable Utilization of Bioresources*. Sustainable Development and Biodiversity. Springer, Singapore.
- Chauhan R, Singh V, Quraishi A (2019) *In Vitro* Conservation Through Slow-Growth Storage. In: Faisal M, Alatar A (eds) *Synthetic Seeds*. Springer
- Chimesa E (2020) Composition and preparation of plant tissue culture medium. *Journal of Tissue Culture Bioengineering* 3: 120
- Cho S, Lee H, Jo H, Lee H, Kang Y, Park H, Lee J (2018) Comparative transcriptome analysis of field- and chamber-grown samples of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl, an Antarctic flowering plant. *Scientific Reports- Nature* 8: 11049
- Chwedorzewska K (2009) Terrestrial Antarctic ecosystems in the changing world: An overview. *Polish Polar Research* 30: 263-276
- Convey P (1996) The influence of environmental characteristics on the life history attributes of Antarctic terrestrial biota. *Biological Reviews* 71: 191-225
- Convey P, Hopkins D, Roberts S, Tyler A (2011) Global southern limit for flowering plants and moss peat accumulation. *Polar Research* 30: 8929

- Cordero C (2012) Caracterización y análisis de variabilidad morfológica y genética en poblaciones de *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae). Memoria para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Vegetal. Universidad de Concepción, Los Ángeles, Chile: 1-54
- Corredoira E, Valladares S, Martínez T, Couselo J, San José M, Ballester A, Vieitez (2011) Conservación de germoplasma en especies leñosas con técnicas de cultivo *in vitro* y almacenamiento en frío. Spanish Journal of Rural Development 2: 15-24
- Cruz-Cruz A, González-Arno M, Engelmann F (2013) Biotechnology and conservation of plant biodiversity. Journal Resources 2: 73-95
- Cuba-Díaz M, Acuña D, Cordero C, Klagges M (2014) Optimización de parámetros para la propagación *in vitro* de *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. Gayana Botánica 71: 58-67
- Cuba-Díaz M, Marín C, Castel K, Machuca A, Rifo S (2017) Effect of copper (II) ions on morpho-physiological and biochemical variables in *Colobanthus quitensis*. Journal of soil science and plant nutrition 17: 429-440
- Cuba-Díaz M, Castel K, Acuña D, Machuca A, Cid I (2017) Sodium chloride effect on *Colobanthus quitensis* seedling survival and *in vitro* propagation. Antarctic Science 29: 45-46
- Cuba-Díaz M, Klagges M, Fuentes-Lillo E, Cordero C, Acuña D, Opazo G, Troncoso-Castro JM (2017a) Phenotypic variability and genetic differentiation in continental and island populations of *Colobanthus quitensis* (Caryophyllaceae: Antarctic pearlwort). Polar Biology 40: 2397–2409
- Cuba-Díaz M, Cerda G, Rivera C, Gómez A (2017b) Genome size comparison in *Colobanthus quitensis* populations show differences in species ploidy. Polar Biology 40: 1475–1480
- 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. Scientific Reports 10: 3845

- Cubillos E, Molina V, Flórez V, Fischer G (2001) Efecto de inhibidores de etileno en la longevidad floral del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) como probables sustitutos del tiosulfato de plata (STS). *Agronomía Colombiana* 18: 89-96
- Das N, Tripathi N, Basu S, Bose C, Maitra S, Khurana S (2015) Progress in the development of gelling agents for improved culturability of microorganisms. *Frontiers in Microbiology* 6: 698
- Dobránszki J, Magyar-Tábori K, Tombácz E (2011) Comparison of the rheological and diffusion properties of some gelling agents and blends and their effects on shoot multiplication. *Plant Biotechnology Reports* 5: 345-352
- Engelmann F (1991) *In vitro* conservation of tropical plant germplasm. A review. *Euphytica* 57: 227-243
- Engelmann F (2011) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In vitro Cellular & Developmental Biology* 47: 5–16
- Espindula M, Rocha V, Grossi J, Souza M, Souza L, Favarato L (2009) Use of growth retardants in wheat. *Planta Daninha* 27: 379–387
- Espinosa A, González O, Silva J (2003) Conservación *in vitro* de clones de boniato en condiciones de crecimiento mínimo. *Biotecnología Vegetal* 3: 37-41
- Fu Y (2017) The vulnerability of plant genetic resources conserved ex situ. *Crop Science* 57: 2314-2328
- García L, Feria M, Acosta K (2007) Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal* 7:67–79
- George E (1993) *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology* Exegetics Ltd., UK
- Gerdakaneh M, Badakhshan H, Mohamadi M, Arji I (2020) Effect of different media and growth regulators on micropropagation of Gf677. *Journal of Plant Productions* 43: 241–254
- Ghashghaie J, Grenckmann F, Saugier B (1991) Effects of concentration on water status and growth of rose plants cultured *in vitro*. *Physiology Plant* 82: 73-78
- Gianoli E, Zuñiga-Feest A, Reyes-Diaz M, Bravo L, Corcuera L (2004) Ecotypic differentiation in morphology and cold resistance in populations of *Colobanthus*

