

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

CAMPUS LOS ÁNGELES

ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal



**RESPUESTAS DIFERENCIALES EN LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD
EN POBLACIONES DE *Colobanthus quitensis* Kunth (Bartl.).**

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

FRANCISCA BELÉN ARROYO MARÍN

LOS ÁNGELES – CHILE

2023

**RESPUESTAS DIFERENCIALES EN LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD EN
POBLACIONES DE *Colobanthus quitensis* Kunth (Bartl.).**

Alumna

**Francisca Belén Arroyo Marín
Ingeniero en Biotecnología Vegetal**

Profesora Guía

**Dra. Marely Cuba Díaz
Profesor Titular
Biólogo**

Profesor Co-guía

**Dr. Ariel Salvatierra Castro
Investigador Centro de Estudios Avanzados en
Fruticultura (CEAF)
Tecnólogo Médico
Doctor en Ciencias, M. Ingeniería Genética Vegetal**

Jefe de Carrera

**Ing. Pedro Lindor Quiroz Hernández
Profesor Instructor
Ingeniero en Ejecución forestal**

Directora de Departamento

**Dra. Marely Cuba Díaz
Profesor Titular
Biólogo**



AGRADECIMIENTOS

Al mirar hacia atrás y ver el largo camino recorrido en mi formación profesional, solo me queda agradecer a las personas que formaron parte de este largo proceso.

Primero agradecer a mis Padres, por su amor y apoyo incondicional, por los valores entregados, por cada palabra de aliento cuando veía todo cuesta arriba y por, sobre todo, enseñarme que perseverando se pueden cumplir los sueños.

Agradecer también a mi hermana y futura colega María José, mi compañera de vida, de alegrías, tristezas, locuras y aventuras, gracias por tu contención y apoyo incondicional en este proceso, por ser mi cable a tierra, por animarme y a veces retarme cuando quería tirar todo por la borda.

Agradecer a mi profesora guía Marely Cuba Díaz, quien, a pesar de ser una persona muy ocupada en su día a día, con toda la entrega y paciencia del mundo me ayudó, apoyó y aconsejó para poder llevar a cabo esta investigación.

También agradezco a todos los docentes que brindaron sus conocimientos, apoyo y sabiduría a lo largo de mis estudios universitarios.

Y como no agradecer también a mis amigos y compañeros de carrera Paula, Sergio, Christian y a todas las personitas que forman parte del Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales, por el tiempo compartido, la buena disposición, las risas, anécdotas y por sobre todo la buena onda.

Finalmente agradecer al proyecto VIRD N°220.418.012-INV el cual hizo posible esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	18
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Efecto del estrés salino en plantas.....	21
2.2	Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas	22
2.3	Equilibrio osmótico.....	24
2.4	Toxicidad iónica	24
2.5	Estrés oxidativo	24
2.6	<i>Colobanthus quitensis</i>	25
2.6.1	Distribución.....	25
2.6.2	Morfología de la especie	25
2.6.3	Variabilidad morfológica de <i>C. quitensis</i>	26
2.6.4	Antecedentes de estudios previos relacionados con salinidad.....	27
3	HIPÓTESIS	29
4	OBJETIVOS.....	29
5	MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1	Material vegetal	30
5.2	Evaluación morfo-fisiológica en plantas <i>in vitro</i> de <i>C. quitensis</i> (<i>Experimento 1</i>).....	31
5.2.1	Medios de cultivo para propagación de material vegetal <i>in vitro</i>	31
5.2.2	Ensayo de salinidad para plántulas <i>in vitro</i> de 5 poblaciones de <i>C. quitensis</i>	32
5.2.3	Evaluaciones morfo-fisiológicas en 5 poblaciones de <i>C. quitensis</i>	32
5.2.4	Cuantificación de iones Na ⁺ / K ⁺	33
5.3	Ensayo de tolerancia a concentraciones altas de NaCl (<i>Experimento 2</i>).....	34

5.3.1	Material vegetal y medios de cultivo.....	34
5.3.2	Ensayo de evaluación a la tolerancia de NaCl en poblaciones de <i>C. quitensis</i>	34
5.3.3	Evaluaciones morfo-fisiológicas en 3 poblaciones de <i>C. quitensis</i>	34
5.4	Evaluación de la tolerancia en plántulas recién germinadas (<i>Experimento 3</i>)..	35
5.4.1	Material vegetal.....	35
5.4.2	Desinfección de semillas	35
5.4.3	Medios de cultivo para germinación y tratamiento con NaCl.....	35
5.4.4	Ensayo de tolerancia a NaCl de semillas germinadas para 5 poblaciones de <i>C. quitensis</i>	36
5.5	Análisis estadísticos.....	37
6	RESULTADOS.....	38
6.1	Experimento 1: Evaluación morfo-fisiológica en plantas <i>in vitro</i> de <i>C. quitensis</i>	38
6.1.1	Aparición de botones florales.....	38
6.1.2	Mortalidad	38
6.1.3	Clorosis.....	39
6.1.4	Longitud foliar.....	42
6.1.5	Longitud radicular	43
6.1.6	Biomasa total	44
6.1.7	Contenido de iones presentes en las diferentes poblaciones de <i>C. quitensis</i>	44
6.2	Experimento 2: Ensayo de tolerancia a concentraciones altas de NaCl	47
6.2.1	Mortalidad	47
6.2.2	Clorosis	47

6.2.3	Longitud radicular	49
6.2.4	Biomasa Foliar	50
6.2.5	Biomasa radicular	51
6.2.6	Eficiencia fotosintética (Fv/Fm)	52
6.2.7	Índice de rendimiento fotosintético (PI)	52
6.3	Experimento 3: Evaluación de la tolerancia en plántulas recién germinadas.	53
6.3.1	Mortalidad	54
6.3.2	Clorosis	54
6.3.3	Longitud radicular	55
6.3.4	Biomasa total	56
7	DISCUSIÓN.....	58
7.1	Experimento1: Evaluación morfo-fisiológica en plantas <i>in vitro</i> de <i>C. quitensis</i>	58
7.2	Experimento 2: Ensayo de tolerancia a concentraciones altas de NaCl.	62
7.3	Experimento 3: Evaluación de la tolerancia en plántulas recién germinadas.	64
8	CONCLUSIONES	67
9	BIBLIOGRAFÍA.....	69
10	ANEXOS	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Sitios de recolección de las poblaciones de <i>Colobanthus quitensis</i>	30
Tabla 2: Escala de clorosis establecida para evaluación de plántulas de <i>Colobanthus quitensis</i>	33
Tabla 3: Mortalidad en las diferentes poblaciones de <i>Colobanthus quitensis</i> sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). Se evaluaron todos los tratamientos a los 40 días.	47
Tabla 4: Mortalidad en las diferentes poblaciones de <i>Colobanthus quitensis</i> recién germinadas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). Se evaluaron todos los tratamientos a los 15 días.	54



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de ubicación de los sitios de muestreo estudiados de *Colobanthus quitensis*: a) Ubicación geográfica de las poblaciones de América del Sur, b) mapa de contorno del pasaje de Drake y, c) el área de ampliación del archipiélago de las Shetland del Sur con la isla Rey Jorge y la isla Livingston. Población La Vega (pV); población Laredo (pL); población La Marisma (pPA); población Arctowski (pA); población Punta Hannah (pH). Modificado de Koc et al. (2018).....31

Figura 2: Número de botones florales en plantas de *Colobanthus quitensis* en las cinco poblaciones estudiadas, sometidas a diferentes concentraciones de NaCl a los 60 días. Valores expresados en números de botones florales. Población Arctowski (pA); población Punta Hannah (pH); población La Marisma (pPA); población Laredo (pL); población La Vega (pV).....39

Figura 3: Porcentaje de mortalidad acumulado para cada tratamiento salino en poblaciones de *Colobanthus quitensis*. Evaluación de mortalidad por población cada 15 días hasta el día 60. Población Arctowski (pA); población Punta Hannah (pH); población La Marisma (pPA); población Laredo (pL); población La Vega (pV).....40

Figura 4: Clorosis para cada tratamiento salino en poblaciones de *Colobanthus quitensis*. a) población Arctowski (pA); b) población Punta Hannah (pH); c) población La Marisma (pPA); d) población Laredo (pL); e) población La Vega (pV). El porcentaje de clorosis se relaciona con el promedio de plantas que presentan amarillamiento según Tabla 2. Se evaluaron todos los tratamientos a los 60 días del ensayo.....41

Figura 5: Longitud foliar de las diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM). a) población Arctowski (pA); b) población Punta Hannah (pH); c) población La Marisma (pPA); d) población Laredo (pL); e) población La Vega (pV). Se evaluaron todos los tratamientos a los 60 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p > 0,05$).....42

Figura 6: Longitud radicular de las diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM). a) población Arctowski (pA); b) población Punta Hannah (pH); c) población La Marisma

(pPA); d) población Laredo (pL); e) población La Vega (pV). Se evaluaron todos los tratamientos a los 60 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p>0,05$).43

Figura 7: Biomasa de las diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM). a) población Arctowski (pA); b) población Punta Hannah (pH); c) población La Marisma (pPA); d) población Laredo (pL); e) población La Vega(pV). Se evaluaron todos los tratamientos a los 60 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p>0,05$).44

Figura 8: Contenido de iones Na^+ y K^+ presentes en plantas de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM). **pA.** población Arctowski; **pH.** población Punta Hannah; **pPA.** población La Marisma; **pL.** población Laredo; **pV.** población La Vega.46

Figura 9: Clorosis en poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población Punta Hannah (pH); b) población La Marisma (pPA); c) población La Vega. El porcentaje de clorosis se relaciona con el total de las plantas que presentan amarillamiento. Se evaluaron todos los tratamientos a los 40 días del ensayo.48

Figura 10: Longitud radicular de las diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población Punta Hannah; b) población La Marisma; c) población La Vega. Se evaluaron todos los tratamientos a los 40 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p>0,05$).49

Figura 11: Biomasa foliar de diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población Punta Hannah; b) población La Marisma; c) población La Vega. Se evaluaron todos los tratamientos a los 40 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p>0,05$).50

Figura 12: Biomasa radicular de diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población Punta Hannah (pH); b) población La Marisma (pPA); c) población La Vega (pV).

Se evaluaron todos los tratamientos a los 40 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p>0,05$).51

Figura 13: Eficiencia fotosintética de tres poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población Punta Hannah (pH); b) población La Marisma (pPA); c) población La Vega (pV). Se evaluaron todos los tratamientos a los 40 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p>0,05$).52

Figura 14: Índice de rendimiento fotosintético (PI) de tres poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población Punta Hannah (pH); b) población La Marisma (pPA); c) población La Vega (pV). Se evaluaron todos los tratamientos a los 40 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p>0,05$).53

Figura 15: Clorosis en las diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* recién germinadas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población La Marisma (pPA); b) población Laredo (pL). El porcentaje de clorosis se relaciona con el total de las plantas que presentan amarillamiento. Se evaluaron todos los tratamientos a los 15 días del ensayo.....55

Figura 16: Longitud radicular en poblaciones de *Colobanthus quitensis* recién germinadas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población La Marisma (pPA); b) población Laredo (pL). Se evaluaron todos los tratamientos a los 15 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p>0,05$).56

Figura 17: Biomasa total en poblaciones de *Colobanthus quitensis* recién germinadas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población La Marisma (pPA); b) población Laredo (pL). Se evaluaron todos los tratamientos a los 15 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p>0,05$).57

Figura Anexo 1: Registro fotográfico población Arctowski (pA) para determinación de clorosis en evaluaciones morfo-fisiológicas de 5 poblaciones de <i>Colobanthus quitensis</i> sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM).	80
Figura Anexo 2: Registro fotográfico población Punta Hannah (pH) para determinación de clorosis en evaluaciones morfo-fisiológicas de 5 poblaciones de <i>Colobanthus quitensis</i> sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM).	81
Figura Anexo 3: Registro fotográfico población La Marisma (pPA) para determinación de clorosis en evaluaciones morfo-fisiológicas de 5 poblaciones de <i>Colobanthus quitensis</i> sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM).	82
Figura Anexo 4: Registro fotográfico población Laredo (pL) para determinación de clorosis en evaluaciones morfo-fisiológicas de 5 poblaciones de <i>Colobanthus quitensis</i> sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM).	83
Figura Anexo 5: Registro fotográfico población La Vega (pV) para determinación de clorosis en evaluaciones morfo-fisiológicas de 5 poblaciones de <i>Colobanthus quitensis</i> sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM).	84
Figura Anexo 6: Presencia de semillas viables germinando en botones florales de <i>Colobanthus quitensis</i> propagado in vitro.	85
Figura Anexo 7: Registro fotográfico de ensayo de tolerancia a NaCl con 3 poblaciones de <i>Colobanthus quitensis</i> in vitro. pH. Población Punta Hannah; pPA. Población La Marisma; pV. Población La Vega.	86
Figura Anexo 8: Registro fotográfico de ensayo de tolerancia a NaCl de plántulas recién germinadas de <i>Colobanthus quitensis</i> . pPA. Población La Marisma.	87
Figura Anexo 9: Registro fotográfico de ensayo de tolerancia a NaCl con plántulas recién germinadas de <i>Colobanthus quitensis</i> . pL. Población Laredo.	87

Figura Anexo 10: Porcentaje de germinación de 5 poblaciones estudiadas de *Colobanthus quitensis*. **pA.** población Arctowski; **pH.** población Punta Hannah; **pPA.** población La Marisma; **pL.** población Laredo; **pV.** población La Vega.88



LISTA DE ABREVIATURAS

- **AIA** Ácido Indol-3-acético
- **ANOVA** Análisis de varianza
- **APX** Ascorbato peroxidasa
- **BAP** 6-bencilaminopurina
- **CAT** Catalasa
- **Cl⁻** Ion cloruro
- **Fv/Fm** Eficiencia fotosintética
- **g/L** Gramo por litro
- **GPX** Glutación peroxidasa
- **GST** Glutation-s-transferasa
- **H₂O₂** Peróxido de hidrógeno
- **K⁺** Ion potasio
- **mg/L** Miligramo por litro
- **mM** Milimolar
- **msnm** Metro sobre el nivel del mar
- **M** Molar
- **MS** Medio de cultivo Murashige Skoog
- **Na⁺** Ion sodio
- **NaCl** Cloruro de sodio
- **O₂⁻** Ion superóxido
- **pA** Población Arctowski
- **pH** Población Punta Hannah
- **pL** Población Laredo
- **pPA** Población La Marisma
- **pV** Población La Vega
- **p** Valor p
- **PI** Rendimiento fotosintético
- **ROS** Especies reactivas de oxígeno



- **SOD** Superóxido dismutasa
- **STS** Tiosulfato de plata



RESUMEN

Las plantas, al ser organismos sésiles, están constantemente expuestas a diferentes agentes bióticos y abióticos que pueden causarle estrés, siendo la salinidad uno de los más perjudicial. Este tipo de estrés lo perciben las plantas por medio de la salinidad presente en los suelos, causándoles alteraciones fisiológicas y metabólicas que afectan negativamente su crecimiento y desarrollo, conduciendo a reducciones en la biomasa y el tamaño de las plantas, fases vegetativas prolongadas, y en muchos casos, reducción en el rendimiento y la muerte por estrés hídrico. Diferenciar mecanismos de respuestas entre variedades o poblaciones de especies que presentan diferentes rangos de tolerancia, es vital para comprender los mecanismos de respuestas a salinidad en plantas. Por lo que en esta investigación se utilizaron variables morfo-fisiológicas para establecer diferencias en la tolerancia, o sensibilidad, a la salinidad en poblaciones de la especie extremófila *Colobanthus quitensis* a partir de un estudio en condiciones controladas (*in vitro*).

Las poblaciones de *C. quitensis* se distribuyen en zonas costeras (latitudes mayores) y de mayor altitud (latitudes menores). Las costeras son expuestas a salinidad por medio de inundación o spray marino, por lo que se hipotetiza que éstas tendrían mayor tolerancia a la salinidad que las que crecen lejanas a la costa o mayor altitud. Se realizaron tres experimentos en condiciones controladas en presencia de salinidad, para 5 poblaciones de *C. quitensis* (tres de zonas magallánicas, dos de costa y una de pradera; y otras dos de costa de zonas antárticas) con el fin de identificar y categorizar las distintas poblaciones en tolerantes o sensibles según su respuesta morfo-fisiológica. Se evaluaron concentraciones medias-bajas de NaCl (0mM, 50mM 100mM, 150mM y 200mM), concentraciones altas de NaCl (300mM y 400mM) en plántulas *in vitro* y recién germinadas. Estas últimas solo en tratamientos salinos de alta concentración. Las poblaciones magallánicas presentaron una mejor tolerancia al incremento de las concentraciones de NaCl, mientras que las poblaciones antárticas presentaron reducción en la biomasa y el crecimiento radicular, proponiéndose que estas pudiesen ser menos tolerantes a la salinidad. Por otro lado, las poblaciones pV, pL y pPA, mostraron contenidos estables de iones K⁺ con el incremento de los iones Na⁺, lo que también podría indicar una mayor tolerancia en estas poblaciones. Las

poblaciones pH, pPA y pV mostraron sobrevida y poca variación morfo-fisiológica hasta los 400mM de NaCl mostrando tolerancia de la especie hasta esa concentración salina.



ABSTRACT

Plants, being sessile organisms, are constantly exposed to different biotic and abiotic agents that can cause stress, salinity being one of the most detrimental. This type of stress is perceived by plants through the salinity present in soils, causing physiological and metabolic alterations that negatively affect their growth and development, leading to reductions in biomass and plant size, prolonged vegetative phases, and in many cases, reduction in yield and death due to water stress. Differentiating response mechanisms among varieties or populations of species with different tolerance ranges is vital to understand the mechanisms of salinity responses in plants. Therefore, in this research, morpho-physiological variables were used to establish differences in tolerance, or sensitivity, to salinity in populations of the extremophilic species *Colobanthus quitensis* from a study under controlled conditions (in vitro).

The populations of *C. quitensis* are distributed in coastal areas (higher latitudes) and higher altitudes (lower latitudes). Coastal populations are exposed to salinity through flooding or sea spray, so it is hypothesized that these would have greater tolerance to salinity than those growing far from the coast or at higher altitudes. Three experiments were carried out under controlled conditions in the presence of salinity, for 5 populations of *C. quitensis* (three from Magellanic areas, two from the coast and one from the prairie; and another two from the coast of Antarctic areas) in order to identify and categorize the different populations as tolerant or sensitive according to their morpho-physiological response. Low-medium NaCl concentrations (0mM, 50mM, 100mM, 150mM and 200mM), high NaCl concentrations (300mM and 400mM) were evaluated in in vitro and newly germinated seedlings. The latter only in high concentration saline treatments. Magellanic populations showed better tolerance to increased NaCl concentrations, while Antarctic populations showed reduced biomass and root growth, suggesting that they may be less tolerant to salinity. On the other hand, the pV, pL and pPA populations showed stable K⁺ ion contents with increasing Na⁺ ions, which could also indicate a greater tolerance in these populations. The pH, pPA and pV populations showed survival and little morpho-physiological variation up to 400 mM NaCl, showing tolerance of the species up to this salinity concentration.

1 INTRODUCCIÓN

Las plantas, al ser organismos sésiles, están constantemente expuestas a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico. Uno de los más importantes es el estrés salino, el cual produce alteraciones fisiológicas y metabólicas, afectando negativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas (Aguero, 2018), ocasionando la pérdida de turgencia en las hojas, marchitez, clorosis (Kotagiri y Kolluru, 2017), deficiencias nutricionales y toxicidad por iones Na^+ y Cl^- (Sharif et al., 2019). Además, el estrés salino, viene acompañado por el estrés oxidativo debido a la alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales interfieren en el metabolismo normal de las células y causan daño oxidando en proteínas, ADN, lípidos y otras macromoléculas (Sarker et al., 2018).

La intensificación en la investigación básica y la comprensión a fondo de cómo se producen las respuestas al estrés salino y los mecanismos de tolerancia a esta condición abiótica en plantas, permitirá proponer medidas para evitar el daño de manera efectiva y mejorar la tolerancia a la salinidad en cultivos de interés económico (Khan et al., 2016). Las variables e indicadores asociados con la germinación, crecimiento de plántulas, desarrollo y estructura radicular, son criterios ampliamente usados para la selección de especies, genotipos, variedades o cultivares tolerantes a la salinidad (Munns & Tester, 2008). El estrés salino regula en gran medida la formación y el desarrollo de los pelos radiculares lo que podría indicar una función en la detección de señales ambientales sobre las cuales las plantas se adaptan en condiciones de estrés (Robin et al., 2016). Las plantas para superar estas condiciones salinas modifican la arquitectura de su raíz para reducir las áreas expuestas al estrés por sal (Gallace, 2020).