- quitensis* from the Andes of central Chile and the maritime Antarctic. Arctic, Antarctic, and Alpine Research 36: 470-475
- Glick B (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological Research 169: 30-39
 - Greene D, Holtom A (1971) Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. a Deschampsia Antarctica Desv.: III. Distribution, habitats and performance in the Antarctic botanical zone Antarctic Survey Bulletin 26: 1–29
 - Gopal J, Chamail A, Sarkar D (2005) Use of microtubes for slow growth *in vitro* conservation of potato germplasm. Plant Genetic Research News 141: 56-60
 - Haider S, Alexander J, Kueffer C (2011) Elevational distribution limits of non-native species: combining observational and experimental evidence. Plant Ecology y Diversity 4: 363–371
 - Hemadri S, Chakravarthi M, Chandrashekara K, Naidu C (2012) Influence of bavistin and silver thiosulphate on *in vitro* regeneration of *Asclepias curassavica* (L). using nodal Explants. American Journal of Plant Sciences 7: 941-946
 - Helander J, Cutlet S (2018) Abscisic Acid Signaling and Biosynthesis: Protein Structures and Molecular Probles. In: Hejatko, J, Hakoshima T (eds) Plant Structural Biology: Hormonal Regulations. Springer
 - Ifeanyi N, Ndukwe O, Ekaiko M (2016) Germplasm preservation and propagation: the foundation of agricultural development- a review. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences 11: 70–73
 - Instituto de Investigaciones Agropecuarias (2022) Revista Tierra Adentro N° 116. Red de Bancos de Germoplasma INIA
 - Isah T (2015) Adjustments to *in vitro* culture conditions and associated anomalies in plants. Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica: 57
 - Ivanova M, Van Staden J (2011) Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe Polyphylla*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 104: 13-21
 - Jarret R, Gawel N (1991) Abscisic acid-induced growth inhibition of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 24: 13-18

- Johannes J, Hui C, Castillo M, Iriondo J, Jan-Hendrik K, Khapugin A, Médail F, Rejmánek M, Theron G, Yannelli F, Hirsch H (2019) Recent anthropogenic plant extinctions differ in biodiversity hotspots and coldspots. *Current Biology* 29: 2912–2918
- Jordán M, Casaretto J (2007) Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En: Squeo FA, Cardemil L, editores. *Fisiología Vegetal*. 1ª ed. Chile: Departamento de Biología: 1–28
- Kalra G, Bhatla C (2018) Ácido abscísico. En: Satish B, Manju L (eds) *Fisiología, Desarrollo y Metabolismo Vegetal*. Springer, Singapur: 629-641
- Keatmetha W, Suksa-Ard P, Mekanawakul M, TeChato S (2006) *In vitro* germplasm conservation of *Garcinia mangostana* L. and *Lansium dosmesticum* Corr. Walailak J. *Science and Technology* 3: 33-50
- Klagges M, Cordero C, Cuba-Díaz M (2013) Las poblaciones de *Colobanthus quitensis* presentan diferenciaciones morfo-fisiológicas que podrían evidenciar la formación de ecotipos en su hábitat. Libro de resúmenes VII Congreso Latinoamericano de Ciencia VII Congreso Latinoamericano de Ciencia Antártica, La Serena -Chile, Publicación del Instituto Antártico Chileno Antártica: 49-52
- 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.
- Koc J, Androsiuk P, Chwedorzewska K, Cuba-Díaz M, Górecki R, Gielwanowska I (2018) Range-wide pattern of genetic variation in *Colobanthus quitensis*. *Polar Biology* 41: 2467–2479
- Kumar P, Lakshmanan P, Thorpe T (1998) Regulation of morphogenesis in plant-tissue culture by ethylene. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 34: 94–103
- Kumari N, Gupta A, Pandey B, Kushwaha R, Yaseen M (2023) *In Vitro* Cultures: Challenges and Limitations. In: Mishra, M, Kumari N (eds) *Plants for Immunity and Conservation Strategies*. Springer, Singapore
- Lakhera K, Kumar A, Rani A, Dixit R, Rana S (2018) Plant tissue culture and its application. *Bulletin of Pure and Applied Sciences* 37b:32

- Lambardi M, Benelli C, Fabbri A (1997) *In vitro* axillary shoot proliferation of apple rootstocks under different ethylene conditions. *In vitro cellular y Developmental Biology-Plant* 33: 70-74
- 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 Science* 54: 75–81
- Leva A, Rinaldi L (2012) Recent advances in plant *in vitro* culture. InTech Prepress, Novi Sad: 219
- Lewis-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) *Antartic Biology in a Global Context*. Leiden, Backhuys Publishers: 34–239
- Liang C, Wang Y, Zhu Y, Tang J, Hu B, Liu L, Ou S, Wu H, Sun X, Chu J, et al. (2014) OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 10013-10018
- Lim C, Baek W, Jung J, Kim J, Lee S (2015) Function of ABA in stomatal defense against biotic and drought stresses. Intern. Special Issue of International Journal Maolecular 16: 15251–15270
- Loureiro da Silva T, Scherwinski-Pereira J (2011) *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46: 384-389
- Lugo G, Mogollón N, Rodríguez Z, Díaz J (2009) Efecto del intercambio gaseoso sobre el crecimiento y tuberización de vitroplantas de papa. *Revista de la Facultad de Agronomía* 26: 325-339
- Mantovani A, Cardoso R (2000) Leaf micromorphology of Antarctic pearlwort *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Polar Biology* 28: 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, Ventura M (1997) The influence of ethylene on *in vitro* rooting of GF 677 (*Prunus persica* × *Prunus amygdalus*) hybrid peach rootstock *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 33: 26-29
- Marino G, Franchin C, Marcolini G, Biondi S (2008) Adventitious shoot formation in cultured leaf explants of quince and pear is accompanied by different patterns of ethylene and polyamine production, and responses to aminoethoxyvinylglycine. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 83: 206-266
- Marino G, Noferini M (2013) Effect of the type of closure for culture bottles on micropropagation efficiency of apricot. *Scientia Horticulturae* 161: 306–313
- MINAGRI (2014) Conservación, acceso y valorización del patrimonio fitogenético: Acciones y mejoras de los Bancos de Germoplasma en Chile. Quad Graphics Chile S.A: 56
- Minutolo M, Chiaiese P, Di Matteo A, Errico A, Corrado G (2020) Accumulation of ascorbic acid in tomato cell culture: influence of the genotype, source explant and time of *in vitro* cultivation. *MDPI Antioxidants* 9: 222
- Molina-Montenegro M, Torres-Díaz C, Carrasco-Urra F, González-Silvestre L, Gianoli E (2012) Phenotypic plasticity in two antarctic populations of *Colobanthus quitensis* (Caryophyllaceae) under a simulated global change scenario. *Gayana Botanica* 69: 152-160
- Moore D (1970) Antarctic terrestrial plants and their ecology. *British Antarctic Survey Bulletin* 23: 63-80
- Mohamed M, Alsadon A, Al Mohaidib M (2010) Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micropropagation. *African Journal of Biotechnology* 9: 12-16
- Mohamed G, Amer A, Osman N, Sedik M, Hussein M (2021) Effects of different gelling agents on the different stages of rice regeneration in two rice cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28: 5738-5744
- Mohan S (2011) Prospects of *in vitro* conservation of date palm genetic diversity for sustainable production. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 23: 110-119

- Montilla-Escudero E, Dulce-Rivedeneira M, Quevedo-Hidalgo B, Mercado-Reyes M, Álvarez-León R, Molina-Vargas J, Trespalacios Rangel A (2011) Efecto del tratamiento alcalino sobre la productividad y las propiedades físicas del agar-agar proveniente de *Gracilaria verrucosa*. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVERMAR 40: 75-88
- Molina-Montenegro M, Torres-Díaz C, Carrasco-Urra F, González-Silvestre L, Gianoli E (2012) Phenotypic plasticity in two antarctic populations of *Colobanthus quitensis* (Caryophyllaceae) under a simulated global change scenario. *Gayana Botanica* 69: 152-160
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Niino T, Arizaga MV (2015) Cryopreservation for preservation of potato genetic resources. *Breeding Science* 65:41-52
- Normah M, Choo W, Yap L, Mohamed Z (2011) *In vitro* conservation of Malaysian biodiversity-achievements, challenges, and future directions. *In vitro Cellular y Developmental Biology* 47: 26-36
- Nhut D (2022) General Information: Some Aspects of Plant Tissue Culture. In: Nhut D, Tung H, Yeung E(eds) *Plant Tissue Culture: New Techniques and Application in Horticultural Species of Tropical Region*. Springer, Singapore
- Ortuño T, Díaz L, Del Río J (2015) Evolución de la Fisiología Vegetal en los últimos 100 años. *Revista Eubacteria. Cien años de avances en ciencias de la vida*: 34
- Park S, Jeon J, Kim H, Park Y, Aswath C, Joung (2013) Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 99: 199-205
- Pence V (2011) Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In vitro Cellular y Developmental Biology* 47:176-187
- Pimda W, Bunnag S (2010) Cryopreservation of *Dendrobium heterocarpum* Lindl. Via encapsulation-dehydration method. *Bioflux* 2: 7-14
- Pimenta M, Ribeiro C, Soares C, Mendes G, Braga V, Reis L, Otoni W, Resende C, Viccini L, Peixoto P (2013) Effects of ethylene synthesis inhibition on oxidative

- stress and *in vitro* conservation of *Lippia Filifolia* (Verbenaceae). Brazilian Journal Biology 73: 617–621
- Prakash S, Hoque M, Brinks T (2004) Culture media and containers. In: Low costs options for tissue culture technology in developing countries. Austria: International Atomic Energy Agency: 29-40
 - Prudente D, Nery F, Paiva R, Santos P, Nery M, Paiva P (2015) *In vitro* germination and cryopreservation of *Zinnia elegans* seeds. Ornamental Horticulture 21: 243-250
 - Vijayan R, Sreeja C, Raghu A (2018) Biotechnological approaches in conservation of medicinal plants: a review. In: Raghu A, Amruth M, Muhammed Kunhi M, Raveendran V, Viswanath S (eds) Prospects in conservation of medicinal plants. Kerala Forest Research Institute, India: 13-17
 - Rai M, Shekhawat H, Gupta M, Phulwaria K, Ram, Jaiswal U (2011) The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. Plant Cell Tissue Organ Culture 106: 179-190
 - Rajasekharan P, Sahijram L (2015) *In vitro* conservation of plant germplasm. In: Plant biology and biotechnology. Springer, New Delhi : 417-443
 - Ramírez-mosqueda M, Cruz-cruz C, Atlahua-temoxtle J, Bello-bello J (2019) South African Journal of Botany *in vitro* conservation and regeneration of *Laelia anceps* Lindl. South African Journal of Botany 121: 219–223
 - Renau-Morata B, Arrillaga I, Segura I (2006) *In vitro* storage of cedar shoot cultures under minimal growth conditions. Plant Cell Reports 25: 636-642
 - Sáez P, Cavieres L, Galmes J, Gil-Pelegrin E, Peguero-Pina J, Sancho-Knapik D, Vivas M, Sanhueza C, Ramirez C, Rivera B, Corcuera L, Bravo L (2018) In situ warming in the Antarctic: effects on growth and photosynthesis in Antarctic vascular plants. New Phytologist. 218: 1406-1418
 - Sánchez-chiang N, Jiménez V (2010) Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. Agronomía Mesoamericana 21: 193-205