En la actualidad, existen numerosas publicaciones sobre la superficie de suelo afectada por la salinidad, estimándose en unos 1000 millones de hectáreas (Ivushkin et al., 2019). Se ha evidenciado que en especies que habitan en marismas, dunas y manglares la capacidad para tolerar la salinidad depende en gran medida de la zona en donde crecen las plántulas y de las formas de contacto de estas especies con la salinidad. *Colobanthus quitensis* Kunth. (Bartl) (Caryophyllaceae), es la única planta dicotiledónea que vive de forma natural en la Antártica y, además, se distribuye por la cordillera de Los Andes hasta el sur de México

(Cuba-Díaz et al., 2019). En esta especie, se ha descrito una tolerancia moderada a la salinidad (Cuba-Díaz, et al., 2017), además de mecanismos de tolerancia relacionados con temperaturas congelantes, altas intensidades lumínicas, fuertes vientos y adaptación al cambio climático, considerándose en algunos casos el desarrollo de ecotipos (Gianoli et al., 2004; Torres-Díaz et al., 2016). Además, esta especie muestra una considerable variabilidad genética y fenotípica entre y dentro de sus poblaciones (Cuba-Díaz, et al., 2017) por lo que sería interesante estudiar las diferentes formas en la que estas poblaciones se encuentran expuestas a la salinidad. Todo lo anteriormente mencionado, ha llevado a considerar la especie como un excelente candidato en estudios de mecanismos de tolerancia a condiciones abióticas extremas. En varios de sus hábitats, *C. quitensis* está expuesta a condiciones de salinidad, ya sea por embate directo de las olas, espray marino o mareas altas (Rajaniemi y Barrett, 2018). Junto con los mecanismos de resistencia a la congelación, se han producido otras adaptaciones bioquímicas y morfo-fisiológicas durante la evolución, lo que permitió la supervivencia y propagación en el duro entorno antártico (Bertini et al., 2022). En condiciones controladas, individuos de varias poblaciones han revelado respuestas morfo-fisiológicas y bioquímicas diferenciadas, mientras algunos regulan su crecimiento sin efectos negativos otros 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).

Como ya se ha descrito el desarrollo de ecotipos para ciertos factores ambientales y la respuesta a la salinidad en esta especie (Castel, 2015; Klagges, 2015), se puede suponer que la respuesta poblacional diferenciada a la salinidad podría estar más asociada con adaptaciones a los sitios de procedencia que a la tolerancia intrínseca de la especie, encontrando poblaciones sensibles y tolerantes a lo largo de su distribución. Por otro lado, la respuesta en poblaciones tolerantes también podría asociarse con el tipo de mecanismo de respuesta que estas poseen, las cuales varían según la incidencia de salinidad en su hábitat, dependiendo de la forma en la que reciben la influencia marina. En este estudio desarrollado a partir del proyecto VIRD N° 220.418.012-INV titulado “Estudio de los

mecanismos diferenciales de tolerancia a salinidad en poblaciones de *Colobanthus quitensis*”, se estudiarán cinco poblaciones de *C. quitensis* para diferenciar si son sensibles o tolerantes a la salinidad en base a las respuestas morfo-fisiológicas frente a diferentes concentraciones de NaCl en condiciones controladas.



2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Efecto del estrés salino en plantas

La salinidad es la medida de la cantidad de sal presente en el suelo y el agua. Afecta alrededor del 20% de la tierra en todo el mundo, siendo la mayoría áreas cultivables en donde las condiciones salinas se pueden atribuir a los efectos del agua de mar o al riego con agua que tiene cantidades excesivas de cloruro de sodio (NaCl) (Liu et al., 2020).

Esta problemática ha causado un impacto negativo en las funciones morfológicas y bioquímicas de las plantas, perjudicando su crecimiento y desarrollo a través del estrés hídrico, la citotoxicidad debido a la absorción excesiva de iones como el sodio (Na^+) y el cloruro (Cl^-) y el desequilibrio nutricional (Isayenkov y Maathuis, 2019), dando como resultado plantas de menor tamaño, fases vegetativas prolongadas y en muchos casos la muerte por estrés hídrico (García et al., 2018), lo cual limita su producción de biomasa y distribución espacial (Sánchez-Bernal et al., 2020). Además, se genera una reducción en el rendimiento, comprometiendo la calidad y cantidad de los productos vegetales (Zörb et al., 2019).

La salinidad del suelo, además de influir negativamente en las plantas, también influye en la productividad agrícola y la calidad del suelo y del agua, particularmente en las regiones áridas y semiáridas, lo que provoca la pérdida de áreas cultivables y la degradación de la tierra (Balkanlou et al., 2020). En estas áreas, las sales tienden a acumularse en el suelo debido a las elevadas condiciones de evaporación que elevan el estrés osmótico e influyen negativamente en la disponibilidad de agua del suelo para las plantas (Talat, 2020). Las condiciones climáticas cambiantes determinadas por el calentamiento global y el aumento de la aridez contribuirán a la salinización de los suelos hidromórficos (Okur y Örgen, 2020) y empeorarán en muchas regiones debido al cambio climático (Zörb et al., 2019). El aumento de la temperatura provoca una expansión de la evapotranspiración, y la disminución de la precipitación provoca una reducción en la capacidad de lixiviación de sal de la precipitación (Minhas et al., 2020).

Tanto la tolerancia como la sensibilidad a la sal de un cultivo específico dependen de su capacidad para extraer agua y nutrientes de los suelos salinos y para evitar la acumulación excesiva de iones de sal en los tejidos (Kaleem et al., 2018). La acumulación de iones puede

causar una reducción en las concentraciones citoplasmáticas de K^+ y deficiencias en las concentraciones de Ca^{2+} , Mg^{2+} , y NO_3^- , o las de otros minerales, en tejidos vegetales (Liu et al., 2020) dando como resultado un desequilibrio iónico (Isayenkov y Maathuis 2019). Esta reducción puede deberse principalmente a que los sitios de absorción de K^+ en la raíz también absorben Na^+ del suelo, originando así, un antagonismo (Saldaña et al., 2017).

Las plantas evalúan las condiciones de estrés, transmiten las señales de estrés específicas y luego inician la respuesta contra ese estrés (Kaleem et al., 2018). Es por esto por lo que han desarrollado una serie de adaptaciones para tolerar la salinidad, incluyendo cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Rahneshan et al., 2018), que regulan la adaptación y tolerancia de las plantas al estrés por salinidad. Estos cambios afectan el crecimiento y desarrollo de la planta en diferentes niveles de organización, por ejemplo, pueden reducir la ganancia de carbono fotosintético y la tasa de crecimiento de la hoja, aumentando la relación raíz/parte aérea y el contenido de clorofila, además de cambios en la anatomía de la hoja que finalmente conducen a la prevención de la toxicidad de los iones, manteniendo y limitando la pérdida de agua para proteger el proceso de fotosíntesis (Kumar et al., 2018).

2.2 Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas

La tolerancia a la salinidad varía de unas plantas a otras (Zörb et al., 2019), por lo que se pueden diferenciar dos tipos de plantas en función a la tolerancia a la sal: halófitas y glicófitas. Las halófitas son aquellas plantas resistentes o tolerantes a la sal y pueden completar su ciclo de vida en suelos que contengan más de 200 mM de NaCl (Meng et al., 2018). Durante la evolución, han desarrollado diferentes estrategias morfológicas, anatómicas y fisiológicas para poder proliferar en ambientes con alto contenido de sal (Grigore et al., 2014), generando mecanismos fisiológicos y moleculares que incluyen la acumulación de solutos compatibles, la regulación de la absorción de iones y la síntesis de enzimas antioxidantes (Zhang y Shi, 2013; Gupta y Huang, 2014; Rahman et al., 2021). Por otra parte, están las glicófitas, y son aquellas plantas afectadas por la salinidad e incapaces de soportar altas concentraciones salinas como lo hacen las halófitas (Ismail y Horie, 2017).

Según Santos et al., (2016). La tolerancia a la sal entre las plantas es una variable continua, con especies que difieren entre las que mueren con solo 25 mM de NaCl (p. ej., garbanzos,

Flowers et al., 2010) y las que sobreviven a concentraciones de NaCl cercanas a 1M (p. ej., *Tecticornia* spp: English & Colmer, 2013). El parámetro más importante para separar una halófita de especies más sensibles ha sido la concentración de sal (NaCl). Chapman (1942) estableció una línea divisoria en NaCl al 0,5% (alrededor de 86 mM), es decir, alrededor de una sexta parte de la salinidad del agua del océano (aproximadamente 480 mM Na⁺ y 560 mM Cl⁻) y más recientemente, Flowers y Timothy (2008) sugirieron un límite de NaCl 200 mM para separar lo que podría llamarse halófitas verdaderas (euhalófitas) de plantas de cultivo relativamente tolerantes como la cebada.

Las plantas, en general, han desarrollado adaptaciones anatómicas y fisiológicas que les permiten sobrevivir y, en el caso de las halófitas, promover un mejor crecimiento bajo condiciones salinas (Acosta-Motos et al., 2017). Los mecanismos por los cuales las plantas toleran la salinidad son complejos tanto desde el punto de vista genético como fisiológico (Ismail y Horie, 2017). Las respuestas fisiológicas que se ocasionan bajo estrés por salinidad incluyen un potencial hídrico reducido, disminución en la transpiración y una mayor eficiencia en el uso del agua, el índice de área foliar y la tasa de germinación (H. Zhang et al., 2017). Los cambios bioquímicos incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la translocación desproporcionada de nutrientes, el daño del sistema de membranas y el deterioro de la maquinaria fotosintética (Chourasia et al., 2021). Los componentes de defensa antioxidantes participan en la desintoxicación de ROS, donde la acción concertada de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos ayudan a eliminar las moléculas de ROS (Tiwari et al. 2021a; 2021b). Una alta concentración de NaCl genera una reducción en la tasa fotosintética y una producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrogeno (H₂O₂), los radicales hidroxilos (OH[·]), los superóxidos (O₂⁻) (Castillejo, 2020), además de la sobreexpresión de genes, que conducen a una mayor cantidad y actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST)/glutatión peroxidasa (GPX) (Kumar et al., 2018).

A partir de ello, los mecanismos de tolerancia a la sal implican una interacción compleja de varios genes, factores de transcripción, y proteínas que intervienen en el mecanismo de tolerancia a la salinidad en los tejidos subterráneos de los cultivos. Existen diversas

estrategias tendientes a restaurar y mantener el equilibrio osmótico, evitar la toxicidad iónica y hacer frente al estrés oxidativo (Shabala y Munns, 2017).

2.3 Equilibrio osmótico

Frente al efecto osmótico producido por el exceso de sales en la solución del suelo, la estrategia para tolerar el estrés es el ajuste osmótico. Este implica la acumulación de moléculas en el citoplasma, con el objetivo de contrarrestar la presión osmótica externa (Shabala y Munns, 2017). La mejor forma de acumular estas moléculas es por medio de la absorción de solutos orgánicos, pero estos no se encuentran en altas concentraciones en la solución del suelo. Es por esto por lo que las plantas sintetizan prolina, azúcares solubles, glicina, betaína, los que además de equilibrar los potenciales osmóticos, tienen función antioxidante y protectora (Tang et al., 2015).

2.4 Toxicidad iónica

El estrés salino provoca toxicidad iónica en las células vegetales debido a que se junta una gran cantidad de iones Na^+ . El Na^+ en suelos salinos es tóxico para las plantas debido a que posee efectos adversos sobre la nutrición, las actividades enzimáticas citosólicas, la fotosíntesis y el metabolismo (Flowers, 2004). La tolerancia a la salinidad en las plantas no es solo tolerancia contra la toxicidad del Na^+ , sino también una adaptación a sus efectos secundarios, como la deficiencia/agotamiento del agua (Liang et al., 2018). Las plantas bajo la toxicidad por Na^+ reducen el K^+ . En las células vegetales que toleran la salinidad, se mantiene el K^+ citosólico en un ambiente con una alta concentración de Na^+ , siendo un factor clave para determinar la capacidad de tolerar la salinidad. La capacidad de las plantas para mantener una proporción alta de K^+/Na^+ citosólico es probablemente uno de los determinantes clave de la tolerancia a la salinidad en plantas (Maathius, 1999).

2.5 Estrés oxidativo

El oxígeno es indispensable en las plantas, se encuentra involucrado en la respiración mitocondrial y en la fosforilación oxidativa generando energía. Durante el metabolismo, las especies reactivas de oxígeno (ROS) activan el oxígeno. Estas ROS poseen una fuerte capacidad oxidativa y causan daño a la membrana citoplasmática, disfunción metabólica irreversible y muerte celular (Dhindsa et al., 1982). La eliminación del exceso de ROS en condiciones de alta salinidad puede atribuirse a metabolitos antioxidantes no enzimáticos

de bajo peso molecular y a agentes enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) (Zhao et al., 2020; Wang et al., 2016).

2.6 *Colobanthus quitensis*

2.6.1 Distribución

La Antártica es conocido por ser uno de los ecosistemas más antiguos del mundo y por poseer uno de los ambientes más severos de la tierra, caracterizado principalmente por baja disponibilidad de nutrientes, alta radiación UV, temperaturas muy bajas, fuertes vientos, aerosoles marinos y extrema aridez, ya que recibe escasas precipitaciones líquidas y el agua se encuentra principalmente en forma de hielo, lo cual es un obstáculo para cualquier especie vegetal que se desarrolle en la zona (Cuba-Díaz et al., 2017; Hereme et al., 2020).

Solo dos especies de plantas vasculares han podido colonizar de manera natural los ecosistemas antárticos marítimos, siendo una de ellas *Colobanthus quitensis* (Saéz et al., 2019). *C. quitensis* (Kunth) Bartl. perteneciente a la familia Caryophyllaceae, comúnmente conocida como perla antártica o clavelito antártico. Tiene una distribución amplia que va desde los 17°N (México) hasta los 68°S (Península Antártica) y rangos altitudinales que van desde los 0 a los 4200 m s.n.m. (Smith et al., 2003; Convey 2012; Cuba-Díaz et al., 2019). Además, se extiende en las islas Malvinas, las islas Subantárticas de Georgia del sur, Orcadas del sur, Shetland del sur y por la costa oeste de la Península Antártica (Pisano, 1972).

2.6.2 Morfología de la especie

Colobanthus quitensis es una hierba perenne, y es la única planta dicotiledónea descrita en el ecosistema antártico. Su morfología y anatomía consta de hojas largas, inclusive más largas que las ramillas, las que son extendidas y herbáceas (Pisano, 1976). Es de tamaño pequeño, alcanzando una altura mínima de 1,5 cm hasta una altura máxima de 8 cm aproximadamente (Smith et al., 2003), sus hojas varían en forma y poseen un ápice un tanto mucronado o en algunos casos entero, con un margen membranoso. Presenta tallos simples o ramificados, y cada rama puede alcanzar a medir entre 0,5 a 2 cm, a las que les crecen brotes distales, siendo esta característica la que le permite constituir cojines compactos que alcanzan a medir varios cm de diámetro (Smith et al., 2003).

Para adaptarse completamente a las condiciones antárticas, esta especie tuvo que desarrollar una estrategia de reproducción generativa, que sería eficiente en condiciones climáticas extremas (Gielwanowska et al., 2011). *C. quitensis* produce abundantes flores casi todos los años, pero los veranos cortos y frescos a menudo hacen que las semillas pierdan viabilidad (Convey, 1996).

Los patrones de crecimiento de las plantas antárticas con condiciones ambientales en constante cambio son muy desafiantes y plantean dificultades en la adaptación y supervivencia de la flora antártica (Singh et al., 2018). El estudio de los aspectos fisiológicos, ecológicos y bioquímicos de estas plantas son una herramienta valiosa para comprender la distribución de la biodiversidad de la especie bajo la influencia de las condiciones climáticas en las que se encuentra y así, poder proporcionar una base de referencia útil para evaluar los posibles cambios futuros en la biodiversidad de la Antártida (Singh et al., 2018).

2.6.3 Variabilidad morfológica de *C. quitensis*

La variabilidad morfológica puede verse influenciada por varios factores ambientales, como el grado de exposición, la disponibilidad de agua u otras condiciones abióticas estresantes (Gianoli et al., 2004), como también por su distribución latitudinal y altitudinal, ya que es común encontrar diferentes fenotipos en poblaciones a diferentes altitudes y latitudes (Haider et al., 2011). Las condiciones ambientales predominantes en la Antártica son fuertes vientos, temperaturas muy bajas, baja disponibilidad de nutrientes, alta radiación UV y aerosoles marinos, los cuales son obstáculos para cualquier especie vegetal (Convey et al., 2014). Estos factores han ocasionado una baja diversidad y simplicidad de este ecosistema extremo.

A *C. quitensis* se le ha atribuido alta plasticidad fenotípica y diferenciación tanto en atributos morfológicos como fisiológicos (Sierra-Almeida et al., 2007; Molina-Montenegro et al., 2012; Torres-Díaz et al., 2016). En Chile, *C. quitensis* se puede encontrar a lo largo de los Andes, generalmente en vegas a gran altura en el norte, pero cerca del nivel del mar en el sur (Hoffmann et al., 1998).

Se ha establecido la clasificación de dos ecotipos para *C. quitensis* entre las poblaciones antárticas (Base Arctowski, Bahía Almirantazgo, Isla Rey Jorge/Shetland del Sur) y

poblaciones andinas (Cerro la Parva/Región Metropolitana, Chile) a través de estudios de adaptación al frío, características morfológicas y secuencias espaciadoras transcritas internas (ITS) (Gianoli et al., 2004). Según Gianoli et al. (2004), esta diferenciación ecotípica, explicada como una respuesta influenciada por el ambiente extremo, es principalmente causada por el estrés por heladas, el cual es un factor selectivo que actúa sobre una línea de tiempo.

En un análisis de la diversidad genética de esta especie realizado por Koc et al., (2018), se demostró que, a pesar del bajo nivel de polimorfismo detectado por el método de genotipificación utilizado (9,57%), se encontró una alta diferenciación poblacional ($F_{ST} = 0,6241$), revelando tres agrupamientos de poblaciones denominados como Grupo Norte y Grupo Sur, y un tercer grupo conformado solo por la población del Parque Nacional Conguillío, Chile. En esta especie existe una clara diferenciación entre poblaciones continentales e insulares al evaluar parámetros como longitud y ancho de hoja, longitud de la raíz principal y diámetro de la corona (Cuba-Díaz et al., 2017).

2.6.4 Antecedentes de estudios previos relacionados con salinidad

C. quitensis al ser una especie que se encuentra en diferentes hábitats, constantemente está expuesta a diferentes condiciones desfavorables. En el territorio antártico, se encuentra expuesta a temperaturas bajas todo el año, vientos fuertes, radiación UV elevada, déficit hídrico, baja disponibilidad de nutrientes, aerosoles de agua salada y cobertura de nieve todo el año (Cuba, 2011). Por otro lado, las poblaciones que habitan en las diferentes áreas de la Patagonia, se ha registrado que existe una permanente exposición de alguna de ellas a la salinidad, como son aquellas existentes en las cercanías de la Laguna San Rafael, la cual durante ciertos periodos sufre anegamiento por agua salada (Pisano, 1988).

En los estudios que han reportado la evidencia de tolerancia a la salinidad en poblaciones de *C. quitensis*, se han incluido los trabajos realizados por Castel (2015); Klagges (2015) y Arriagada (2016), en donde los autores, en condiciones *in vitro* y de jardín común, sometieron plántulas de diferentes poblaciones (costeras y no costeras; antárticas y de Patagonia) a diferentes concentraciones salinas (0mM a 150mM de NaCl). Algunos de estos resultados arrojaron que en algunas poblaciones hubo presencia de desarrollo radicular,

aumento en la clorosis debido al aumento de sal y no se observaron diferencias significativas en cuanto a longitud radicular, foliar, ni eficiencia fotosintética.

Considerando todos los antecedentes recopilados de la especie frente a la salinidad es que se genera un interés por estudiar el comportamiento de algunas poblaciones frente a una exposición mayor de salinidad, para así dilucidar los distintos mecanismos de tolerancia o respuestas morfofisiológicas que cada una de ellas genere frente a este tipo de estrés.



3 HIPÓTESIS

El despliegue diferencial de respuestas morfo-fisiológicas en poblaciones de *Colobanthus quitensis* a la salinidad permite categorizarlas en tolerantes y sensibles, siendo las poblaciones costeras las más tolerantes.

4 OBJETIVOS

Objetivo General

Diferenciar poblaciones de *C. quitensis* sensibles y tolerantes a salinidad en base a las respuestas morfo-fisiológicas frente a diferentes concentraciones de NaCl en condiciones controladas.

Objetivos Específicos

- Establecer las respuestas morfológicas y fisiológicas de cinco poblaciones de *C. quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de salinidad (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM) en condiciones *in vitro*.
- Determinar la tolerancia de tres poblaciones de *C. quitensis* en condiciones *in vitro* sometidas a concentraciones más altas de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM).
- Evaluar la tolerancia a la salinidad (0mM, 200mM, 300mM y 400mM) en plántulas recién germinadas de *C. quitensis*.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

Se utilizaron plantas de *C. quitensis* previamente establecidas *in vitro* en la colección de plantas vasculares antárticas del Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales de la Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles. Para el estudio comparativo entre poblaciones se estudiaron plántulas provenientes de cinco poblaciones: Arctowski (62°09'S; 58°28'W) recolectada en las cercanías de la Base Polaca Arctowski, Isla Rey Jorge entre los 3-23 m s.n.m.; Punta Hannah (62°39'S; 60°37'W) recolectada en la Isla Livingstone a 10 m s.n.m.; Laredo (52°58'S; 70°49'W) recolectada en el sector de bahía Laredo al norte de Punta Arenas a 158 m s.n.m.; La Marisma (53°22'S; 70°58'W) recolectada en Punta Santa María, al sur de Punta Arenas a 1 m s.n.m.; y La Vega (52°41'S; 70°56'O) recolectada en la finca INIA Kampanaike al norte de Punta Arenas a 16 m s.n.m. (Tabla 1, Fig. 1), las cuales representan ecosistemas con presencia de condiciones salinas diferentes; aerosoles marinos en Antártica (pA y pH), inundaciones costeras en Punta Arenas (pL y pPA) y pradera sometida a deshidratación por pastoreo intensivo (pV). El criterio de selección de las plantas (provenientes del cultivo *in vitro*) fue la longitud total de cada una de ellas. Se tomaron 80 plantas por población con diferentes fechas de propagación y al azar se homogenizó el material vegetal seleccionando cada una de las plantas hasta un tamaño de 1,5 cm, debido a que existían diferencias morfológicas entre las poblaciones en estudio (Cuba-Díaz et al., 2017).