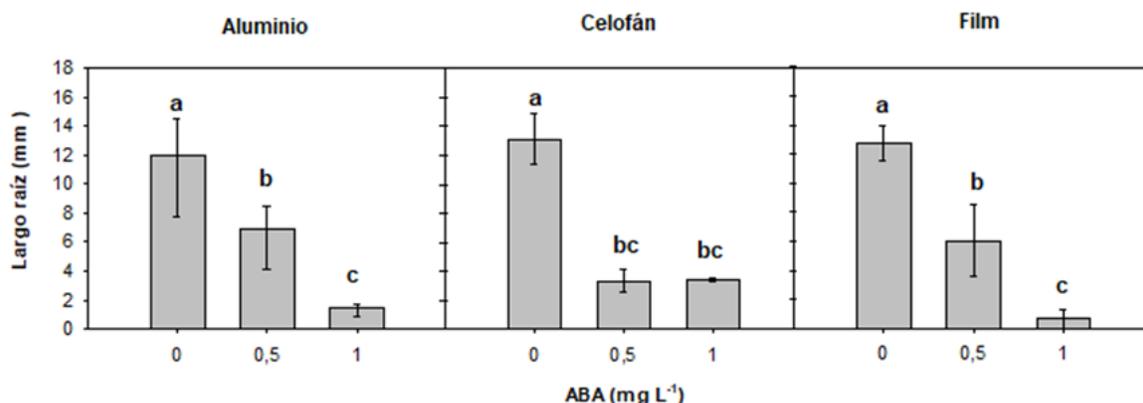
- Sarasan V, Cripps R, Ramsay M, Atherton C, McMichen M, Prendergast G, Rowntree JK (2006) Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decades. In *Vitro Cellular Developmental Biology - Plant* 42: 206–214
- Sharma N, Satsangi R, Pandey R, Singh R, Kaushik N, Tyagi R (2012) *In vitro* conservation of *Bacopa monnieri* (L.) using mineral oil. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 111: 291–301
- Sharry S, Adema M, Abedini W (2020). Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Editorial De La Universidad De La Plata: 13-194
- Sierra-Almeida A, Casanova-Katny M, Bravo L, Corcuera L, Cavieres L (2007) Photosynthetic responses to temperature and light of Antarctic and Andean populations of *Colobanthus quitensis* (Caryophyllaceae). *Revista Chilena de Historia Natural* 80: 335–343
- Smith R (2012) *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Academic Press. Texas, USA
- Steinitz B, Barr N, Tabib Y, Vainin Y, Bernstein N (2010) Control of *in vitro* rooting and plant development in *Corymbia maculate* by silver nitrate. *Plant Cell Report* 29: 1315-1323
- Suárez L (2011) Reguladores de crecimiento vegetal en el cultivo de tejidos *in vitro*. XLI Congreso anual COMALFI: 91-94
- Suárez I (2015) *Cultivo de tejidos vegetales*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba, Colombia
- Suárez I y Otero R (2016) Ácido abscísico y sacarosa afectan la producción *in vitro* de túberos de ñame (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Temas Agrarios* 21: 9-17
- Suárez I, Ortiz O y López C (2017) Arrow cane (*Gynerium sagittatum* Aubl.) *in vitro* rhizome formation and plantlet recovery. *Temas Agrarios* 22:9-18
- Sundararajan S, Sivaraman B, Rajendran V, Ramalingam S (2017) Tissue culture and agrobacterium-mediated genetic transformation studies in four commercially important Indica Rice cultivars. *Journal Crop Science Biotechnology* 20: 175–183

- Swamy P y Smith B (2005) Role of abscisic acid in plants stress tolerance. *Current Science* 76: 1220-1227
- Thangavel K, Ebbie M, Ravichandran P (2014) Biotechnology and *in vitro* conservation of medicinal plants. *Annals of Plant Science* 3:734–744
- Thorpe T (2012). History of plant tissue culture. *Methods Molecular Biology* 877: 9-27
- Tokhtar L, Borodayeva Z, Tokhtar V, Kulko S, Tkachenko N (2020) The creation of biotechnological plant collections in the botanical gardens of russia as one of the promising directions for the conservation of the biological diversity of living systems. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 21: 21-27
- Trejgell A, Kaminska M, Tretyn A (2015) *In vitro* slow growth storage of *Senecio macrophyllus* shoots. *Acta Physiologiae Plantarum* 37:234
- Trujillo I, Subero B, Silva A (2019) Conservación *in vivo* e *in vitro* de germoplasma vegetal en escuelas de los Altos Mirandinos. *Revista Tekhné* 22
- Tsay H, Lee C, Agrawal D, Basker S (2006) Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae*-a medicinal plant. *Acta Horticulturae* 461: 243-249
- Van Dijk R, De Proft M , De Greef J (1988) Role of ethylene and cytokinins in the initiation of lateral shoot growth in bromeliads *Plant Physiology* 88: 836-840
- Veitía N, Collado R, García L, Bermúdez-Carabaloso I, Torres D, Romero C (2012) Influencia del agente gelificante en la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de callos organogénicos”. *Biología Vegetal* 12: 143-148
- Verdugo G, Riffo L (2003) Efecto de inhibidores de etileno en postcosecha de flores cortadas de liliun. *Cortadas De Liliun. Science, Technology and Arts Research* 30: 89–95
- Visscher A, Vandelook F, Fernandez-Pascual E, Perez- Martinez L, Ulian T, Diazgranados M, Mattana E (2022) Low availability of functional seed trait data from the tropics could negatively affect global macroecological studies, predictive models and plant conservation. *Annals of Botany* 130: 773–784