Tabla 1: Sitios de recolección de las poblaciones de *Colobanthus quitensis*.

POBLACIÓN	ABREVIATURA	SITIO DE RECOLECCIÓN	COORDENADAS	ALTITUD
Arctowski	pA	Arctowski, Isla Rey Jorge	62°09'S; 58°28'W	3-23m snm
Punta Hannah	pH	Isla Livingstone	62°39'S; 60°37'W	10m snm
Laredo	pL	Sector Laredo, Norte de Punta Arenas	52°58'S; 70°49'W	158m snm
La Marisma	pPA	Zona Marisma, Punta Arenas	53°22'S; 70°58'W	1m snm
La Vega	pV	Finca INIA Kampanaike, Norte de Punta Arenas	52°41'S; 70°56'O	16m snm

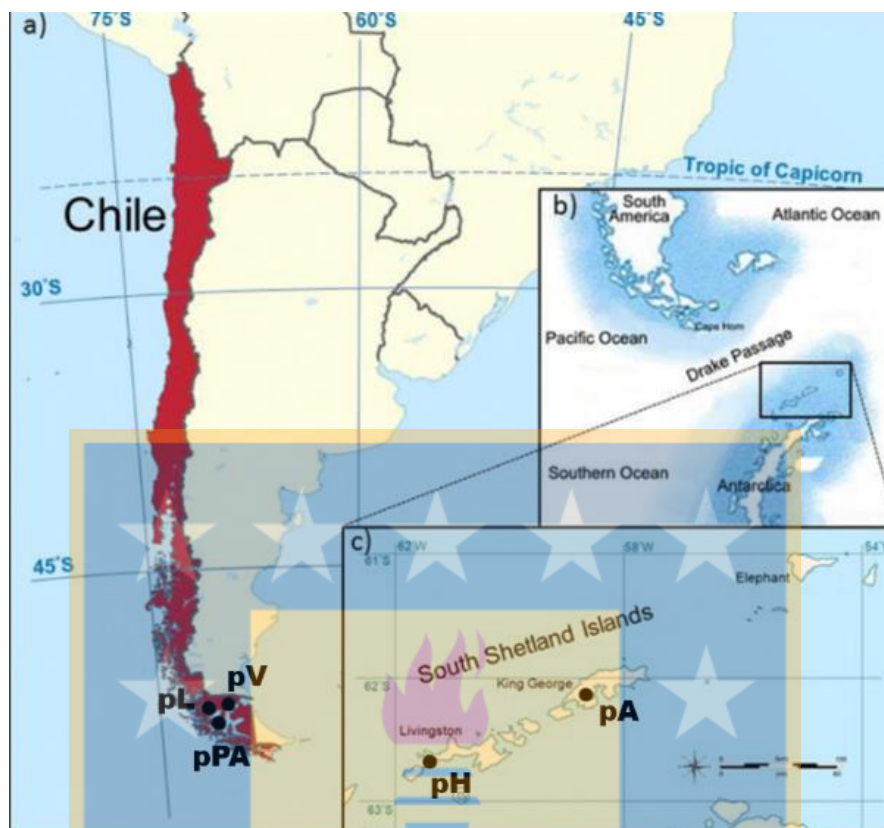


Figura 1: Mapa de ubicación de los sitios de muestreo estudiados de *Colobanthus quitensis*: a) Ubicación geográfica de las poblaciones de América del Sur, b) mapa de contorno del pasaje de Drake y, c) el área de ampliación del archipiélago de las Shetland del Sur con la isla Rey Jorge y la isla Livingston. Población La Vega (pV); población Laredo (pL); población La Marisma (pPA); población Arctowski (pA); población Punta Hannah (pH). Modificado de Koc et al. (2018).

5.2 Evaluación morfo-fisiológica en plantas *in vitro* de *C. quitensis* (Experimento 1)

5.2.1 Medios de cultivo para propagación de material vegetal *in vitro*.

Para el desarrollo de todos los experimentos se utilizó medio MS (Murashige & Skoog, 1962), al 100% de concentración (4,43g/L), sacarosa al 3%, 6-Bencilaminopurina (BAP) 0,5 mg/L, Acido indol-3-acético (AIA) 0,25 mg/L, se ajustó el pH a $5,7 \pm 2$, se adicionó agar al 0,7% y diferentes volúmenes de NaCl desde una solución stock a 1M, para obtener una concentración final de 0mM (control), 50mM, 100mM, 150mM y 200mM. Una vez listo el medio se autoclavó a 120°C a 1 atm de presión por 15 minutos. Transcurrido este tiempo y una vez que el medio alcanzó una temperatura de 50°C, se adicionó Tiosulfato de plata

(STS) estéril hasta alcanzar una concentración de $10\mu\text{M}$. Debido a que el reactivo no es termoestable, se procedió a adicionar el STS bajo cámara de flujo laminar, previamente esterilizado por filtración. Posteriormente se procedió a dispensar 25mL del medio en los frascos de vidrio de 250 mL, teniendo un total de 40 frascos por población, por tanto, para cada concentración se tenía un total 8 frascos.

5.2.2 Ensayo de salinidad para plántulas *in vitro* de 5 poblaciones de *C. quitensis*.

Bajo cámara de flujo laminar, se trabajaron las plántulas de las diferentes poblaciones de *C. quitensis* por separado, las plántulas se dejaron momentáneamente en una placa Petri estéril para retirarles las hojas amarillas y traspasarlas a los frascos que contenían el medio con cada tratamiento de salinidad. El efecto del NaCl fue evaluado con un $N=80$ para cada una de las diferentes concentraciones salinas, por lo que se utilizaron 10 plántulas por frasco con un total de 40 frascos por población. Se realizaron evaluaciones no destructivas los días 15, 30, 45 y 60 días. Al día 60, además, se evaluaron variables cuantitativas de morfología y se tomaron muestras para analizar otras variables fisiológicas, bioquímicas y moleculares, en donde estas dos últimas serán analizadas como parte de otro estudio dentro del proyecto.

5.2.3 Evaluaciones morfo-fisiológicas en 5 poblaciones de *C. quitensis*.

A los 60 días se evaluaron las variables no destructivas tales como; mortalidad, número de botones florales y clorosis del total de plántulas por tratamiento por población. La mortalidad se evaluó determinando el porcentaje acumulado de plántulas muertas durante los 60 días del ensayo. El número de botones florales se determinó a partir de la diferencia (delta) del total de botones generados en cada tratamiento salino respecto al control para cada población. La clorosis se evaluó al día 60 por medio de registro fotográfico (Fig. A1-A5), de las plántulas por cada tratamiento salino y por población. Para ello se estableció una escala de clorosis (Tabla 2). Al día 60, se procedió a evaluar las variables morfológicas de cada población. Para ello se evaluó al azar un $N=5$ con 3 réplicas para cada tratamiento salino, en donde se midió la longitud foliar (mm) y longitud radicular (mm) con la ayuda de un Caliper (TRUPER $e=0,02\text{mm}$). Se consideró como biomasa solo el peso seco. Para evaluar el peso fresco, por población, se tomaron 15 plántulas de cada tratamiento al azar. Éstas se lavaron con agua destilada retirando la totalidad del medio de cultivo evitando que se rompa la raíz, se secaron cuidadosamente con toalla de papel y se llevaron a la balanza analítica

(RADWAG as220/c2 e=1mg). Posteriormente se guardaron las muestras en un sobre de papel rotulado con el nombre de la población y la concentración salina correspondiente a cada tratamiento. Para determinar el peso seco, los sobres ya rotulados con las muestras se llevaron a una estufa de secado por 4 días a $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ con el fin de deshidratar el material vegetal. Una vez calculada la biomasa, se juntaron las muestras por tratamiento y por población para realizar un análisis preliminar del contenido de iones (Na^+ , K^+ , Mg^{+2} y Ca^{+2}).

Tabla 2: Escala de clorosis establecida para evaluación de plántulas de *Colobanthus quitensis*.

Escala de Clorosis	
Porcentaje de clorosis	Criterio de escala
100%	Planta totalmente clorótica
75%	Planta clorótica con ápice y dos pares de hojas verdes
50%	Planta con la mitad de hojas verdes
25%	Planta con dos pares de hojas basales cloróticas
0%	Planta totalmente verde

5.2.4 Cuantificación de iones Na^+ / K^+

Este análisis fue realizado en colaboración con la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY), México por MC. María de Fátima Medina Lara. Para la cuantificación de iones Na^+/K^+ se utilizaron reactivos y solventes de grado analítico. Los estándares de Potasio y Sodio (1000 ppm) fueron comprados de Sigma Chemical Co. (USA).

Se pesaron 0,1 gramos de las muestras secas en crisoles y se sometieron a un proceso de calcinación en una mufla empleando temperaturas de 250°C por 1 h y luego de 500°C por 3 h, posteriormente se terminaron de digerir las muestras en 5 mL de una solución de HCl al 40% sobre una placa de calentamiento hasta secarse, seguidamente se recuperaron los iones en agua destilada y se aforó en matraces de 25 mL. Finalmente se retiraron las cenizas por filtración (Whatman 42) y las muestras se almacenaron en viales de plástico para su posterior análisis. (Metodología del laboratorio de suelos forestales, Universidad de Florida, Implementada por Armando Escamilla y Mary Mcleod).

Para la determinación de iones por absorción atómica, la concentración de cada elemento se determinó por flama, empleando el equipo de absorción atómica modelo AAnalyst 200 (PerkinElmer, MA, USA), siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante del equipo para el análisis de cada elemento, haciendo uso de las curvas de calibración correspondientes.

5.3 Ensayo de tolerancia a concentraciones altas de NaCl (*Experimento 2*)

5.3.1 Material vegetal y medios de cultivo.

Para el ensayo se utilizaron tres poblaciones de *C. quitensis* debido a la falta de material vegetal en las demás poblaciones. Para ello, se seleccionó una población representativa de cada zona estudiada previamente. Se utilizó una población proveniente de la Antártica (Punta Hannah), otra población proveniente de Punta Arenas, Chile (La Marisma) y otra población de pradera (La Vega) (Fig. 1). Para el ensayo de tolerancia a NaCl, cada planta fue propagada *in vitro* en tubos de ensayos, en medio MS al igual que en el experimento anterior y concentraciones más altas de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). Una vez autoclavado el medio e incorporado el STS, se procedió a dispensar 5mL del medio en los tubos de ensayo, se utilizaron 12 tubos por cada concentración evaluada, para un total de 48 tubos por población.

5.3.2 Ensayo de evaluación a la tolerancia de NaCl en poblaciones de *C. quitensis*.

Bajo cámara de flujo laminar, se trabajaron las plántulas de las diferentes poblaciones de *C. quitensis* por separado. A cada plántula se le retiraron las hojas amarillas y se colocó un individuo por tubo de ensayo, el cual contenía el medio con cada concentración de salinidad. Todas las evaluaciones se realizaron a los 40 días del ensayo, donde se midió mortalidad, clorosis, longitud radicular, biomasa foliar y radicular, eficiencia fotosintética (Fv/Fm) e índice de rendimiento fotosintético (PI).

5.3.3 Evaluaciones morfo-fisiológicas en 3 poblaciones de *C. quitensis*.

La mortalidad fue evaluada a los 40 días para cada individuo por población, para así calcular un porcentaje de plántulas muertas. La clorosis se evaluó a los 40 días, en donde se midió cada una de las plántulas por cada tratamiento salino y por población. Para ello se usó la misma escala de clorosis (Tabla 2) establecida en el experimento 1. El largo de raíz se obtuvo por medio de fotografías, las cuales fueron analizadas con el software ImageJ v1.53t,

en donde primeramente se estableció una escala con una longitud conocida y posteriormente se procedió a marcar el largo de la raíz para conocer su longitud. Los datos obtenidos fueron analizados posteriormente por el programa STATISTICA v12.0. Para la evaluación de las variables morfológicas de cada población, la plántula se separó en parte aérea y radicular y se pesaron por separado. La medición de la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) y el rendimiento fotosintético (PI), se le realizó a cada una de las poblaciones de *C. quitensis* estudiadas y en cada una de las concentraciones salinas, para lo cual se utilizó un fluorímetro Hansatech PEA, en donde se midió una hoja a cada planta, las cuales fueron oscurecidas por pinzas por 30 minutos y para posteriormente medir el valor de Fv/Fm y PI siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.4 Evaluación de la tolerancia en plántulas recién germinadas (Experimento 3)

5.4.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de *C. quitensis* previamente recolectadas y almacenadas en el Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales, Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles. Para el ensayo se utilizaron semillas de *C. quitensis* de las mismas poblaciones mencionadas anteriormente, dos de procedencia Antártica (Arctowski y Punta Hannah), dos con procedencia de Punta Arenas, Chile (La Marisma y Laredo) y una población de pradera (La Vega).

5.4.2 Desinfección de semillas

Las semillas se desinfectaron bajo cámara de flujo laminar siguiendo el protocolo de desinfección de semillas establecido por Cuba-Díaz et al., (2017). Se eliminó el etanol con la ayuda de una Micropipeta y se le incorporó una solución de hipoclorito de sodio (cloro comercial) al 5%, se agitó en vórtex por 7 minutos y posteriormente se descartó. Por último, las semillas se lavaron 3 veces con agua desionizada estéril y se almacenaron en sus respectivos tubos con agua destilada estéril hasta el día siguiente.

5.4.3 Medios de cultivo para germinación y tratamiento con NaCl.

El medio de germinación se preparó en un frasco Schott de 500mL, al cual se le adicionó agua destilada y sacarosa al 3%, se ajustó el pH a $5,7 \pm 2$ y se le agregó agar al 0,7%. Seguidamente el medio se esterilizó en una autoclave a 120°C a 1 atm de presión por 15

minutos. El medio se dispensó en 25 placas Petri redondas estériles bajo cámara de flujo laminar.

Para el tratamiento salino se prepararon los medios de cultivo en frascos Schott de 1000mL. El medio se dispensó en placas Petri cuadradas estériles, en donde para cada población se utilizarían dos placas por tratamiento salino.

5.4.4 Ensayo de tolerancia a NaCl de semillas germinadas para 5 poblaciones de *C. quitensis*

Bajo cámara de flujo laminar, se sembraron con la punta de una micropipeta estéril aproximadamente 200 semillas por población de *C. quitensis* en medio agar-sacarosa, las cuales se desinfectaron previamente el día anterior. Se llevaron a una cámara de crecimiento por 30 días a temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad.

Debido a que el porcentaje de germinación varió entre las poblaciones de *C. quitensis* (Fig. A10), de todas las semillas que alcanzaron a germinar hasta el día 30, se seleccionó un número similar de plántulas con 2 pares de hojas verdaderas para todas las poblaciones. Las plántulas seleccionadas se trabajaron bajo cámara de flujo laminar y se llevaron a los diferentes medios salinos (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). Estos medios se trabajaron en de forma vertical, en donde previamente se cortó y retiró una tira del medio de la parte superior de la placa Petri cuadrada. Las plántulas fueron posicionadas cuidadosamente con pinzas en la zona donde se retiró la banda de medio, las placas se taparon con papel craft para oscurecer la zona de las raíces y se llevaron a una cámara de crecimiento con temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad por 15 días. Las diferentes poblaciones de *C. quitensis* se trabajaron por separado. Debido a que el porcentaje de germinación variaba entre las poblaciones, teniendo poblaciones con un alto porcentaje de germinación y otras con porcentaje nulo, el efecto del NaCl se evaluó con un $n= 40$ para la población pPA en las diferentes concentraciones salinas y $n=12$ para pL en concentraciones de 0mM, 300mM y 400mM. A los 15 días se realizaron evaluaciones de mortalidad, clorosis, longitud radicular y biomasa total siguiendo las metodologías descritas previamente en el experimento 2.

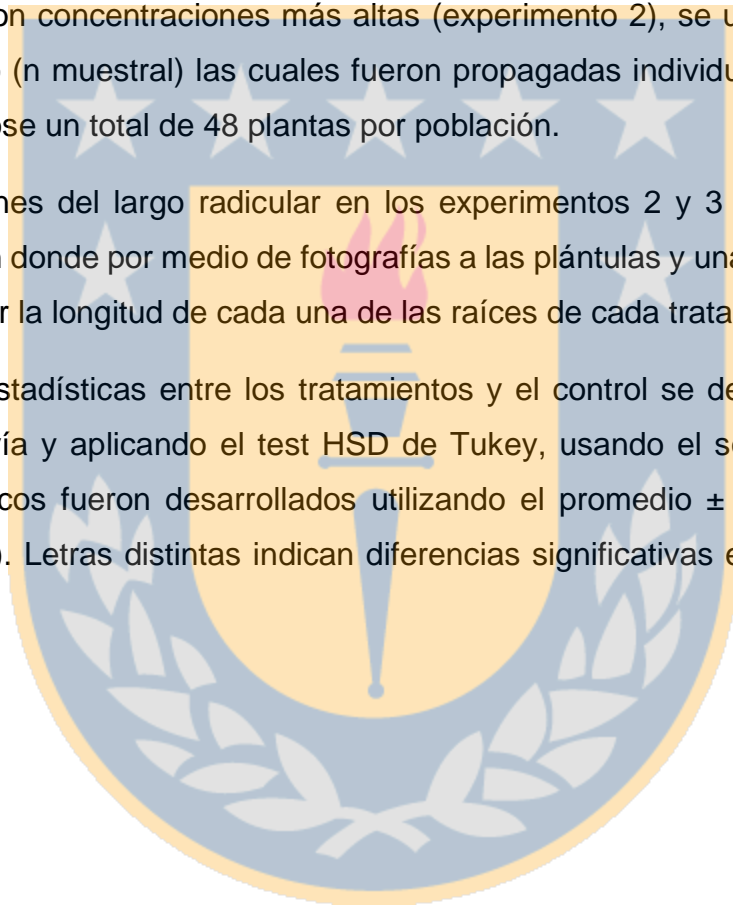
5.5 Análisis estadísticos.

Los experimentos (experimento 1) se realizaron con un diseño completamente al azar, donde se seleccionaron las plántulas desde frascos de cultivos con diferentes fechas de propagación usando como criterio de selección que tuvieran un tamaño de 1,5 cm, tal como se describió anteriormente. Para cada población se usaron 80 plantas por tratamiento (n muestral), las cuales se distribuyeron en 8 frascos de cultivo con 10 plantas cada uno, utilizándose un total de 400 plantas por población y tratamiento salino.

Para el ensayo con concentraciones más altas (experimento 2), se usaron 12 plantas por tratamiento salino (n muestral) las cuales fueron propagadas individualmente en tubos de ensayo, utilizándose un total de 48 plantas por población.

Para las mediciones del largo radicular en los experimentos 2 y 3 se utilizó el software ImageJ (v.53t), en donde por medio de fotografías a las plántulas y una medida conocida se procedió a evaluar la longitud de cada una de las raíces de cada tratamiento por población.

Las diferencias estadísticas entre los tratamientos y el control se desarrollaron mediante ANOVA de una vía y aplicando el test HSD de Tukey, usando el software STADISTICA (v12.0). Los gráficos fueron desarrollados utilizando el promedio \pm DS con el programa SigmaPlot (v12.0). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).



6 RESULTADOS

6.1 Experimento 1: Evaluación morfo-fisiológica en plantas *in vitro* de *C. quitensis*

6.1.1 Aparición de botones florales

La aparición de botones florales se determinó por población calculando un valor delta a partir del control (Fig. 2). Para eso, se restó el total de botones florales presentes a los 60 días de cada concentración salina, por población con su respectivo control.

En la fig. 2 se puede observar que pL en concentraciones salinas de 100mM y 150mM presentó un mayor número de botones florales que el control. La población pV en concentración de 50mM también desarrolló un mayor número de botones florales en comparación al control, número que fue disminuyendo a medida que aumentaba la concentración salina. El resto de las poblaciones presentaron menos botones florales que los cuantificados en el tratamiento control.

6.1.2 Mortalidad

Todas las poblaciones mostraron bajos (menor al 12%) porcentajes de mortalidad (Fig. 3) a excepción de pA y pV, que presentaron porcentajes mayores en el tratamiento control en los días 45 y 60, llegando a 21% en la población pA. La mayoría de las poblaciones comenzaron a aumentar su porcentaje de mortalidad a partir del día 30, pero no se puede establecer una clara relación de esta mortalidad con el incremento de la salinidad en el medio.