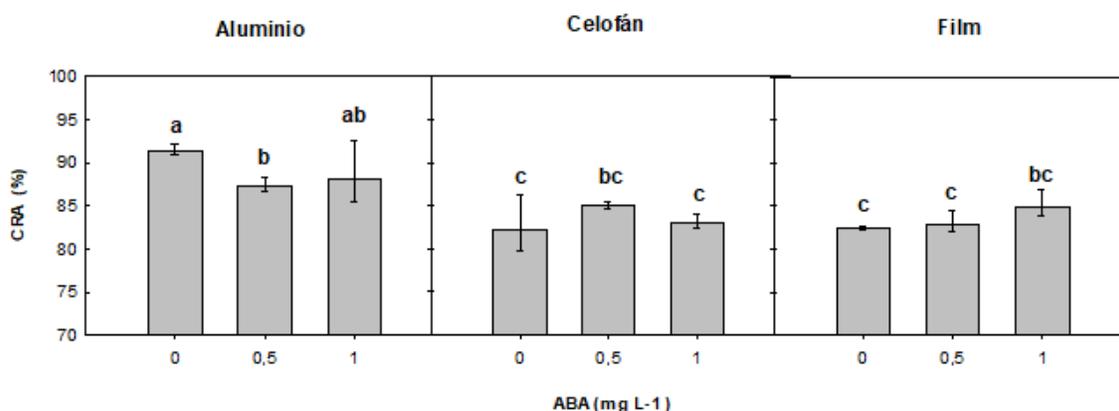
- Wang X, Catt S, Pangestu M, Smith P (2011) Successful *in vitro* culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. *Reproduction* 141: 183–191
- Withers L (1980) Preservation of Germplasm. In: Vasil I (eds) *Perspectives in plant cell and tissue culture (international review of cytology, Suppl. 11B)*. Academic, New York 101–133
- Zhao Y, Chan Z, Gao J, Xing L, Cao M, Yu C, Hu Y, You J, Shi H, Zhu Y, Gong Y, Mu Z, Wang H, Deng X, Wang P, Bressan R, Zhu J (2016) ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 113: 1949–1954
- Zúñiga G, Zamora P, Ortega M, Obrecht A (2009) Short Note: Micropropagation of Antarctic *Colobanthus quitensis*. *Antarctic Science* 21: 149-150

ANEXOS

Los anexos a continuación muestran los gráficos de las variables no significativas según ANOVA FACTORIAL (Ver tablas 1 de resultados)

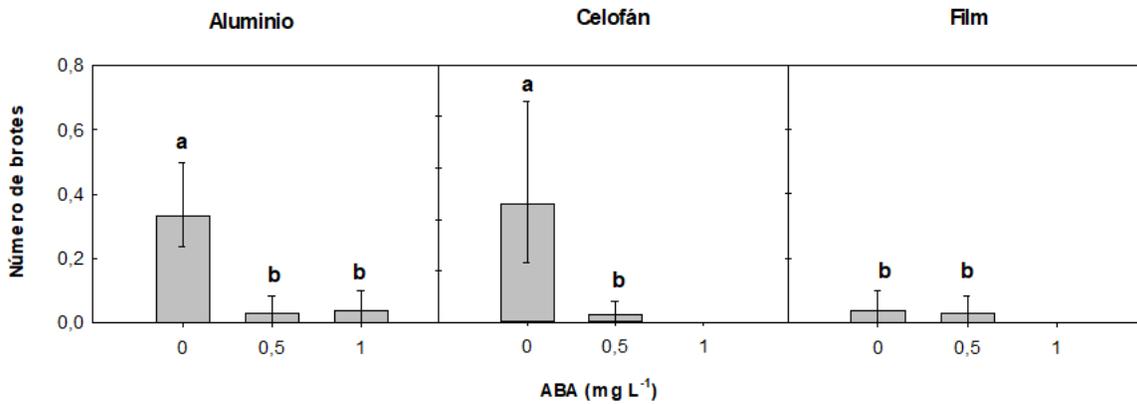


ANEXO 1. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mgL⁻¹) sobre el largo de raíz de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).



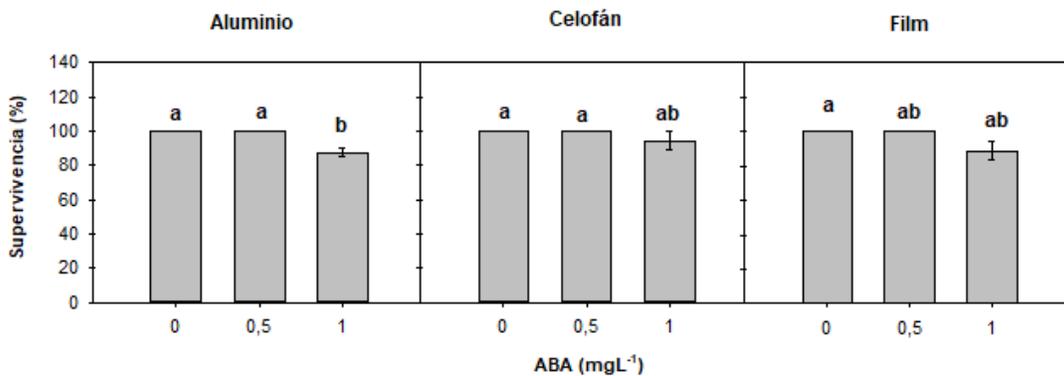
ANEXO 2. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mg L⁻¹) sobre el Contenido Relativo de Agua (CRA) de *Colobanthus quitensis* para la población Conguillio (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*.

Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).