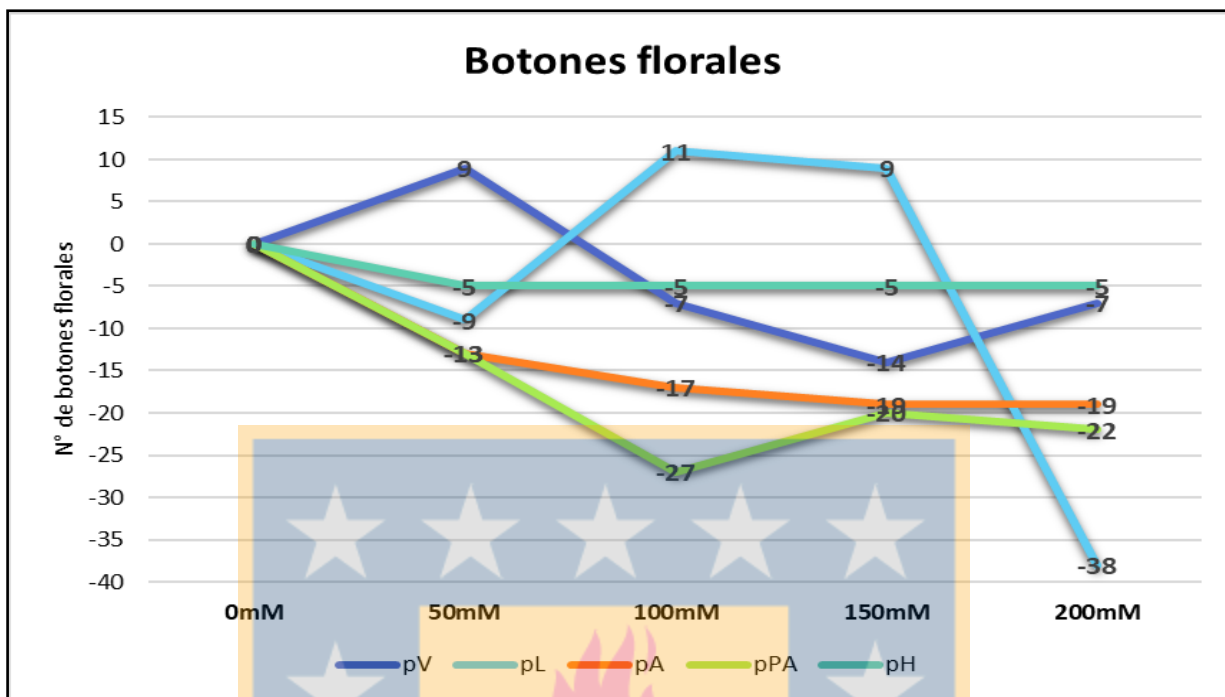


Figura 2: Número de botones florales en plantas de *Colobanthus quitensis* en las cinco poblaciones estudiadas, sometidas a diferentes concentraciones de NaCl a los 60 días. Valores expresados en números de botones florales. Población Arctowski (pA); población Punta Hannah (pH); población La Marisma (pPA); población Laredo (pL); población La Vega (pV).

6.1.3 Clorosis

El porcentaje de clorosis se evaluó en todas las poblaciones y en todos los tratamientos a los 60 días del ensayo (Fig. 4). Se eligieron 4 frascos al azar con 10 plantas cada una, para así evaluar un total de 40 plantas, las cuales se agruparon según el porcentaje de clorosis con los criterios establecidos en la Tabla 2. Se observó presencia de clorosis en diferentes porcentajes en todas las poblaciones y tratamientos. Para todas las poblaciones y tratamientos el mayor porcentaje de clorosis observada fue del 50%. Aunque la concentración más alta de NaCl evaluada (200 mM), causó los mayores promedios de plantas con clorosis igual o superior al 50%, se puede observar que en el control (0 mM de NaCl) también se observaron altos porcentajes de clorosis (Fig. 4), por lo que tampoco se logró establecer una clara relación entre la clorosis y el incremento de la salinidad en el medio.

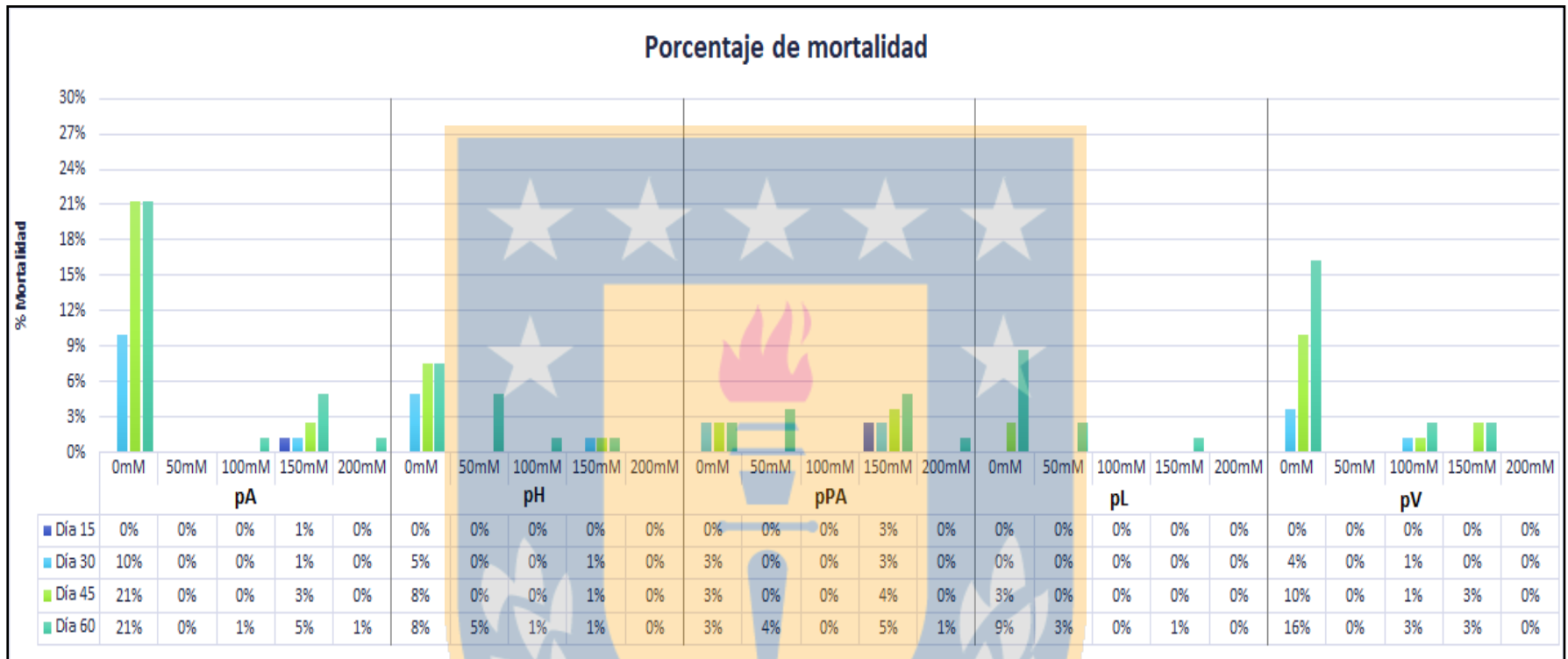


Figura 3: Porcentaje de mortalidad acumulado para cada tratamiento salino en poblaciones de *Colobanthus quitensis*. Evaluación de mortalidad por población cada 15 días hasta el día 60. Población Arctowski (pA); población Punta Hannah (pH); población La Marisma (pPA); población Laredo (pL); población La Vega (pV).

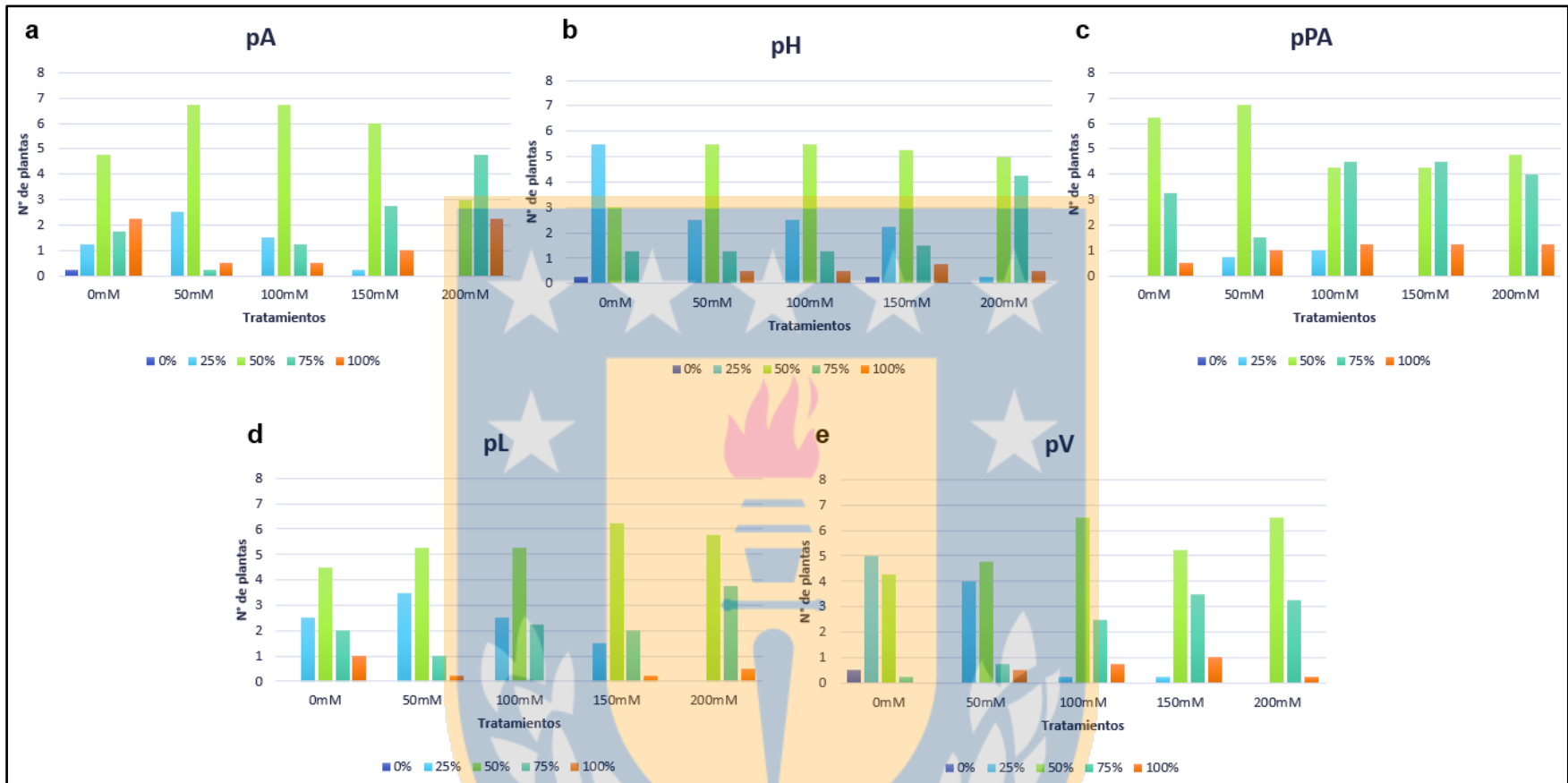


Figura 4: Clorosis para cada tratamiento salino en poblaciones de *Colobanthus quitensis*. a) población Arctowski (pA); b) población Punta Hannah (pH); c) población La Marisma (pPA); d) población Laredo (pL); e) población La Vega (pV). El porcentaje de clorosis se relaciona con el promedio de plantas que presentan amarillamiento según Tabla 2. Se evaluaron todos los tratamientos a los 60 días del ensayo.

6.1.4 Longitud foliar

Todas las poblaciones estudiadas mostraron una tendencia a aumentar la longitud foliar con el incremento de la concentración de NaCl (Fig. 5), excepto en pA, donde se observó una disminución significativa en la concentración de 200 mM (Fig. 5a). Esta misma población mostró valores de longitud foliar significativamente más altos en presencia de 100 mM de la sal (Fig. 5a). Las poblaciones pH y pL (Figs. 5b y 5d) no mostraron diferencias significativas respecto del control para ninguna de las concentraciones evaluadas. Mientras que pPA y pV mostraron incrementos significativos en su longitud foliar a 50 y 100 mM y a 150 mM, respectivamente (Figs. 5c y 5e).

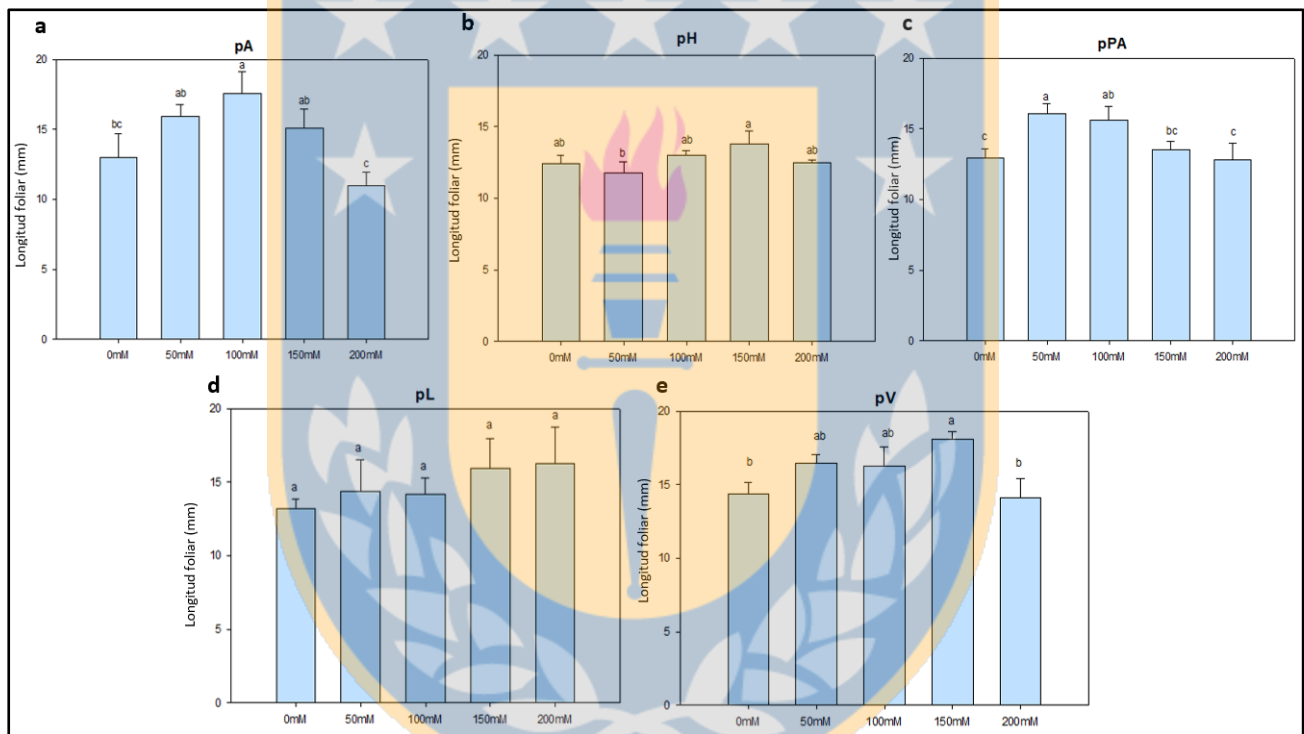


Figura 5: Longitud foliar de las diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM). a) población Arctowski (pA); b) población Punta Hannah (pH); c) población La Marisma (pPA); d) población Laredo (pL); e) población La Vega (pV). Se evaluaron todos los tratamientos a los 60 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

6.1.5 Longitud radicular

En todas las poblaciones estudiadas se observa como tendencia un incremento en la longitud radicular en presencia de las concentraciones más bajas evaluadas, aunque solo se observan diferencias positivas y significativas en las poblaciones pPA y pL (Fig. 6 c y d). Para el resto de las poblaciones y concentraciones las diferencias observadas no fueron significativas estadísticamente, excepto para pH donde sí se evidenció una disminución significativa de la longitud radicular en las concentraciones de 150 y 200 mM de NaCl (Fig. 6b).

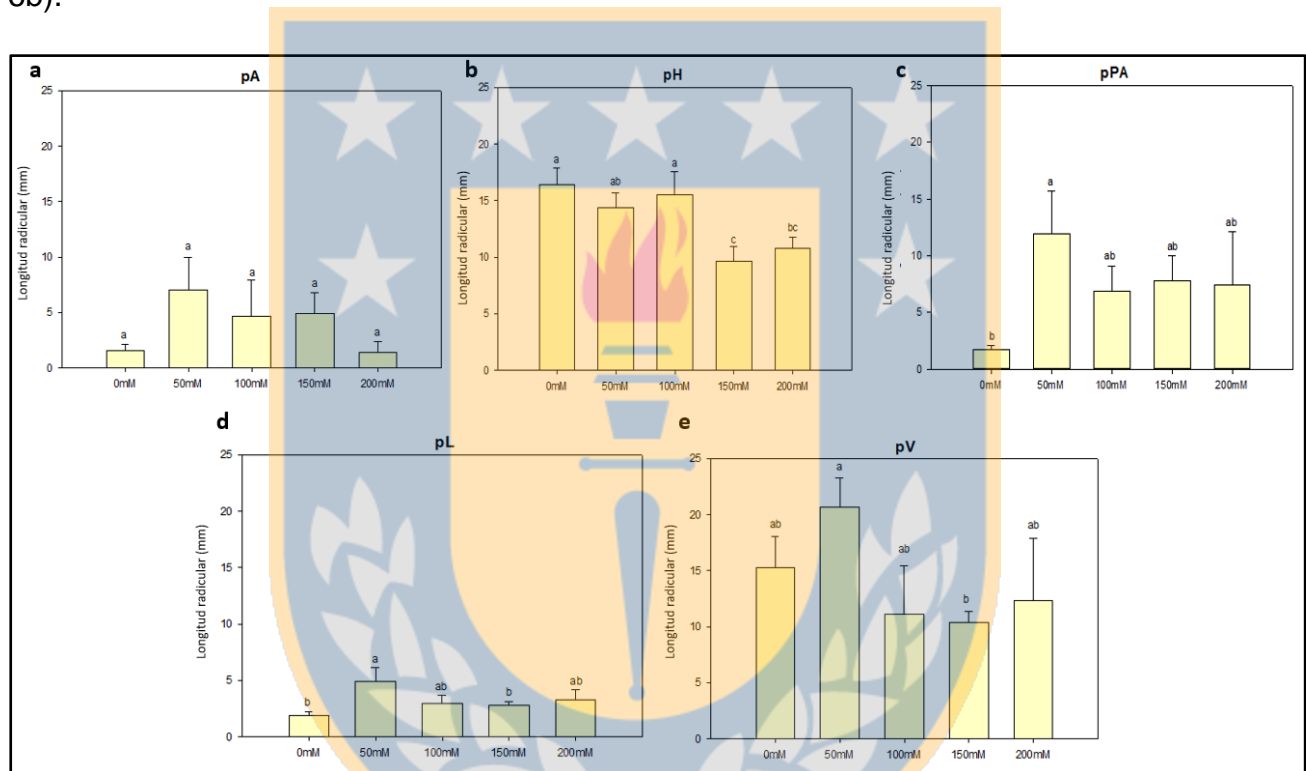


Figura 6: Longitud radicular de las diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM). a) población Arctowski (pA); b) población Punta Hannah (pH); c) población La Marisma (pPA); d) población Laredo (pL); e) población La Vega (pV). Se evaluaron todos los tratamientos a los 60 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

6.1.6 Biomasa total

En general, la biomasa no se vio afectada con el aumento de la concentración salina, más bien se observa una tendencia al incremento en biomasa con el incremento en la concentración de NaCl (Fig. 7). Solo en pA se observa una disminución significativa de la biomasa a 200mM de NaCl (Fig. 7a). Situación similar se observa en pV en las concentraciones de 100 y 150 mM, pero en 200 mM no se observan diferencias respecto del control (Fig. 7e). En el resto de las poblaciones el incremento en la biomasa es positivo en relación directa a la concentración de NaCl, lo que se observa a partir de los 150 mM de NaCl en pH, a los 100 mM en pPA y desde los 50 mM en pL (Fig. 7 b, c y d).

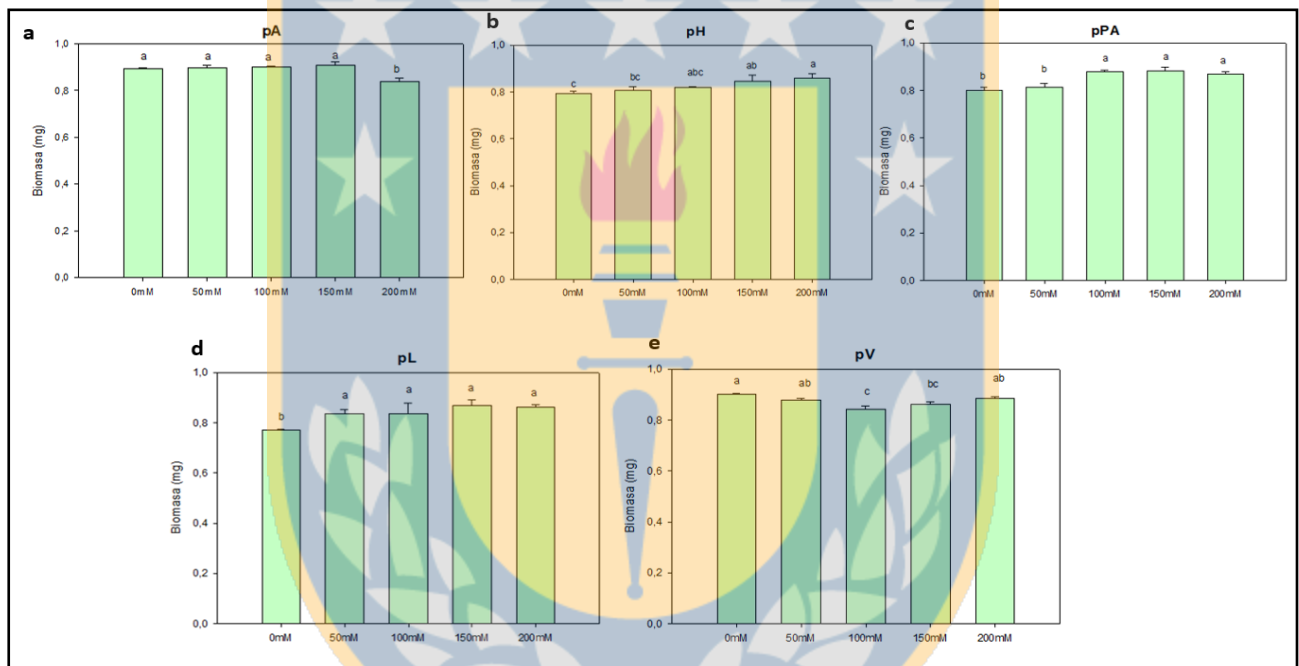


Figura 7: Biomasa de las diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM). a) población Arctowski (pA); b) población Punta Hannah (pH); c) población La Marisma (pPA); d) población Laredo (pL); e) población La Vega(pV). Se evaluaron todos los tratamientos a los 60 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p>0,05$).

6.1.7 Contenido de iones presentes en las diferentes poblaciones de *C. quitensis*.

Las muestras utilizadas para determinar biomasa se juntaron por concentración y por cada población de *C. quitensis* y se realizó un análisis del contenido de iones. Las poblaciones

pA y pH mostraron una disminución en el contenido de iones K^+ directamente relacionado con el incremento en el contenido de iones Na^+ . Mientras que las poblaciones; pPA, pL y pV no mostraron ningún efecto en respuesta al incremento en la concentración de NaCl, ya que los contenidos de iones K^+ se mantienen más o menos constantes a pesar del incremento en el contenido de iones Na^+ (Fig. 8).



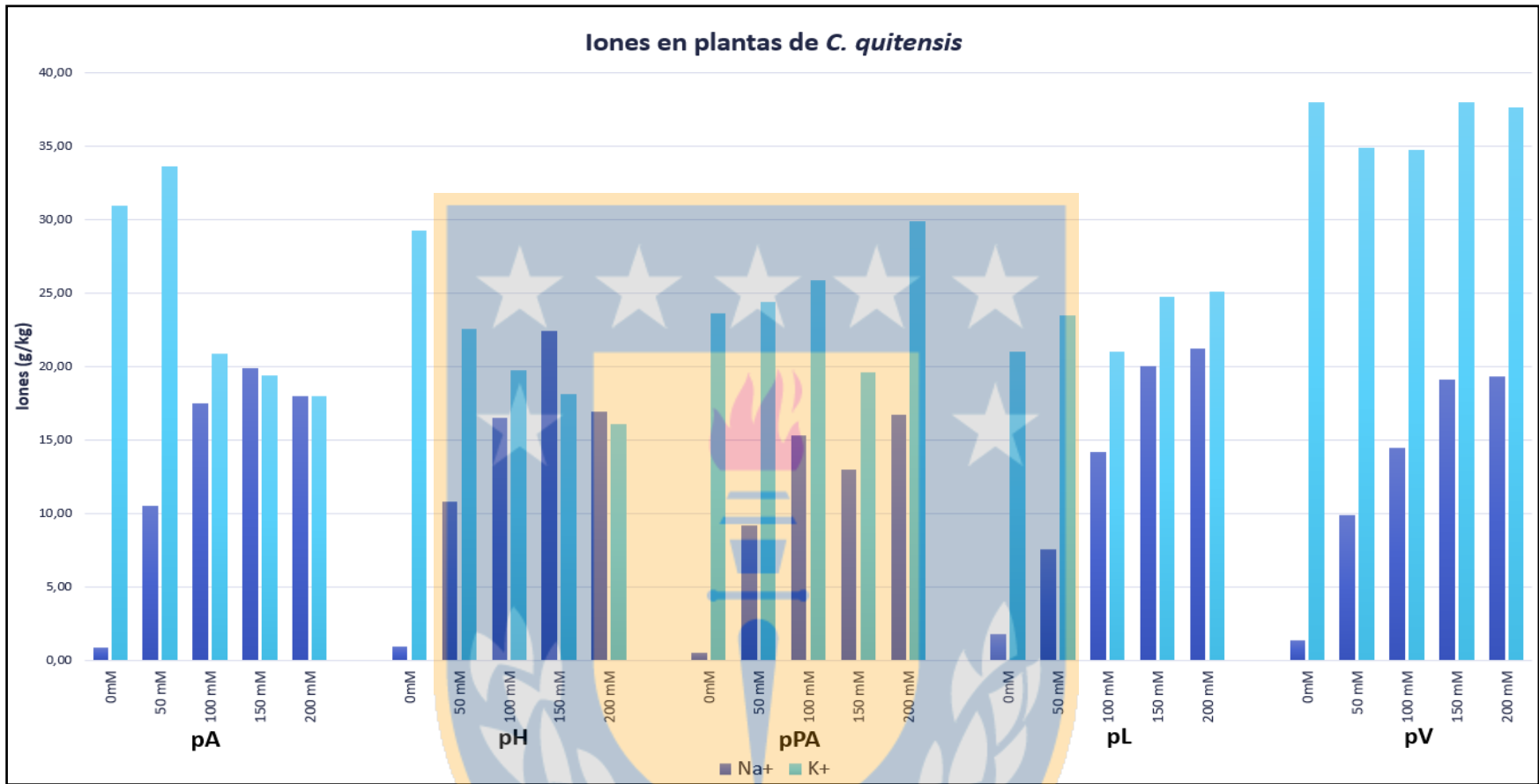


Figura 8: Contenido de iones Na⁺ y K⁺ presentes en plantas de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM). **pA.** población Arctowski; **pH.** población Punta Hannah; **pPA.** población La Marisma; **pL.** población Laredo; **pV.** población La Vega.

6.2 Experimento 2: Ensayo de tolerancia a concentraciones altas de NaCl

Las concentraciones de NaCl evaluadas (Experimento 1) no permitieron discriminar entre poblaciones tolerantes y sensibles, al menos con las variables analizadas. Por lo tanto, se procedió a un segundo experimento con concentraciones de NaCl más altas, ya en el rango de tolerancia de plantas descritas como halófitas con el propósito de detectar diferencias de tolerancia entre poblaciones. En este segundo experimento solo se utilizaron 3 poblaciones representativas de la distribución geográfica en estudio debido a la escasez de material vegetal.

6.2.1 Mortalidad

Se evaluó la mortalidad de 12 plantas por tratamiento, por población al día 40 del ensayo, en donde se observó un porcentaje considerablemente bajo para la población pH y pPA y nulo para la población pV (Tabla 3).

Tabla 3: Mortalidad en las diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). Se evaluaron todos los tratamientos a los 40 días.

Población	Abreviatura	Tratamiento	Dia 40	% Mortalidad
Punta Hannah	pH	0mM	0	0%
		200mM	0	0%
		300mM	0	0%
		400mM	1	8%
La Marisma	pPA	0mM	0	0%
		200mM	0	0%
		300mM	0	0%
		400mM	1	8%
La Vega	pV	0mM	0	0%
		200mM	0	0%
		300mM	0	0%
		400mM	0	0%

6.2.2 Clorosis

El porcentaje de clorosis fue analizado usando los criterios descritos en la tabla 2, a partir de la cuantificación de la observación directa mediante registro fotográfico (Fig. A7). La

población pH, mostró un incremento en el porcentaje de clorosis en relación directa con el incremento de la concentración salina (Fig. 9a), lo que se evidencia con el aumento en el número de plantas con un 75% de clorosis a partir de los 200 mM de NaCl y con una planta con clorosis del 100% a 400mM. La población de La Marisma (pPA), si bien mostró diferentes porcentajes de clorosis, no fueron muy diferentes de los observados en el control, por tanto, no se evidencian claros efectos de las concentraciones de NaCl evaluadas en esta variable para pPA (Fig.9b). Por su parte, pV mostró los porcentajes de clorosis más bajos, entre 0 y 25% sin claras diferencias entre el control y los tratamientos. Solo una planta mostró clorosis del 75% en la concentración más alta evaluada (Fig. 9c).

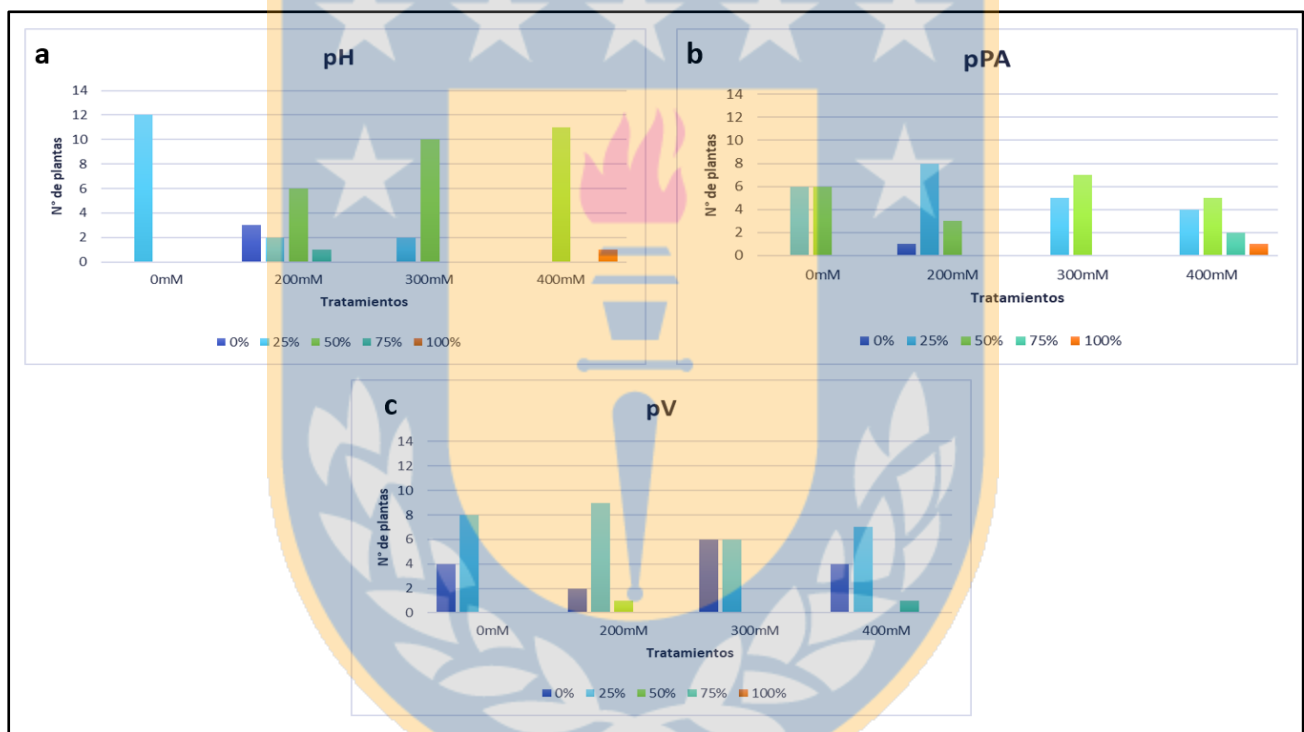


Figura 9: Clorosis en poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población Punta Hannah (pH); b) población La Marisma (pPA); c) población La Vega. El porcentaje de clorosis se relaciona con el total de las plantas que presentan amarillamiento. Se evaluaron todos los tratamientos a los 40 días del ensayo.

6.2.3 Longitud radicular

Las poblaciones pH y pV mostraron efectos negativos en la longitud radicular en respuesta a todas las concentraciones de NaCl evaluadas, excepto a 300 mM de NaCl para pV, que, aunque mostró tendencia a la disminución, no mostró diferencias significativas respecto del tratamiento control (Fig. 10.a y 10.c). En pPA, no se observaron diferencias significativas respecto del control, ni entre las concentraciones evaluadas (Fig. 10.b).

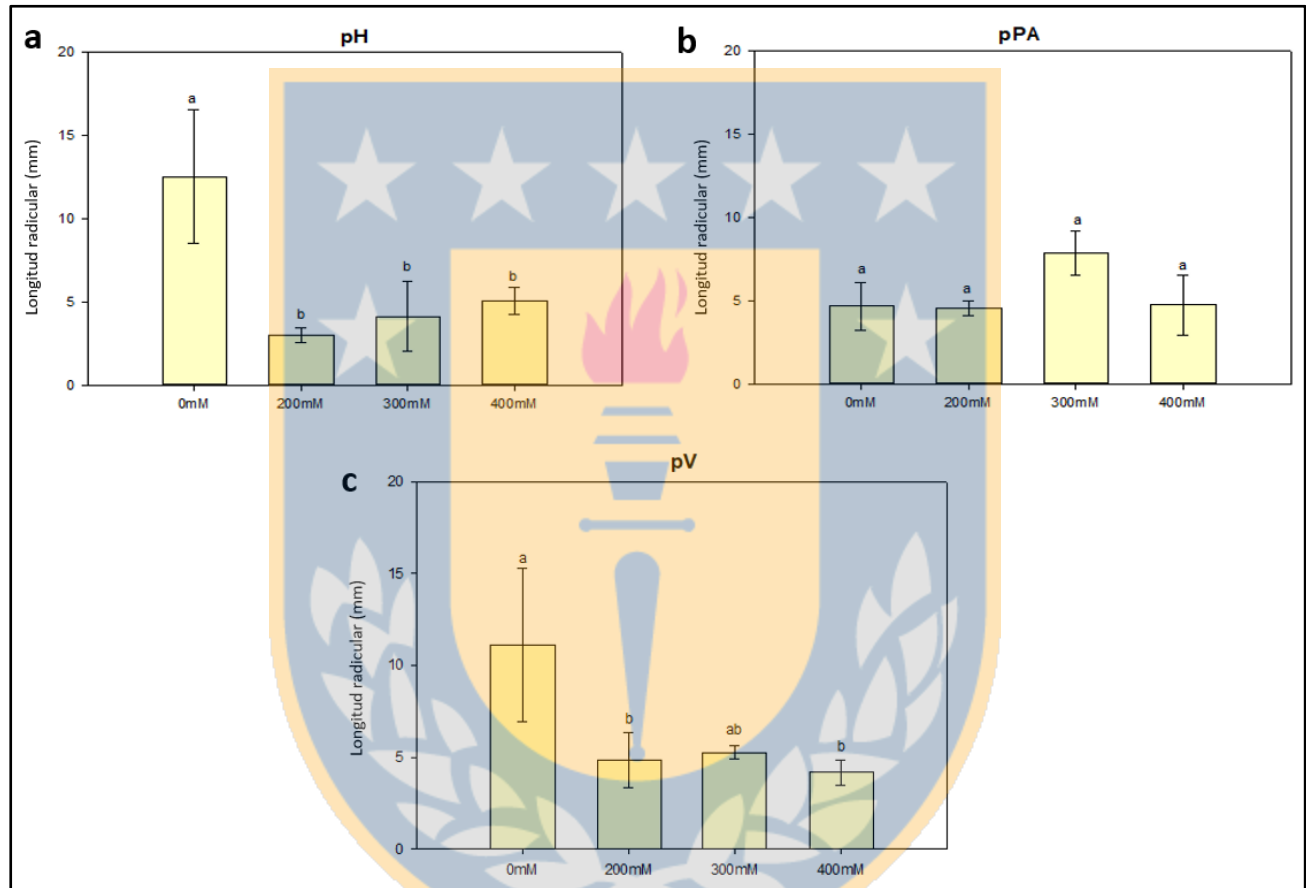


Figura 10: Longitud radicular de las diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población Punta Hannah; b) población La Marisma; c) población La Vega. Se evaluaron todos los tratamientos a los 40 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.2.4 Biomasa Foliar

El análisis de biomasa foliar (Fig. 11) mostró un incremento de esta, a pesar de las altas concentraciones de NaCl evaluadas. Este incremento fue significativo para 200 y 300 mM de NaCl en pH (Fig. 11.a) y para las tres concentraciones evaluadas en pPA (Fig. 11.b). En la población pV, si bien no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control, se observa una ligera tendencia a la disminución en la biomasa en la más alta concentración evaluada (Fig. 11.c).

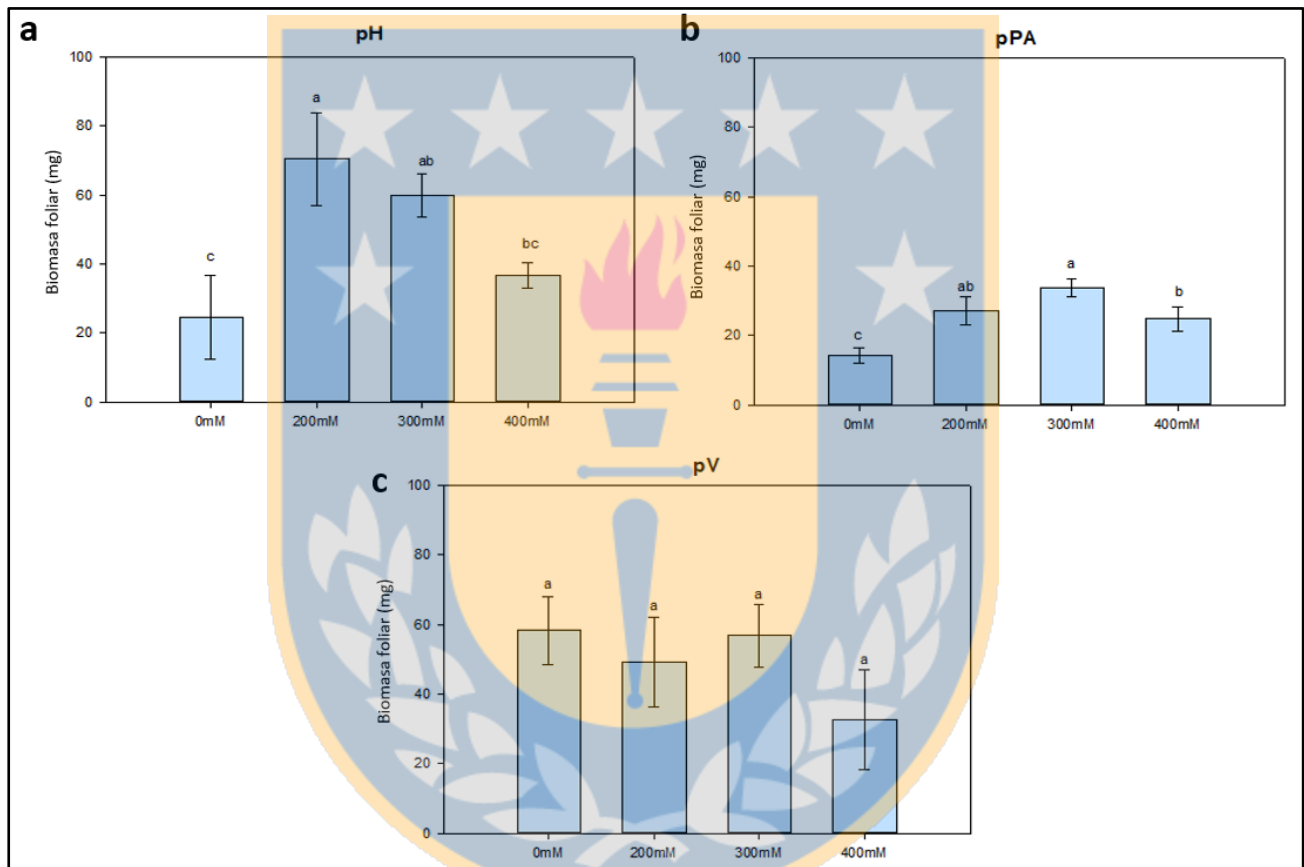


Figura 11: Biomasa foliar de diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población Punta Hannah; b) población La Marisma; c) población La Vega. Se evaluaron todos los tratamientos a los 40 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

6.2.5 Biomasa radicular

La biomasa radicular evidenció diferencias en las respuestas entre las poblaciones analizadas y en las concentraciones de NaCl evaluadas (Fig. 12). Las poblaciones pH y pV, mostraron una disminución significativa en su biomasa radicular en todas las concentraciones evaluadas, excepto en 200mM para pH, donde no se observaron diferencias significativas respecto del tratamiento control (Fig. 12a y c). Por su parte, pPA no mostró diferencias significativas entre el control y los tratamientos de 200mM y 400mM, pero si un incremento significativo en presencia de 300mM de NaCl respecto del control y los 200mM (Fig. 12b).