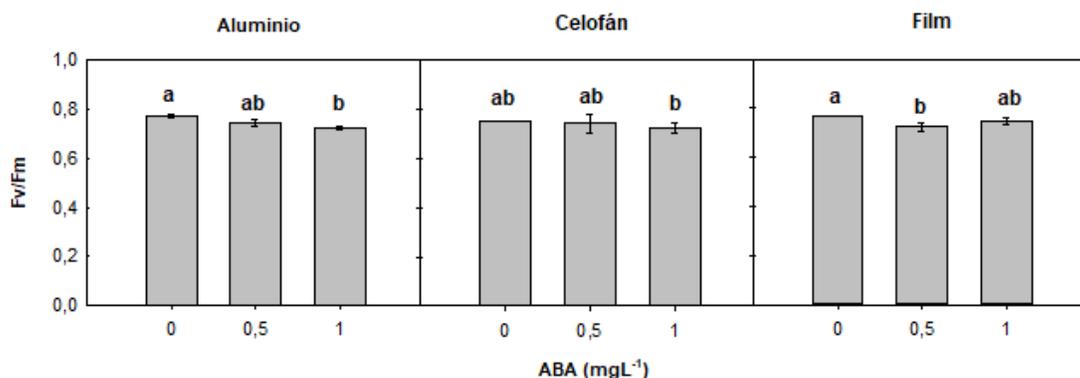
ANEXO 3. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mg L⁻¹) sobre el número de brotes de *Colobanthus quitensis* para la población Conguillio (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

Los anexos a continuación muestran los gráficos de las variables no significativas según ANOVA FACTORIAL (Ver tablas 2 de resultados).



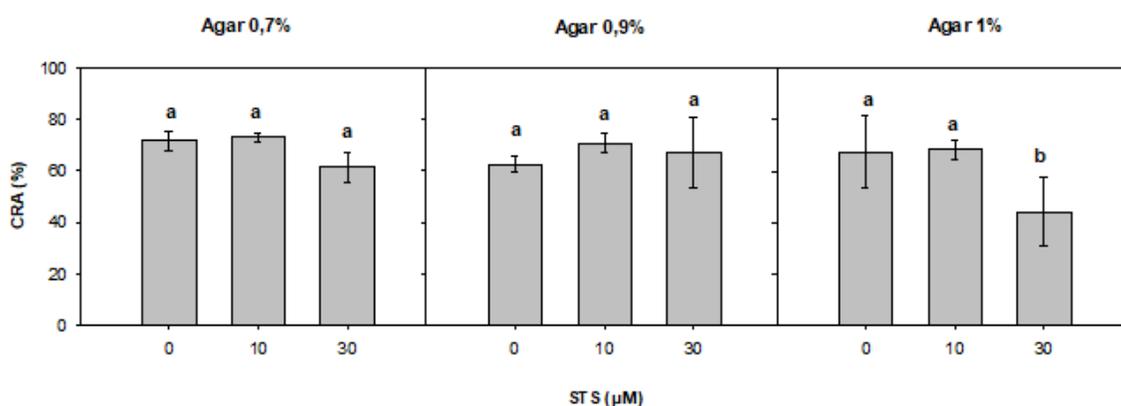
ANEXO 4. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico

(ABA) (0, 0,5 y 1 mg L⁻¹) sobre el porcentaje de supervivencia de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan (p≤0,05), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).



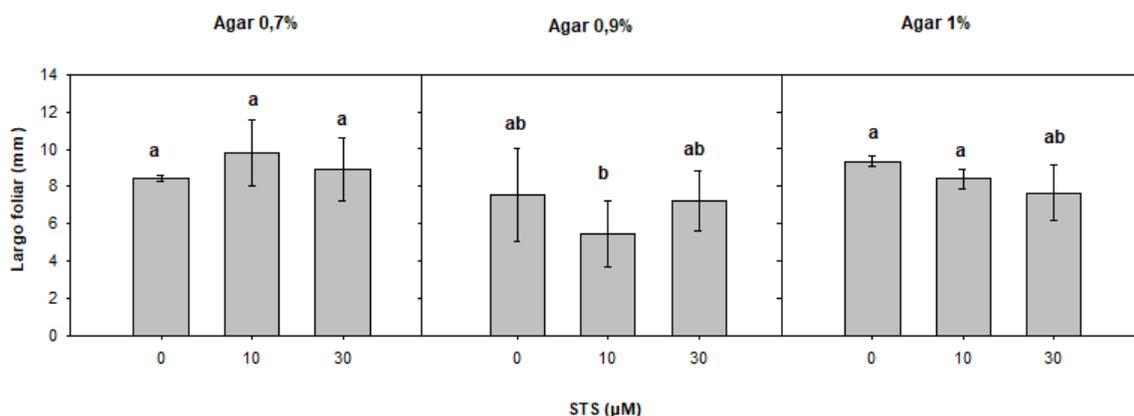
ANEXO 5. Efecto del uso de distintos tipos de sellado del medio de cultivo (aluminio, celofán y film) en combinación con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 0,5 y 1 mg L⁻¹) sobre el F_v/F_m de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan (p≤0,05), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

Los anexos a continuación muestran los gráficos de las variables no significativas según ANOVA FACTORIAL (Ver tablas 3 de resultados)

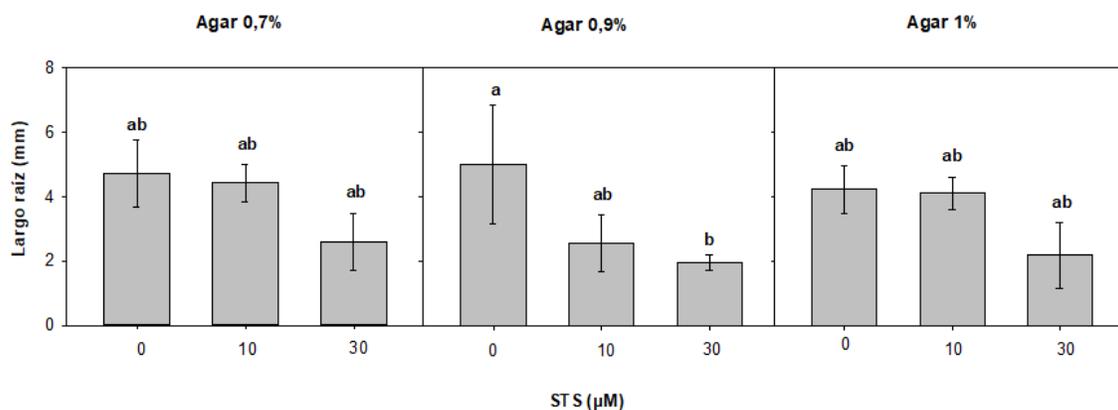


ANEXO 6. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 μM) inhibidor de etileno al medio de cultivo

y su efecto sobre el contenido relativo de agua de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