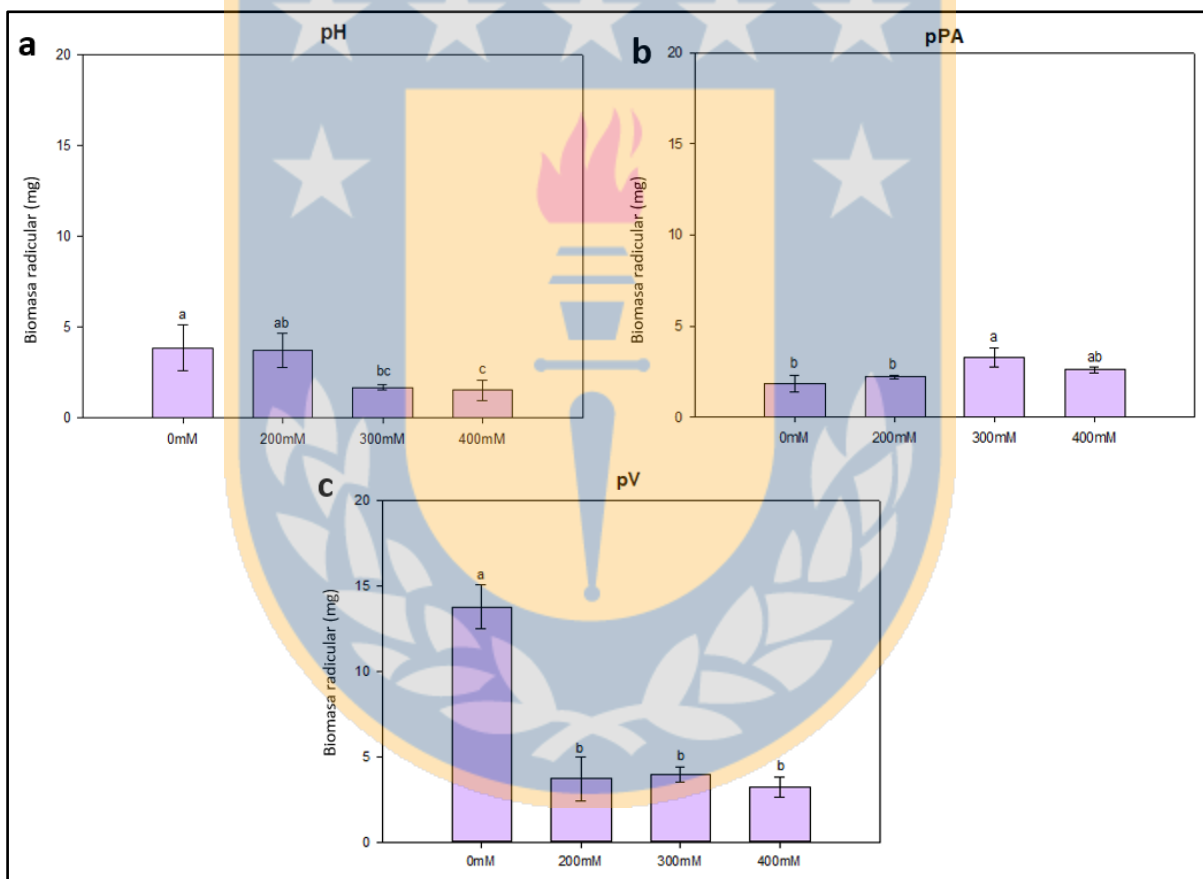


Figura 12: Biomasa radicular de diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población Punta Hannah (pH); b) población La Marisma (pPA); c) población La Vega (pV). Se evaluaron todos los tratamientos a los 40 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

6.2.6 Eficiencia fotosintética (Fv/Fm)

En ninguna de las tres poblaciones estudiadas se observaron efectos de las concentraciones de NaCl evaluadas en la eficiencia fotosintéticas expresadas como Fv/Fm.

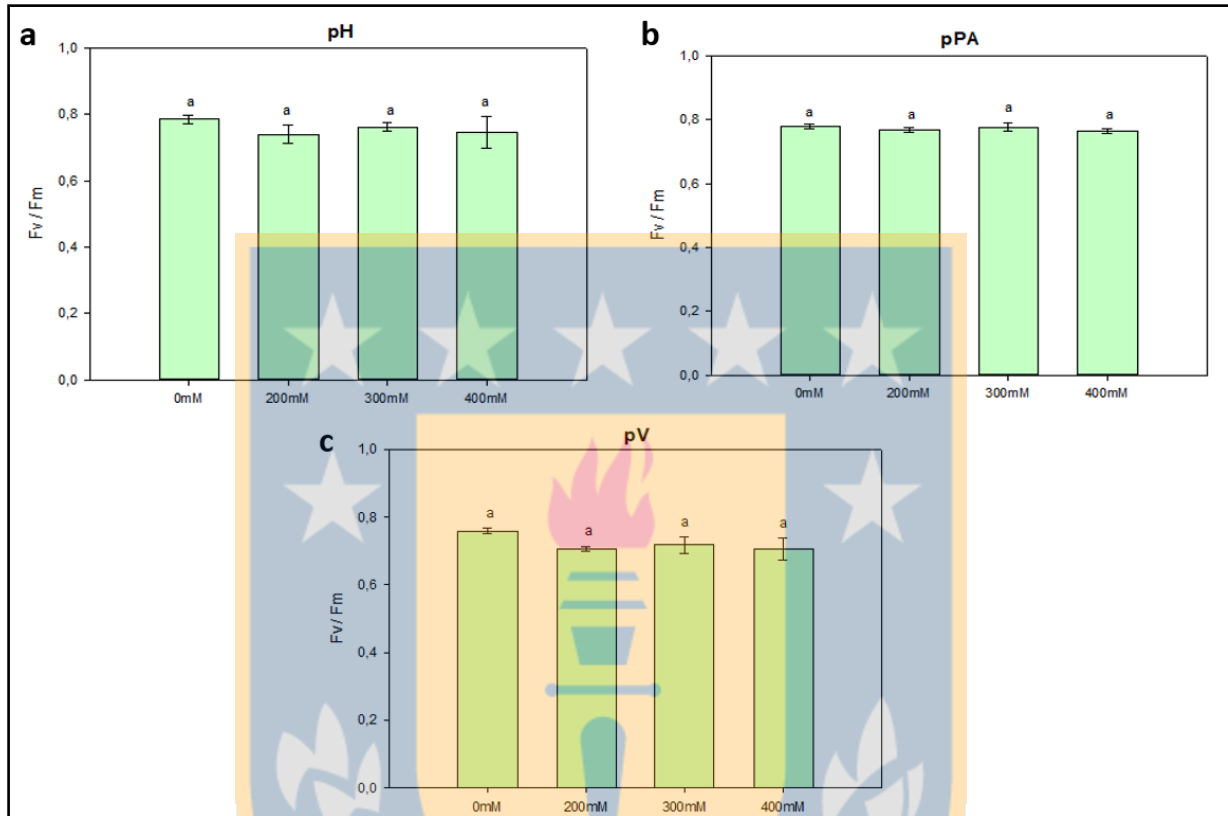


Figura 13: Eficiencia fotosintética de tres poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población Punta Hannah (pH); b) población La Marisma (pPA); c) población La Vega (pV). Se evaluaron todos los tratamientos a los 40 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

6.2.7 Índice de rendimiento fotosintético (PI)

Según los resultados obtenidos, la población pH y pPA no presentaron diferencias significativas entre el control y sus respectivos tratamientos, pero si muestran una tendencia a disminuir el potencial fotosintético a medida que aumenta la concentración salina (Fig. 14a y b). En la población pV, si se observaron diferencias significativas entre el control y las

concentraciones salinas evaluadas, pero sin diferencia significativa en los valores de PI entre las concentraciones de NaCl aplicadas (Fig. 14c).

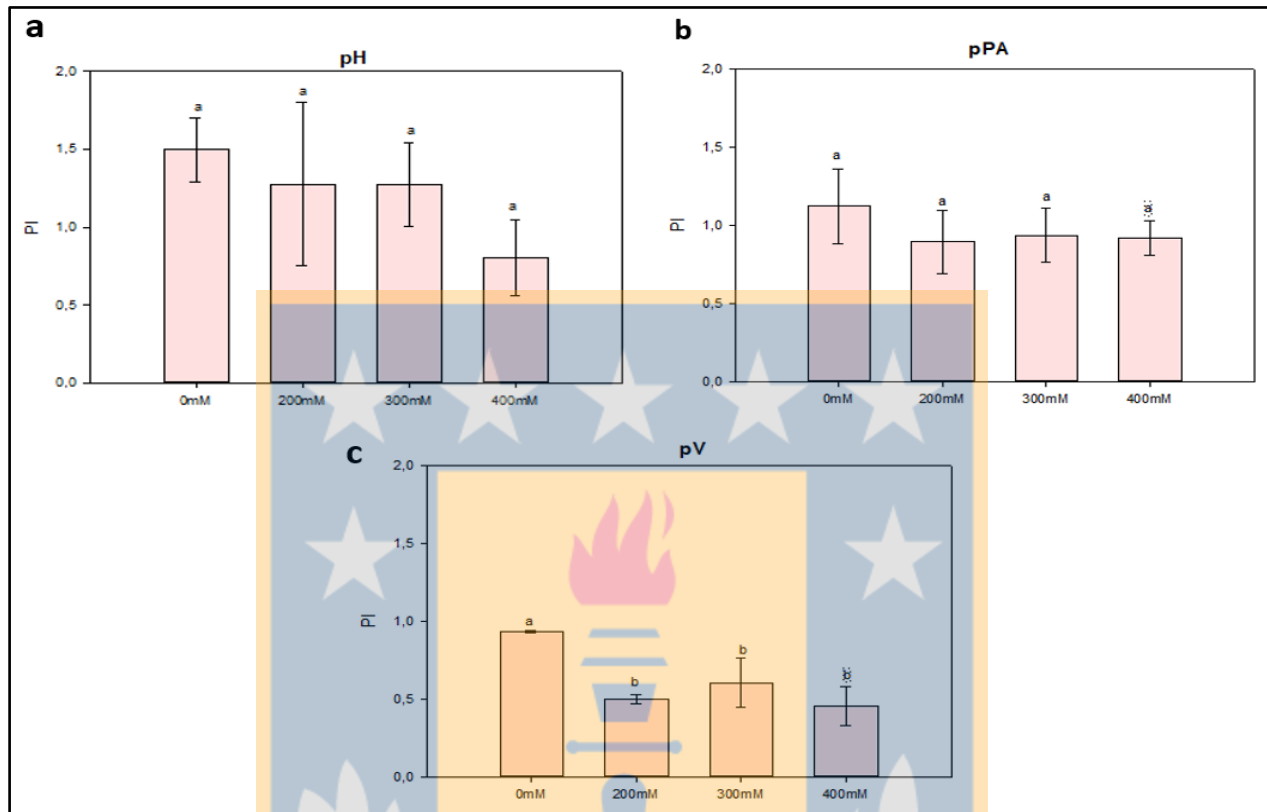


Figura 14: Índice de rendimiento fotosintético (PI) de tres poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población Punta Hannah (pH); b) población La Marisma (pPA); c) población La Vega (pV). Se evaluaron todos los tratamientos a los 40 días. Letras diferente indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

6.3 Experimento 3: Evaluación de la tolerancia en plántulas recién germinadas

El análisis de tolerancia a la salinidad (NaCl) en plántulas recién germinadas se dificultó por el bajo o nulo porcentaje de germinación obtenido en las diferentes poblaciones. Solo se obtuvieron suficientes plántulas en dos poblaciones de Punta Arenas (Chile), La Marisma (pPA) y Laredo (pL) (Fig. A8 y A9).

6.3.1 Mortalidad

Del total de 10 plantas estudiadas para pPA para cada tratamiento salino, a los 15 días se obtuvo un porcentaje de mortalidad de 20% para el tratamiento con 300mM de NaCl y de 10% para la concentración de 400mM. Mientras que en pL se obtuvo un 50% de mortalidad en las concentraciones de 300mM y 400mM, aunque esto se evaluó con un total de 4 plantas por tratamiento (Tabla 4).

Tabla 4: Mortalidad en las diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* recién germinadas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). Se evaluaron todos los tratamientos a los 15 días.

Población	Abreviatura	Tratamiento	Día 15	% Mortalidad
La Marisma	pPA	0 mM	0	0%
		200 mM	0	0%
		300 mM	2	20%
		400 mM	1	10%
Laredo	pL	0 mM	0	0%
		300 mM	2	50%
		400 mM	2	50%

6.3.2 Clorosis

El análisis de clorosis de las plantas recién germinadas evidenció un incremento en el porcentaje de amarillamiento directamente proporcional a las concentraciones de NaCl evaluadas en pPA (Fig. 15.a), con un incremento en el número de plantas con 75% de clorosis desde los 200mM. Para la población pL, a pesar del pequeño tamaño experimental, se pudo observar un incremento en la clorosis con el incremento de las concentraciones de NaCl evaluadas, observándose plantas totalmente cloróticas a los 300mM y 400mM de NaCl (Fig. 15.b).

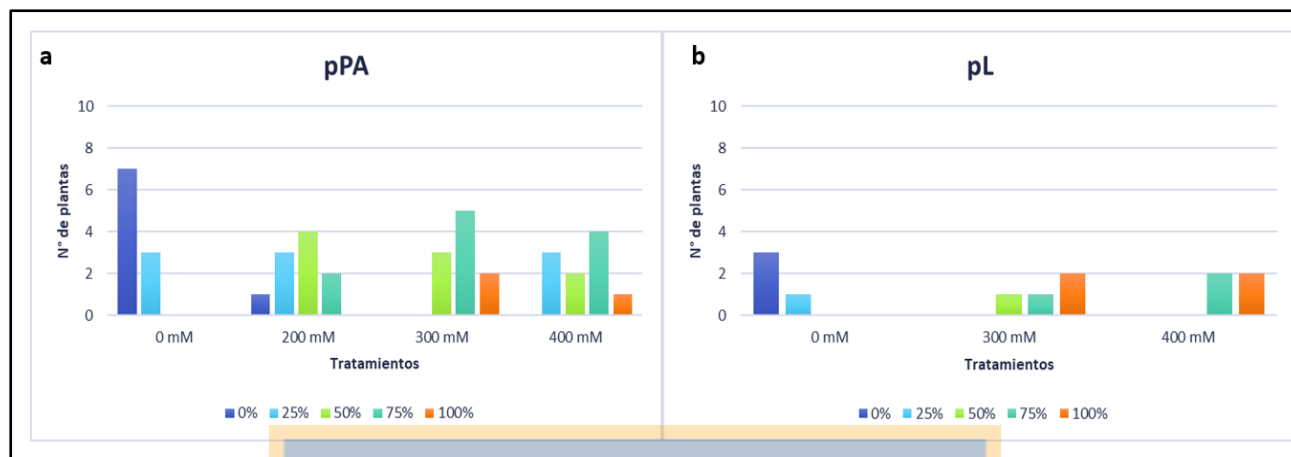


Figura 15: Clorosis en las diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* recién germinadas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población La Marisma (pPA); b) población Laredo (pL). El porcentaje de clorosis se relaciona con el total de las plantas que presentan amarillamiento. Se evaluaron todos los tratamientos a los 15 días del ensayo.

6.3.3 Longitud radicular

En la población pPA, no se observaron diferencias significativas en la longitud radicular entre los diferentes tratamientos y el control, pero sí entre las concentraciones de 200mM y 300mM (Fig. 16a). Para la población pL, el experimento solo se pudo realizar con tres tratamientos (0, 300 y 400 mM de NaCl) debido al bajo porcentaje de germinación obtenido. En esta población no se observaron diferencias significativas en la longitud radicular en ninguna de las concentraciones evaluadas (Fig. 16b).

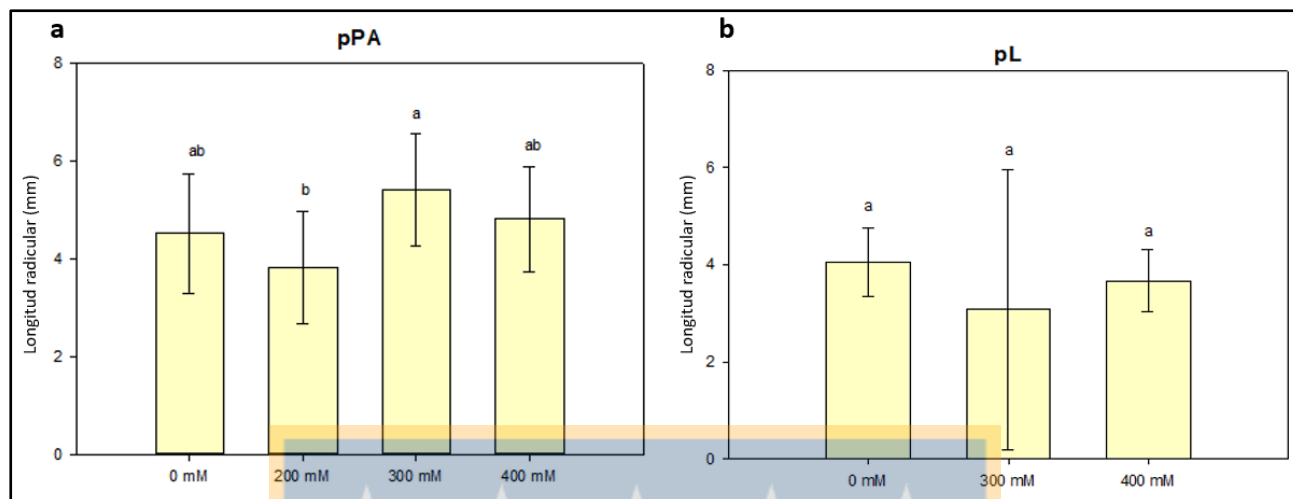


Figura 16: Longitud radicular en poblaciones de *Colobanthus quitensis* recién germinadas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población La Marisma (pPA); b) población Laredo (pL). Se evaluaron todos los tratamientos a los 15 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

6.3.4 Biomasa total

La población pPA no presentó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos salinos evaluados, pero sí de estos con respecto al control, con un incremento significativo en la biomasa total en presencia de las diferentes concentraciones de NaCl (Fig. 17.a). Mientras que para pL, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 17.b).

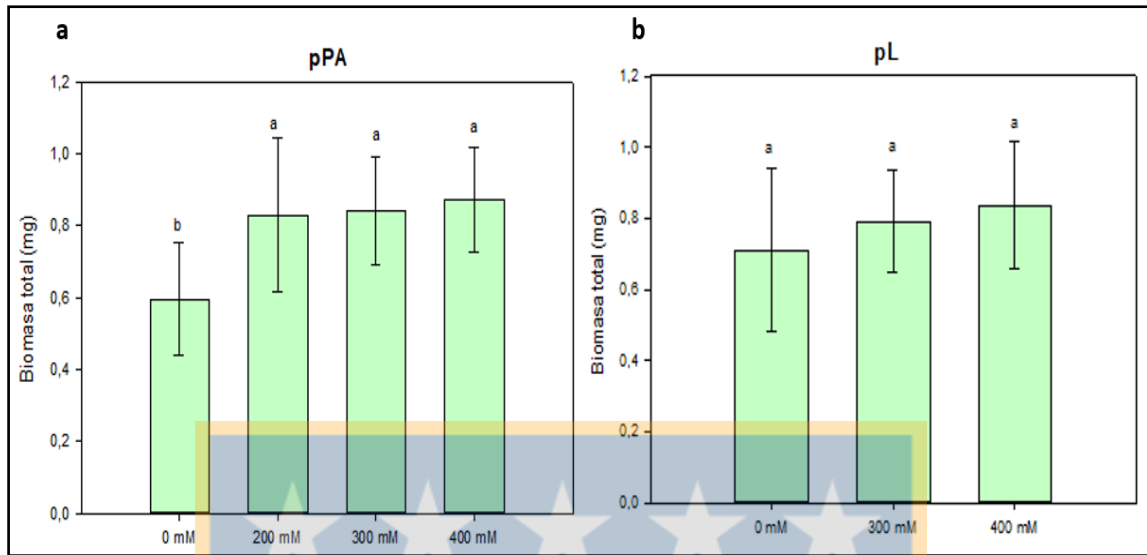


Figura 17: Biomasa total en poblaciones de *Colobanthus quitensis* recién germinadas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 200mM, 300mM y 400mM). a) población La Marisma (pPA); b) población Laredo (pL). Se evaluaron todos los tratamientos a los 15 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

7 DISCUSIÓN

La salinidad en los suelos, en primera instancia, impacta negativamente en las funciones fisiológicas y bioquímicas de las plantas, perjudicando su crecimiento y desarrollo resultando en plantas de tamaño pequeño, fases vegetativas prolongadas, reducciones en su biomasa y en muchos casos provocando reducción en el rendimiento y la muerte por estrés hídrico. Por ello, en esta investigación utilizamos variables de la morfofisiología para intentar establecer diferencias en la tolerancia, o sensibilidad, a la salinidad en poblaciones de la especie extremófila *C. quitensis* a partir de un estudio en condiciones controladas (*in vitro*).

7.1 Experimento 1: Evaluación morfo-fisiológica en plantas *in vitro* de *C. quitensis*

La aparición de ápices, botones florales o flores en cultivo de tejidos es considerada una variable de estrés (Joyce et al., 2003), debido a que generalmente las semillas producidas, si se producen son inviables. Durante la puesta a punto de protocolos de cultivo de tejidos para *C. quitensis* Cuba-Díaz et al. (2014), consideraron la aparición de floración como una variable negativa. En cambio, durante otras investigaciones y el desarrollo de protocolos de micropropagación y conservación en la colección *in vitro* de plantas antárticas del Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales, se ha observado el desarrollo de floración con semillas viables, que incluso germinan directamente en la flor (Fig. A6) en individuos de varias poblaciones de *C. quitensis*. Debido a esto, en esta investigación la aparición de botones florales se determinó mediante el establecimiento de un delta o diferencial entre el número de botones aparecidos en los tratamientos con diferentes concentraciones de NaCl y el tratamiento control. Solo en las poblaciones pV, en 50 mM y pL en 100 y 150 mM se observó un número mayor de botones florales que en el control (Fig. 2). Por lo que en general, se podría especular que la presencia de NaCl impide o disminuye la aparición de botones florales al encontrarse en menor número que el control. Previamente, en un estudio similar con poblaciones de *C. quitensis* donde se evaluó el efecto de NaCl a 0, 50 y 150 mM, se observó un incremento significativo de botones y ápices florales en directa relación con la concentración de la sal en pPA y pC (población Conguillío, Parque Nacional Conguillío, Región de La Araucanía), siendo mayor y desde los 30 días de

exposición en pPA (Castel, 2015). Esta ambigüedad en los resultados sugiere que deben profundizarse las investigaciones de estas variables durante la optimización de protocolos de cultivo de tejidos en la especie y sus poblaciones. Por otro lado, se requiere determinar si las semillas que se producen en estas flores *in vitro* en presencia de diferentes concentraciones de NaCl son igualmente viables como en los casos observados en el laboratorio.

El porcentaje de mortalidad se mantuvo bajo en todos los tratamientos salinos, menor al 6%, y con respecto a los controles. La población pA presentó un mayor porcentaje de mortalidad en el control seguido por pV a partir del día 30 (Fig. 3). La mortalidad observada en las diferentes poblaciones parece estar más asociada a las condiciones del cultivo de tejidos que al tratamiento de salinidad. En estudios previos Castel (2015), evaluó la muerte de plántulas de *C. quitensis*, en donde en ninguna de las poblaciones estudiadas (pC, pPA y pPar- La Parva, Cerro La Parva, Región Metropolitana) se observó muerte de plantas ni necrosis a pesar del amarillamiento que presentaban a los 90 días del ensayo salino (concentración máxima utilizada 150mM). A partir de estos resultados, con mayor mortalidad en los controles que en las plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl, se podría especular que la presencia de salinidad mejora el desempeño de la especie.

Aunque se observa cierta tendencia al aumento de la clorosis (en porcentaje) con el incremento de la concentración de NaCl, es relevante el hecho de que en las plantas controles de todas las poblaciones, se observan un alto número de plantas con 50% de clorosis (Fig. 4), Por lo que con esta variable no puede establecerse una relación directa con el incremento de la salinidad. Castel (2015), aunque también observó un incremento de la clorosis (amarillamiento) con el paso del tiempo y con las concentraciones de NaCl evaluadas, tampoco pudo establecer una relación directa con la salinidad. La clorosis observada podría estar más asociada a las condiciones y respuesta de la especie al cultivo de tejidos que a efectos por el tratamiento con salinidad. Según lo descrito por Lu et al. (2022) , las hojas cloróticas a menudo son inducidas por la acumulación excesiva de iones Na^+ y la falta de iones K^+ en las hojas lo cual es causado por el estrés salino. Otra de las razones por las que se genera el amarillamiento en las hojas y principalmente en la base de las hojas es debido a la acumulación de Na^+ y Cl^- en esas dos regiones (Gebauer et al.,

2004). Previamente, se ha informado que esta especie presenta altos porcentajes de clorosis en cultivo *in vitro*, situación que se ha mejorado con el uso de tiosulfato de plata (STS) en el medio de cultivo (Cuba-Díaz et al. 2014).

La población pA evidenció los mayores efectos negativos en su crecimiento en presencia de la mayor concentración de NaCl (200mM), con una disminución significativa en su biomasa (Fig. 7.a) y en la longitud foliar (Fig. 5.a), no mostró diferencias significativas respecto del control y las otras concentraciones evaluadas en la longitud radicular (Fig.6.a). La población pV mostró una disminución significativa en su biomasa en las concentraciones de 100mM y 150mM de NaCl (Fig. 7.e) y en la longitud foliar en presencia de 200 mM de NaCl (Fig. 5.e), pero no mostró diferencias significativas en la longitud radicular en ninguno de los tratamientos. La población pH mostró un incremento significativo en su biomasa en las concentraciones 150 y 200 mM (Fig. 7.b), en cambio en esas mismas concentraciones se observó una disminución significativa en su longitud radicular (Fig. 6.b). En cambio, las poblaciones pL y pPA muestran tendencia a ser favorecidas significativamente en estas variables de su crecimiento, principalmente en concentraciones más bajas de salinidad, pero sin presentar diferencias significativas con respecto al control.

A diferencia de las variables hasta ahora analizadas, estas 3 variables; biomasa, longitud foliar y radicular, nos permiten establecer cierto criterio para definir orden de tolerancia al NaCl en las poblaciones estudiadas, mostrándose que bajo estas condiciones experimentales, las poblaciones antárticas (pA y pH), muestran menor tolerancia que las poblaciones magallánicas, y dentro de este grupo, aparentemente las poblaciones pL y pPA presentan la mayor capacidad de tolerar la salinidad respecto de pV. Pero más estudios y la determinación de otras variables bioquímicas y moleculares podrían entregar mayores antecedentes sobre los mecanismos de tolerancia de estas poblaciones y especie. Castel (2015), igualmente observó respuestas diferenciales entre las poblaciones estudiadas, pPA mostró valores significativamente más altos de biomasa, longitud radicular y foliar después de 90 días sometida a concentraciones bajas (50 mM), y mantuvo valores sin diferencias al control a 150 mM, por su parte, pPar no mostró diferencias en ninguno de los tratamientos evaluados, pero pC mostró disminución significativa en estas variables a 150 mM de NaCl. Esta misma autora, observó que la tolerancia a la salinidad además de estar relacionada

con la tasa de crecimiento afectó la tasa fotosintética, la cual disminuyó a altas concentraciones de salinidad en la población más afectada (pC). Según Tuteja (2007), cuando las concentraciones de NaCl se encuentran sobre los 100mM, se genera una inhibición de crecimiento debido a que las concentraciones son tóxicas para el metabolismo celular. En un estudio similar, pero en condiciones de jardín común, Klagges (2015) evaluó el efecto de la salinidad (0, 50 y 150 mM) de NaCl, encontró tendencias similares a las obtenidas en este trabajo y a lo informado por Castel (2015). La población pPA pareció ser favorecida con las concentraciones más bajas de NaCl y sin diferencias significativas entre el control y 150 mM de NaCl, pPar no mostró variaciones en ninguna de las variables morfo-fisiológicas analizadas, pC mostró efectos significativamente negativos en algunas de las variables y pA mostró los mayores efectos negativos en su crecimiento, aunque con respuestas bioquímicas que dan cuenta de mecanismos de adaptación a la condición de salinidad y una alta capacidad de recuperación después de ser excluida de la presencia de salinidad. Estos resultados sugieren la necesidad de aumentar las concentraciones de NaCl para determinar el límite de tolerancia de las diferentes poblaciones y que se requiere el análisis de otras variables bioquímicas y moleculares que permitan mejorar la comprensión sobre los mecanismos de adaptación de la especie y sus poblaciones.

La relación el sodio (Na^+) / potasio (K^+) es un factor importante que influye en la tolerancia de las plantas a la salinidad. Las plantas tolerantes a la sal difieren de las sensibles a la sal en que poseen una baja tasa de transporte de Na^+ / K^+ a las hojas, y tienen la capacidad de compartimentar estos iones en vacuolas para así evitar la toxicidad iónica por sales (Munns, 2002). La acumulación de iones Na^+ principalmente en las hojas, disminuye la relación K^+ / Na^+ , y una baja concentración citosólica de K^+ / Na^+ inhibe la actividad enzimática y la síntesis de proteínas (Machado y Serralheiro, 2017). En cambio, en las plantas sensibles a la salinidad, se ha observado una relación Na^+ / K^+ más alta, ya que hay una mayor acumulación de Na^+ en las hojas y una menor capacidad de transportar iones K^+ . En todas las poblaciones estudiadas se observó un incremento en el contenido de iones Na^+ directamente relacionado con el incremento de la concentración de NaCl en el medio de cultivo (Fig. 8). Dentro de todas las poblaciones pV mostró los más altos contenidos de iones K^+ , los cuales no variaron con el incremento del contenido de iones Na^+ , similar

comportamiento se observó en pL y pPA, mientras que en las poblaciones antárticas si se pudo observar una disminución en el contenido de iones K^+ directamente proporcional al incremento del contenido de iones Na^+ , llegando a observarse relaciones Na^+/K^+ igual o menor a 1 (Fig. 8). Estos análisis, aunque preliminares y que solo muestran tendencias, permiten reafirmar que las poblaciones magallánicas parecen tolerar mejor la salinidad, pero abre nuevas interrogantes sobre la población pV, que, aun mostrando efectos negativos en su crecimiento en presencia de altas concentraciones de NaCl, no presenta alteraciones en los contenidos de K^+ en presencia de altas concentraciones de NaCl.

7.2 Experimento 2: Ensayo de tolerancia a concentraciones altas de NaCl.

Los resultados obtenidos a partir del experimento 1, si bien permitieron especular sobre ciertas tendencias a tolerar mejor la salinidad en unas poblaciones más que otras, ofrecen una interrogante con relación a cuánto más podrían tolerar las poblaciones en estudio de *C. quitensis*. A partir de esto, se decidió realizar un segundo ensayo con plantas *in vitro* aumentando las concentraciones de salinidad a las que fueron sometidas (200, 300 y 400 mM de NaCl). Debido a la falta de material vegetal, este ensayo se realizó con 3 poblaciones (pH, pPA y pV), teniendo una población representativa de cada zona geográfica estudiada anteriormente. No se cuenta con antecedentes de estudios de salinidad en esta especie con concentraciones tan elevadas de NaCl.

La mortalidad de los tejidos en condiciones de salinidad puede estar asociadas el equilibrio Na^+/K^+ . Las plantas más sensibles no pueden controlar el transporte de Na^+ ; por lo que, grandes cantidades de este ion se translocan al brote induciendo la muerte de la planta (Maathuis, 2014; Roy et al., 2014) y la regulación de la homeostasis de K^+ es esencial para la adaptación de la planta al estrés biótico y abiótico. pH y pPA presentaron un 8% de mortalidad de plantas, lo que equivale a 1 planta en la concentración de 400mM (Tabla 3). Pero esos resultados no explican una relación directa de este resultado con la aplicación de concentraciones más altas de NaCl.

La población pH es la única que muestra un incremento de la clorosis en relación directa con el incremento de la concentración de NaCl (Fig. 9.a). Por su parte, pPA presenta mayor clorosis en general, pero sin relación con las concentraciones salinas (Fig. 9.b), lo que podría estar más asociado con la respuesta de ésta al cultivo de tejidos. pV presentó menor

porcentaje de clorosis donde solo se registraron plantas con hasta un 25% de clorosis (Fig. 9.c). Esto podría deberse a que la planta posee una capacidad para mantener la homeostasis de los iones, lo que provoca que no se acumulen iones Na^+ en las hojas, por consiguiente, que no se presente amarillamiento (Roy et al., 2014).

La población pPA mostró un incremento significativo en su biomasa foliar y radicular en 200 y en 300 mM de NaCl, respectivamente (Fig. 11.b y 12.b) y aunque no mostró diferencias significativas, también se observó una tendencia a un mayor desarrollo radicular a una concentración de 300 mM de la sal (Fig. 10.b). pH presentó un aumento de la biomasa foliar a los 200 y 300 mM, en cambio, tanto la biomasa como la longitud radicular se vieron afectados significativamente con el incremento en la concentración de NaCl (Figs. 12.a y 13.a). En este experimento y respecto de estas variables, pV mostró el peor desempeño con valores significativamente negativos tanto en la biomasa como en la longitud radicular en presencia de la sal (Figs. 12.c y 13.c), aunque no mostró diferencias significativas en la biomasa foliar. Esto podría estar asociado a que el estrés por salinidad induce un estrés osmótico e iónico que conduce a un crecimiento retardado en términos de longitud del tallo y raíz, peso fresco y seco (Abbas et al., 2015). Según lo descrito por Batista-Sánchez et al. (2019), la disminución en la capacidad de absorber nutrientes y agua (impuestos por la salinidad), restringe el crecimiento y desarrollo del área foliar, lo que afecta la producción de biomasa total de la planta. En un estudio realizado por Mazón Suástegui et al. (2018), a medida que aumentaban las concentraciones de NaCl se evidenció una disminución en la biomasa fresca de la parte aérea en plántulas de dos variedades de albahaca (Napoletano y Emily).

Para observar si existía alguna relación entre los efectos sobre el crecimiento y la capacidad fotosintéticas en estas plantas en presencia de altas concentraciones salinas, en este ensayo se evaluó F_v/F_m que mide la eficiencia de la captura de luz en el fotosistema II (PSII) y la eficiencia del transporte de electrones en el sistema fotosintético general y PI que evalúa la eficiencia del transporte de electrones en el PSII de la fotosíntesis. La primera variable (F_v/F_m) no evidenció diferencias significativas para ningún tratamiento ni población (Fig. 13). En cambio, en la evaluación de PI si se observó una disminución significativa para pV respecto al control (Fig. 14.c). Tanto el índice de rendimiento fotosintético (PI) como el

cociente de la eficiencia fotosintética (F_v/F_m) son indicadores indirectos del rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII) (Torressi et al., 2014). Gupta (2019), describe PI como la información combinada sobre el rendimiento de PSII y la reducción de los aceptores de electrones entre sistemas y la reducción de los aceptores finales de PSI. Strasser et al. (2004), describe el parámetro F_v/F_m como una reducción en la eficiencia fotoquímica de PSII y una perturbación o daño al aparato fotosintético, la cual ha sido utilizada para detectar alteraciones en el sistema fotosintético causadas por diferentes condiciones de estrés, tanto abióticos como bióticos. El que F_v/F_m se haya mantenido estable y PI haya variado puede deberse a que el estrés salino afecta la eficiencia del transporte de electrones en el PSII, disminuyendo el flujo de estos y aumentando la disipación de energía en forma de calor, lo que podría generar un impacto en PI al medir la eficiencia real del PSII en condiciones de luz variable

Este experimento, aunque con la debilidad de no poder incluir todas las poblaciones estudiadas en el experimento 1, nos permite avances en el conocimiento sobre tolerancia a la salinidad en *C. quitensis*. En primer lugar, que el límite de tolerancia a la salinidad (NaCl) de esta especie, en las poblaciones analizadas, supera los 400mM de NaCl. Segundo, que a pesar de que la población pV, hasta los 200mM mostró signos de ser más tolerante, al enfrentar concentraciones más elevadas, ve disminuido su desempeño y crecimiento. No obstante, más variables deben ser analizadas en respuesta a estas concentraciones y nuevos estudios que permitan evaluar el límite superior de tolerancia de la especie deben ser realizados.

7.3 Experimento 3: Evaluación de la tolerancia en plántulas recién germinadas.

Debido a que el experimento de salinidad solo se había probado en plantas provenientes de ensayos *in vitro*, se realizó un tercer experimento a partir de plántulas recién germinadas, para lo cual se colocaron a germinar semillas de las 5 poblaciones originales (pA, pH, pPA, pL y pV). De estas 5 poblaciones solo germinaron casi en un 100% plántulas de pPA y un porcentaje muy bajo de pL, en el resto de las poblaciones no se alcanzó un porcentaje de germinación suficiente para llevar a cabo el ensayo (Fig. A10). Esta variabilidad en el porcentaje de germinación de las mismas poblaciones en diferentes estudios puede estar asociada a las condiciones de recolección y almacenamiento de semillas previas a cada

estudio, así como a las condiciones que prevalecen durante la época de crecimiento (Cuba-Díaz et al., 2019) . Se ha sugerido que las semillas de *C. quitensis*, al menos en la Antártica, entran en un proceso de latencia secundaria, cuya liberación ocurre cuando las condiciones ambientales aseguran el crecimiento y desarrollo futuro (Gielwanowska et al., 2011).

Dentro de las evaluaciones que se realizaron al finalizar los 15 días del ensayo, se registró que el porcentaje de mortalidad fue mayor que en los ensayos anteriores debido a la concentración de NaCl que se utilizó y al tamaño de las plantas. En cuanto al porcentaje de clorosis, se observó mayormente en pPA, siendo el tratamiento de 300mM el que presentó más plantas con 100% de clorosis. pPA mostró un incremento significativo en la biomasa total entre todos los tratamientos respecto al control, en cambio en pL no hubo diferencias significativas en ningún tratamiento. En relación con el largo radicular, se observó congruencia con el ensayo 2, donde no se observaron diferencias significativas para ninguna de las 2 poblaciones. Este experimento, aunque no muy significativo, por la baja representatividad de poblaciones y el bajo n muestral, corrobora la tolerancia de la especie a la salinidad, aún en estados de desarrollo iniciales y que en pPA la aplicación de salinidad aparentemente favorece el crecimiento.

La tolerancia a la salinidad varía de unas plantas a otras, por lo que se han diferenciado 2 tipos en función a la tolerancia a la sal. Las halófitas son aquellas plantas resistentes o tolerantes a la sal y pueden completar su ciclo de vida en suelos que contengan más de 200 mM de NaCl (Meng et al., 2018). Generalmente se encuentran en el océano, en las zonas costeras, los bosques de manglares y las regiones desérticas, ya que sus características se adaptan evolutivamente para resistir la alta salinidad (Soundararajan et al., 2019) y las glicófitas son aquellas plantas afectadas por la salinidad e incapaces de soportar altas concentraciones salinas. Según Bose et al. (2015), para que una planta tolere la sal, esta debe tener la capacidad de regular la absorción de iones Na^+ y Cl^- mientras mantiene las concentraciones citoplasmáticas de iones K^+ y Mg^+ necesarias para la activación esencial de las enzimas.

De acuerdo con lo revisado en la literatura y con respecto a algunos resultados, se podrían categorizar a algunas poblaciones de *C. quitensis* como tolerantes a la salinidad y con algunas respuestas que podrían incluirlas dentro de las halófitas. Se requieren más estudios

y por el momento esperar los resultados bioquímicos que están en curso en el marco del proyecto de investigación donde se realizó esta investigación, para ver si se pueden definir dentro de las poblaciones estudiadas, mecanismos diferenciales de tolerancia a la salinidad asociados a adaptaciones al ambiente en habitan las diferentes poblaciones.



8 CONCLUSIONES

- En concentraciones salinas hasta 200mM hubo una reducción de la biomasa y crecimiento radicular de ambas poblaciones antárticas (pA y pH), por lo que se podría decir que toleran las altas concentraciones de salinidad, pero muestran algunos signos de sensibilidad, en cambio, bajo las mismas concentraciones salinas, las poblaciones magallánicas (pL, pPA y pV) toleraron mejor las concentraciones de NaCl, ya que aumentaron tanto su biomasa como su crecimiento radicular y foliar.
- Aparentemente, la presencia de iones Na^+ en el medio no afecta la absorción de iones K^+ en las poblaciones pV, pL y pPA, lo cual podría ser un indicador de que hay cierto mecanismo de tolerancia a la salinidad en estas poblaciones, ya que mantuvieron altas concentraciones de iones K^+ , las cuales no mostraron variación al aumentar la concentración de NaCl.
- Las poblaciones magallánicas pV, pL y pPA (costeras y no costeras), presentaron mayor tolerancia al aumentar la concentración salina a 400mM, en donde se apreció un mayor efecto en su desarrollo radicular.
- En concentraciones más altas de NaCl (hasta 400mM), la población pV mostró mayor sensibilidad incluso, más que la población antártica pH.
- Al analizar las plántulas en estado inicial (post germinación), se pudo corroborar que esta tolerancia se mantiene aún en estas condiciones.

Debido a esto, se rechaza parcialmente la hipótesis de este trabajo, ya que, dentro de las poblaciones de *C. quitensis* estudiadas no hay poblaciones sensibles y aparentemente, la población no costera (pV), no es más sensible que el resto de las poblaciones costeras, tal como se observa en el experimento 1.

Si bien los resultados nos indican una tendencia de hacia dónde se podrían catalogar las diferentes poblaciones de *C. quitensis* estudiadas, es necesario analizar los ensayos bioquímicos que quedaron en curso y, quizás, realizar algún estudio que involucre genes y concentraciones más altas de NaCl, para así tener una mejor visión de los mecanismos de

tolerancia a la salinidad de las poblaciones estudiadas y así poder catalogarlas con mayores bases en tolerantes o sensibles y quizás catalogar alguna de ellas como halófila.