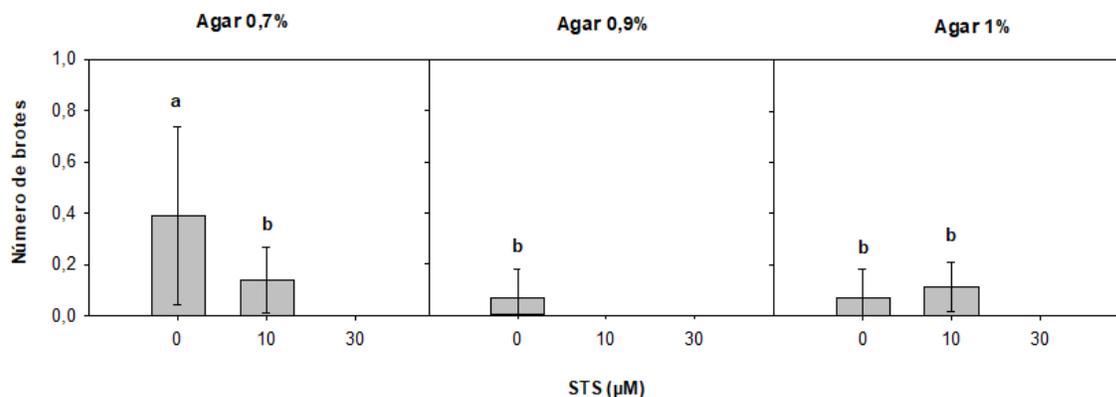


ANEXO 7. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 µM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el largo foliar de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).



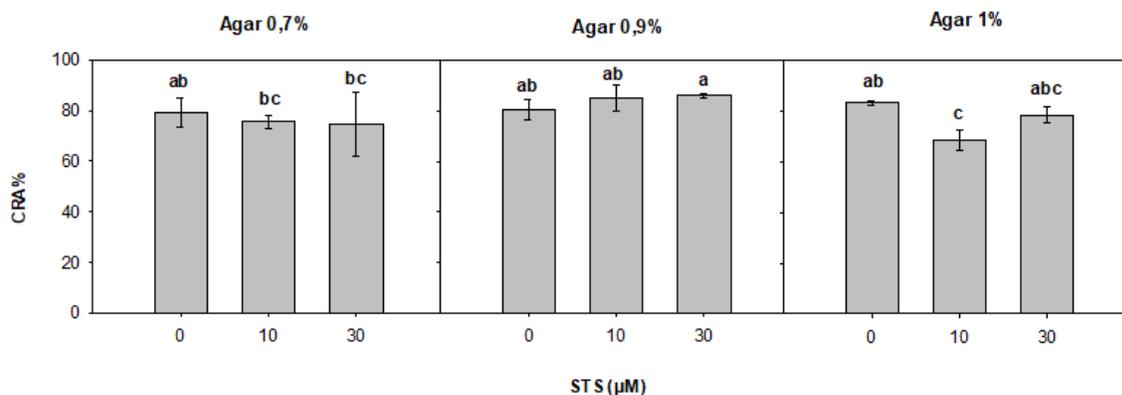
ANEXO 8. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar(0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 µM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el largo de raíz de *Colobanthus quitensis*

para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

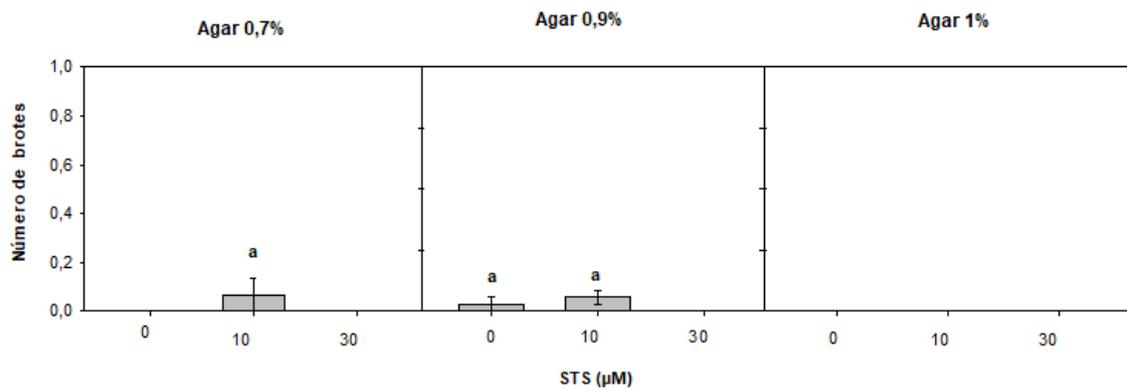


ANEXO 9. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar(0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 µM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el número de brotes de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pA) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

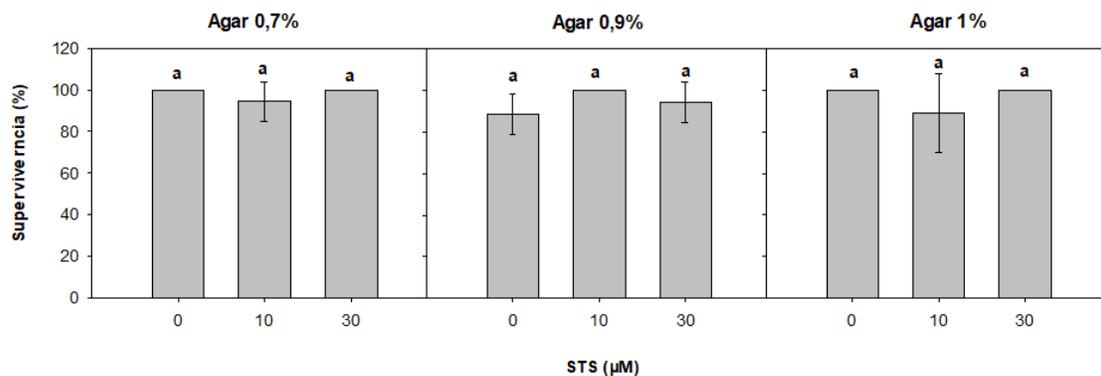
Los anexos a continuación muestran los gráficos de las variables no significativas según ANOVA FACTORIAL (Ver tablas 4 de resultados).



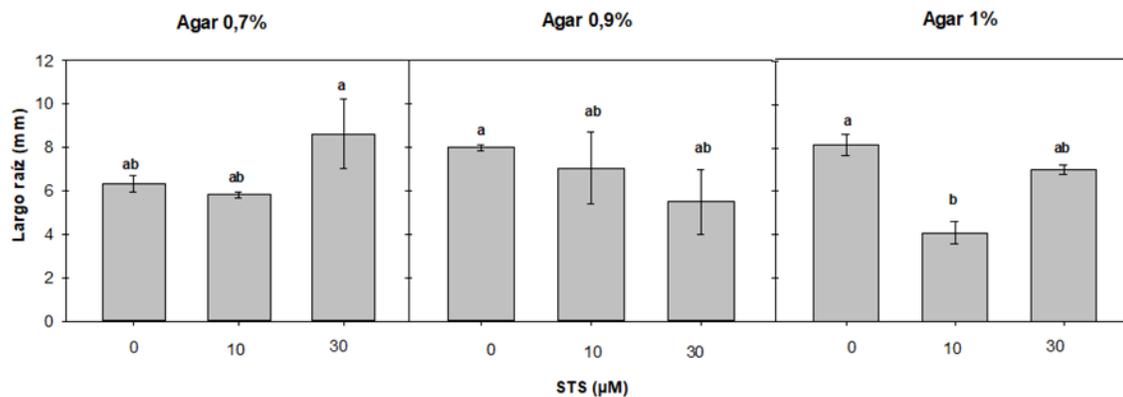
ANEXO 10. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 μ M) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el contenido relativo de agua de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).



ANEXO 11. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar(0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 μ M) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el número de brotes de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).



ANEXO 12. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el porcentaje de supervivencia de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).



Anexo 13. Efecto del uso de diferentes concentraciones de agente gelificante Agar (0,7, 0,9 y 1 %) en el medio de cultivo con la adición de diferentes concentraciones de Tiosulfato de plata (STS) (0 ,0,5 y 10 μM) como inhibidor de etileno al medio de cultivo y su efecto sobre el largo de raíz de *Colobanthus quitensis* para la población Arctowski (pC) después de 90 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA factorial, test Duncan ($p \leq 0,05$), columnas y barras representadas con la desviación estándar (σ).

Cuestionario de auto reporte sobre contribuciones primarias y secundarias a los Objetivos de Desarrollo Sostenible, organizados por categorías.

Bloques	Objetivos	1°	2°
Personas	1. Poner fin a la pobreza en todas sus formas y en el mundo.		
	2. Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible		
	3. Garantizar una vida sana y promover el bienestar de todos y todas las edades.		
	4. Garantizar una educación inclusiva y equitativa de calidad y promover oportunidades de aprendizaje permanente para todos.		
	5. Lograr la igualdad de género y empoderar a todas las mujeres y las niñas.		
Planeta	6. Garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y el saneamiento para todos.		
	12. Garantizar modalidades de consumo y producción sostenible.		
	13. Adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos.		X
	14. Conservar y utilizar sosteniblemente los océanos, los mares y los recursos marinos para el desarrollo sostenible.		
	15. Proteger, restablecer y promover el uso sostenible de los ecosistemas terrestres, gestionar sosteniblemente los bosques, luchar contra la desertificación, detener e invertir la degradación de las tierras y detener la pérdida de biodiversidad.	X	

Prosperidad	7. Garantizar el acceso a una energía asequible, fiable, sostenible y moderna para todos.		
	8. Promover el crecimiento económico sostenido, inclusivo y sostenible, el empleo pleno y productivo y el trabajo decente para todos.		
	9. Construir infraestructuras resilientes, promover la industrialización inclusiva y sostenible y fomentar la innovación.		
	10. Reducir la desigualdad en los países y entre ellos.		
	11. Lograr que las ciudades y los asentamientos humanos sean inclusivos, seguros, resilientes y sostenibles.		
Paz	16. Promover sociedades pacíficas e inclusivas para el desarrollo sostenible, facilitar el acceso a la justicia para todos y construir a todos los niveles institucionales eficaces e inclusivas que rindan cuentas.		
Asociaciones	17. Fortalecer los medios de implementación y revitalizar la Alianza Mundial para el Desarrollo Sostenible		