9 BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, G., Saqib, M., Akhtar, J., & Haq, M. A. ul. (2015). Interactive effects of salinity and iron deficiency on different rice genotypes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 178, 306–311. <https://doi.org/10.1002/jpln.201400358>
- Acosta-Motos, J., Ortuño, M., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M., & Hernandez, J. (2017). Plant Responses to Salt Stress: Adaptive Mechanisms. *Agronomy*, 7, 18. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010018>
- Aguero, Y. (2018). *Hongos micorrízicos arbusculares como mitigadores del estrés salino: respuesta fisiológica, bioquímica y crecimiento de variedades de albahaca* [Tesis de Doctorado en Ciencias]. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C.
- Arriagada, P. (2016). *Cambios morfo-fisiológicos y del metabolismo en poblaciones de Colobanthus quitensis en respuesta a cloruro de sodio, iones cobre y frio*. [Tesis de Pregrado. Ing. en Biotecnología Vegetal]. Universidad de Concepción.
- Balkanlou, K., Müller, B., Cord, A., Panahi, F., Malekian, A., Jafari, M., & Egli, L. (2020). Spatiotemporal dynamics of ecosystem services provision in a degraded ecosystem: A systematic assessment in the Lake Urmia basin, Iran. *Science of The Total Environment*, 716, 137100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137100>
- Batista-Sanchez, D., Murillo Amador, B., Nieto-Garibay, A., Alcaraz-Meléndez, L., Troyo-Diéguez, E., Hernández-Montiel, L. G., Ojeda-Silvera, C. M., Mazón-Suástegui, J. M., & Aguero-Fernández, Y. M. (2019). Bioestimulante derivado de caña de azúcar mitiga los efectos del estrés por NaCl en *Ocimum basilicum* L. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 6, 297–306. <https://doi.org/10.19136/era.a6n17.2069>
- Bertini, L., Proietti, S., Fongaro, B., Holfeld, A., Picotti, P., Falconieri, G. & Caruso, C. (2022). Environmental Signals Act as a Driving Force for Metabolic and Defense Responses in the Antarctic Plant *Colobanthus quitensis*. *Plants*, 11(22), 3176. <https://doi.org/10.3390/plants11223176>

- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., Lai, D., Xie, Y., Shen, W., & Shabala, S. (2015). Rapid regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity is essential to salinity tolerance in two halophyte species, *Atriplex lentiformis* and *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany*, 115, 481–494. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu219>
- Castel, K. (2015). *Evaluacion de tolerancia a la salinidad (NaCl) de tres poblaciones de Colobanthus quitensis In-vitro* [Tesis de Pregrado. Ing. en Biotecnología Vegetal]. Universidad de Concepción.
- Castillejo, A. (2020). *Influencia del estrés salino en el crecimiento, intercambio gaseoso y pigmentos fotosintéticos de stevia (Stevia rebaudiana Bert.) bajo condiciones de invernadero en el caribe colombiano* [Trabajo de Pregrado, Universidad de Cordoba]. [https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/3378/Tesis%20Maest r%C3%ADa%20Angela.pdf?isAllowed=y&sequence=1](https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/3378/Tesis%20Maest%20r%C3%ADa%20Angela.pdf?isAllowed=y&sequence=1)
- Chapman, V. (1942). The new perspective in the halophytes. *The Quarterly Review of Biology*, 17, 291–311.
- Chourasia, K., Lal, M., Tiwari, R., Dev, D., Kardile, H., Patil, V., Kumar, A., Vanishree, G., Kumar, D., Bhardwaj, V., Meena, J., Mangal, V., Shelake, R., Kim, J., & Pramanik, D. (2021). Salinity Stress in Potato: Understanding Physiological, Biochemical and Molecular Responses. *Life*, 11, 545. <https://doi.org/10.3390/life11060545>
- Convey, P. (1996). Reproduction of Antarctic flowering plants. *Antarctic Science*, 8, 127–134. <http://journals.cambridge.org>
- Convey, P. (2012). Life at extremes: Environments, organisms and strategies for survival. *Polar terrestrial environments*. CABI, Oxfordshire, pp 81–102
- Convey, P., Chown, S., Clarke, A., Barnes, D., Bokhorst, S., Cummings, V., Ducklow, H., Frati, F., Green, T., Gordon, S., Griffiths, H., Howard-Williams, C., Huiskes, A., Laybourn-Parry, J., Lyons, W., McMinn, A., Morley, S., Peck, L., Quesada, A., Wall, D. H. (2014). The spatial structure of Antarctic biodiversity. *Ecological Monographs*, 84, 203–244. <https://doi.org/10.1890/12-2216.1>

- Cuba, M. (2011). El clavelito antártico y los mecanismos que lo protegen del frío polar. In *Bol Antártico Chileno* (Vol. 30, pp. 8–9).
- 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. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432014000100009>
- Cuba-Díaz, M., Acuña, D., & Fuentes-Lillo, E. (2019). Antarctic pearlwort (*Colobanthus quitensis*) populations respond differently to pre-germination treatments. *Polar Biology*, 42, 1209–1215. <https://doi.org/10.1007/s00300-019-02505-4>
- Cuba-Díaz, M., Castel, K., Acuña, D., Machuca, Á., & Cid, I. (2017). Sodium chloride effect on *Colobanthus quitensis* seedling survival and *in vitro* propagation. *Antarctic Science*, 29, 45–46. <https://doi.org/10.1017/S0954102016000432>
- Cuba-Díaz, M., Klagges, M., Fuentes-Lillo, E., Cordero, C., Acuña, D., Opazo, G., & Troncoso-Castro, J. (2017). Phenotypic variability and genetic differentiation in continental and island populations of *Colobanthus quitensis* (Caryophyllaceae: Antarctic pearlwort). *Polar Biology*, 40, 2397–2409. <https://doi.org/10.1007/s00300-017-2152-x>
- Dhindsa, R., Plumb-Dhindsa, P., & Reid, D. (1982). Leaf senescence and lipid peroxidation: Effects of some phytohormones, and scavengers of free radicals and singlet oxygen. *Physiologia Plantarum*, 56, 453–457. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb04539.x>
- English, J., & Colmer, T. (2013). Tolerance of extreme salinity in two stem-succulent halophytes (*Tecticornia* species). *Functional Plant Biology*, 40, 897. <https://doi.org/10.1071/FP12304>
- Flowers, T. (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55, 307–319. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh003>
- Flowers, T., Galal, H., & Bromham, L. (2010). Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology*, 37, 604. <https://doi.org/10.1071/FP09269>

- Flowers, T., & Timothy, D. (2008). Salinity Tolerance in Halophytes. *The New Phytologist*, 179, 945–963.
- Gallace, M. (2020). *Interacción Alfalfa-Ensifer meliloti: Respuesta al estrés salino* [Tesis de Magister en Producción agropecuaria en regiones semiaridas]. Universidad Nacional de La Pampa.
- García, M., García Molano, J., & Quito Martínez, C. (2018). Efecto de la salinidad por NaCl en el crecimiento y desarrollo de plantas de *Chenopodium quinoa* Willd. *Ciencia En Desarrollo*, 10, 19–29. <https://doi.org/10.19053/01217488.v10.n1.2019.8341>
- Gebauer, J., El-Siddig, K., Salih, A., & Ebert, G. (2004). *Tamarindus indica* L. seedlings are moderately salt tolerant when exposed to NaCl-induced salinity. *Scientia Horticulturae*, 103, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.04.022>
- Gianoli, E., Inostroza, P., Zúñiga-Feest, A., Reyes-Díaz, M., Cavieres, L., Bravo, L., & Corcuera, L. (2004). Ecotypic Differentiation in Morphology and Cold Resistance in Populations of *Colobanthus quitensis* (Caryophyllaceae) from the Andes of Central Chile and the Maritime Antarctic. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 36, 484–489.
- Gielwanowska, I., Bochenek, A., Gojlo, E., Gorecki, R., Kellemann, W., Pastorczyk, M., & Szczuka, E. (2011). Biology of generative reproduction of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. from King George Island, South Shetland Islands. *Polish Polar Research*, 32, 139–155.
- Grigore, M., Ivanescu, L., & Toma, C. (2014). *Halophytes: an integrative anatomical study*. (Springer).
- Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics*, 2014, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>
- Gupta, R. (2019). Tissue specific disruption of photosynthetic electron transport rate in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) under elevated temperature. *Plant Signaling & Behavior*, 14, 1601952. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1601952>

- Haider, S., Alexander, J., & Kueffer, C. (2011). Elevational distribution limits of non-native species: combining observational and experimental evidence. *Plant Ecology & Diversity*, 4, 363–371. <https://doi.org/10.1080/17550874.2011.637973>
- Hereme, R., Morales-Navarro, S., Ballesteros, G., Barrera, A., Ramos, P., Gundel, P. E., & Molina-Montenegro, M. A. (2020). Fungal Endophytes Exert Positive Effects on *Colobanthus quitensis* Under Water Stress but Neutral Under a Projected Climate Change Scenario in Antarctica. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00264>
- Hoffmann, A., Arroyo, M., Liberona, F., Muñoz, M., & Watson, J. (1998). Plantas Altoandinas en la Flora Silvestre de Chile. *Ediciones Fundacion Claudio Gay*.
- Isayenkov, S., & Maathuis, F. (2019). Plant salinity stress: Many unanswered questions remain. *Frontiers in Plant Science*, 10, 80. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>
- Ismail, A. & Horie, T. (2017). Genomics, Physiology, and Molecular Breeding Approaches for Improving Salt Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 405–434. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040936>
- Ivushkin, K., Bartholomeus, H., Bregt, A., Pulatov, A., Kempen, B. & de Sousa, L. (2019). Global mapping of soil salinity change. *Remote Sensing of Environment*, 231, 111260. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2019.111260>
- Joyce, S., Cassells, A., & Mohan Jain, S. (2003). Stress and aberrant phenotypes *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74, 103–121. <https://doi.org/10.1023/A:1023911927116>
- Kaleem, F., Shabir, G., Aslam, K., Rasul, S., Manzoor, H., Shah, S., & Khan, A. (2018). An Overview of the Genetics of Plant Response to Salt Stress: Present Status and the Way Forward. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186, 306–334. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2738-y>
- Khan, M., Gemenet, D. & Villordon, A. (2016). Root System Architecture and Abiotic Stress Tolerance: Current Knowledge in Root and Tuber Crops. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01584>

- Klagges, M. (2015). "Evaluación de tolerancia al estrés salino en diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Cariophyllaceae)" [Tesis de pregrado. Ing. en Biotecnología Vegetal]. Universidad de Concepción.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2383-5>
- Kotagiri, D. & Kolluru, V. (2017). Effect of Salinity Stress on the Morphology & Physiology of Five Different Coleus Species. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 10, 1639–1649.
- Kumar, V., Wani, S., Penna, S. & Phan, L.-S. (2018). *Salinity Responses and Tolerance in Plants, Volume 1 Targeting Sensory, Transport and Signaling Mechanisms* (1st ed., Vol. 1). Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-75671-4>
- Liang, W., Ma, X., Wan, P. & Liu, L. (2018). Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495, 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.043>
- Liu, L., Nakamura, Y., Taliman, N., Sabagh, A., Moghaieb, R. & Saneoka, H. (2020). Differences in the Growth and Physiological Responses of the Leaves of *Peucedanum japonicum* and *Hordeum vulgare* Exposed to Salinity. *Agriculture*, 10, 317. <https://doi.org/10.3390/agriculture10080317>
- Lu, X., Ma, L., Zhang, C., Yan, H., Bao, J., Gong, M., Wang, W., Li, S., Ma, S. & Chen, B. (2022). Grapevine (*Vitis vinifera*) responses to salt stress and alkali stress: transcriptional and metabolic profiling. *BMC Plant Biology*, 22, 528. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03907-z>
- Maathius, F. (1999). K⁺ Nutrition and Na⁺ Toxicity: The Basis of Cellular K⁺/Na⁺ Ratios. *Annals of Botany*, 84, 123–133. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.0912>
- Maathuis, F. (2014). Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *Journal of Experimental Botany*, 65, 849–858. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert326>

- Machado, R. & Serralheiro, R. (2017). Soil Salinity: Effect on Vegetable Crop Growth. Management Practices to Prevent and Mitigate Soil Salinization. *Horticulturae*, 3, 30. <https://doi.org/10.3390/horticulturae3020030>
- Mazón, J., Murillo, B., Batista, D., Agüero, Y., García, M. & Ojeda, C. (2018). *Natrum muriaticum* como atenuante de la salinidad (NaCl) en albahaca (*Ocimum basilicum* L.). *Nova Scientia*, 10, 120–136. <https://doi.org/10.21640/ns.v10i21.1423>
- Meng, X., Zhou, J. & Sui, N. (2018). Mechanisms of salt tolerance in halophytes: current understanding and recent advances. *Open Life Sciences*, 13, 149–154. <https://doi.org/10.1515/biol-2018-0020>
- Minhas, P., Ramos, T., Ben-Gal, A. & Pereira, L. (2020). Coping with salinity in irrigated agriculture: Crop evapotranspiration and water management issues. *Agricultural Water Management*, 227, 105832. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.105832>
- Molina-Montenegro, M., Torres-Díaz, C., Carrasco-Urra, F., González-Silvestre, L. & Gianoli, E. (2012) Plasticidad fenotípica en dos poblaciones antárticas de *Colobanthus quitensis* (Caryophyllaceae) bajo un escenario simulado de cambio global. *Gayana Botánica*. 69: 152–160
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25, 239–250. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>
- Munns, R. & Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473–497.
- Okur, B. & Örcen, N. (2020). Soil salinization and climate change. In *Climate Change and Soil Interactions* (pp. 331–350). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818032-7.00012-6>

- Pisano, E. (1972). Comunidades vegetales del área de Bahía Morris, Isla Capitán Aracena, Tierra del Fuego (Parque Nacional “Hernando de Magallanes”). *Anales Del Instituto de La Patagonia*, *III*, 104–130.
- Pisano, E. (1976). Cormófitos acuáticos de Magallanes. *Anales Del Instituto de La Patagonia*, *7*, 115–136.
- Pisano, E. (1988). Sectorización fitogeográfica del Archipiélago sudpatagónico-fueguino: II. Vegetación y flora vascular del área Parque Nacional “Laguna San Rafael”, Aysen (Chile). In *Ans. Inst Pat.* (Vol. 18, pp. 05–18).
- Rahman, M., Mostofa, M., Keya, S., Siddiqui, M., Ansary, M., Das, A., Rahman, M. & Tran, L. (2021). Adaptive Mechanisms of Halophytes and Their Potential in Improving Salinity Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*, 10733. <https://doi.org/10.3390/ijms221910733>
- Rahneshan, Z., Nasibi, F. & Moghadam, A. A. (2018). Effects of salinity stress on some growth, physiological, biochemical parameters and nutrients in two pistachio (*Pistacia vera* L.) rootstocks. *Journal of Plant Interactions*, *13*, 73–82. <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1424355>
- Rajaniemi, T. y Barrett, D. (2018). Las respuestas de germinación al estrés abiótico dan forma a las distribuciones de especies en las dunas costeras. *Ecología vegetal*, *219*, 1271-1282. <https://doi.org/10.1007/s11258-018-0877-4>
- Robin, A., Matthew, C., Uddin, M. & Bayazid, K. (2016). Salinity-induced reduction in root surface area and changes in major root and shoot traits at the phytomer level in wheat. *Journal of Experimental Botany*, *67*, 3719–3729. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw064>
- Roy, S., Negrão, S. & Tester, M. (2014). Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*, *26*, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.004>
- Saéz, P., Cavieres, L., Sanhueza, C. & Bravo, L. (2019). Plantas vasculares antárticas: su ecofisiología en respuesta al clima antártico y posible implicancias del cambio climático. In *El cambio climático y la biología funcional de los organismos* (Ediciones UC, pp. 0–224).

- Saldaña, T., Bejarano, C. & Guaqueta, S. (2017). Efecto de la salinidad en el crecimiento de plantas de tomate tipo chonto. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11, 329–342. <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i2.7347>
- Sánchez-Bernal, E., Ortega-Escobar, H., Muñoz-Hernández, E., Can-Chulim, Á., Ortega-Baranda, V. & Ochoa-Somuano, J. (2020). Growth of seedlings of *Tabebuia rosea* and *Gliricidia sepium* under hydrochloric salinity conditions. *Terra Latinoamericana*, 38, 347–359. <https://doi.org/10.28940/TERRA.V38I2.608>
- Santos, J., Al-Azzawi, M., Aronson, J. & Flowers, T. (2016). eHALOPH a Database of Salt-Tolerant Plants: Helping put Halophytes to Work. *Plant and Cell Physiology*, 57, e10–e10. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv155>
- Sarker, U., Islam, Md. T. & Oba, S. (2018). Salinity stress accelerates nutrients, dietary fiber, minerals, phytochemicals and antioxidant activity in *Amaranthus tricolor* leaves. *PLOS ONE*, 13, e0206388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206388>
- Shabala, S. & Munns, R. (2017). Salinity stress: physiological constraints and adaptive mechanisms. In *Plant stress physiology* (pp. 24–63). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781780647296.0024>
- Sharif, I., Aleem, S., Farooq, J., Rizwan, M., Younas, A., Sarwar, G. & Chohan, S. (2019). Salinity stress in cotton: effects, mechanism of tolerance and its management strategies. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25, 807–820. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00676-2>
- 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.
- Singh, J., Singh, R. & Khare, R. (2018). Influence of climate change on Antarctic flora. *Polar Science*, 18, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2018.05.006>

- Smith, R., Huiskes, A., Gieskes, W., Rozema, J., Schoro, R., Van der vies, S. & Wolff, W. (2003). The enigma of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* in Antarctica. *Antartic Biol*, 2, 34–239.
- Soundararajan, P., Manivannan, A. & Jeong, B. (2019). *Different Antioxidant Defense Systems in Halophytes and Glycophytes to Overcome Salinity Stress* (pp. 335–347). https://doi.org/10.1007/978-3-030-04417-6_20
- Strasser, R., Tsimilli-Michael, M. & Srivastava, A. (2004). Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. In *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis* (pp. 321–362). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12
- Talat, N. (2020). Alleviation of soil salinization and the management of saline soils, climate change, and soil interactions. In *Climate Change and Soil Interactions* (pp. 305–329). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818032-7.00011-4>
- Tang, X., Mu, X., Shao, H., Wang, H. & Brestic, M. (2015). Global plant-responding mechanisms to salt stress: physiological and molecular levels and implications in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35, 425–437. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.889080>
- Tiwari, R., Bashyal, B., Shanmugam, V., Lal, M., Kumar, R., Sharma, S., Vinod, Gaikwad, K., Singh, B. & Aggarwal, R. (2021). Impact of Fusarium dry rot on physicochemical attributes of potato tubers during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 181, 111638. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111638>
- Tiwari, R., Lal, M., Kumar, R., Chourasia, K., Naga, K., Kumar, D., Das, S. & Zinta, G. (2021). Mechanistic insights on melatonin-mediated drought stress mitigation in plants. *Physiologia Plantarum*, 172, 1212–1226. <https://doi.org/10.1111/ppl.13307>
- Torres-Díaz, C., Gallardo-Cerda, J., Lavin, P., Oses, R., Carrasco-Urra, F., Atala, C., Acuña-Rodríguez, I., Convey, P. & Molina-Montenegro, M. (2016). Biological Interactions and Simulated Climate Change Modulates the Ecophysiological Performance of *Colobanthus quitensis* in the Antarctic Ecosystem. *PLOS ONE*, 11, e0164844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164844>

- Torressi, Yonny, Nazareno, Galmarini & Bouzo, (2014). Eficiencia fotoquímica máxima e índice de potencial fotosintético en plantas de melón (*Cucumis melo*) tratadas con bajas temperaturas. *Revista FAVE-Ciencias Agrarias*, 13.
- Tuteja, N. (2007). *Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants* (pp. 419–438). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28024-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28024-3)
- Wang, M., Zhao, X., Xiao, Z., Yin, X., Xing, T. & Xia, G. (2016). A wheat superoxide dismutase gene TaSOD2 enhances salt resistance through modulating redox homeostasis by promoting NADPH oxidase activity. *Plant Molecular Biology*, 91, 115–130. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0446-y>
- Zhang, H., Zhang, Q., Zhai, H., Li, Y., Wang, X., Liu, Q. & He, S. (2017). Transcript profile analysis reveals important roles of jasmonic acid signalling pathway in the response of sweet potato to salt stress. *Scientific Reports*, 7, 40819. <https://doi.org/10.1038/srep40819>
- Zhang, J. & Shi, H. (2013). Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance. *Photosynthesis Research*, 115, 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9813-6>
- Zhao, C., Zhang, H., Song, C., Zhu, J. & Shabala, S. (2020). Mechanisms of Plant Responses and Adaptation to Soil Salinity. *The Innovation*, 1, 100017. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2020.100017>
- Zörb, C., Geilfus, C. & Dietz, K. (2019). Salinity and crop yield. *Plant Biology*, 21, 31–38. <https://doi.org/10.1111/plb.12884>

10 ANEXOS

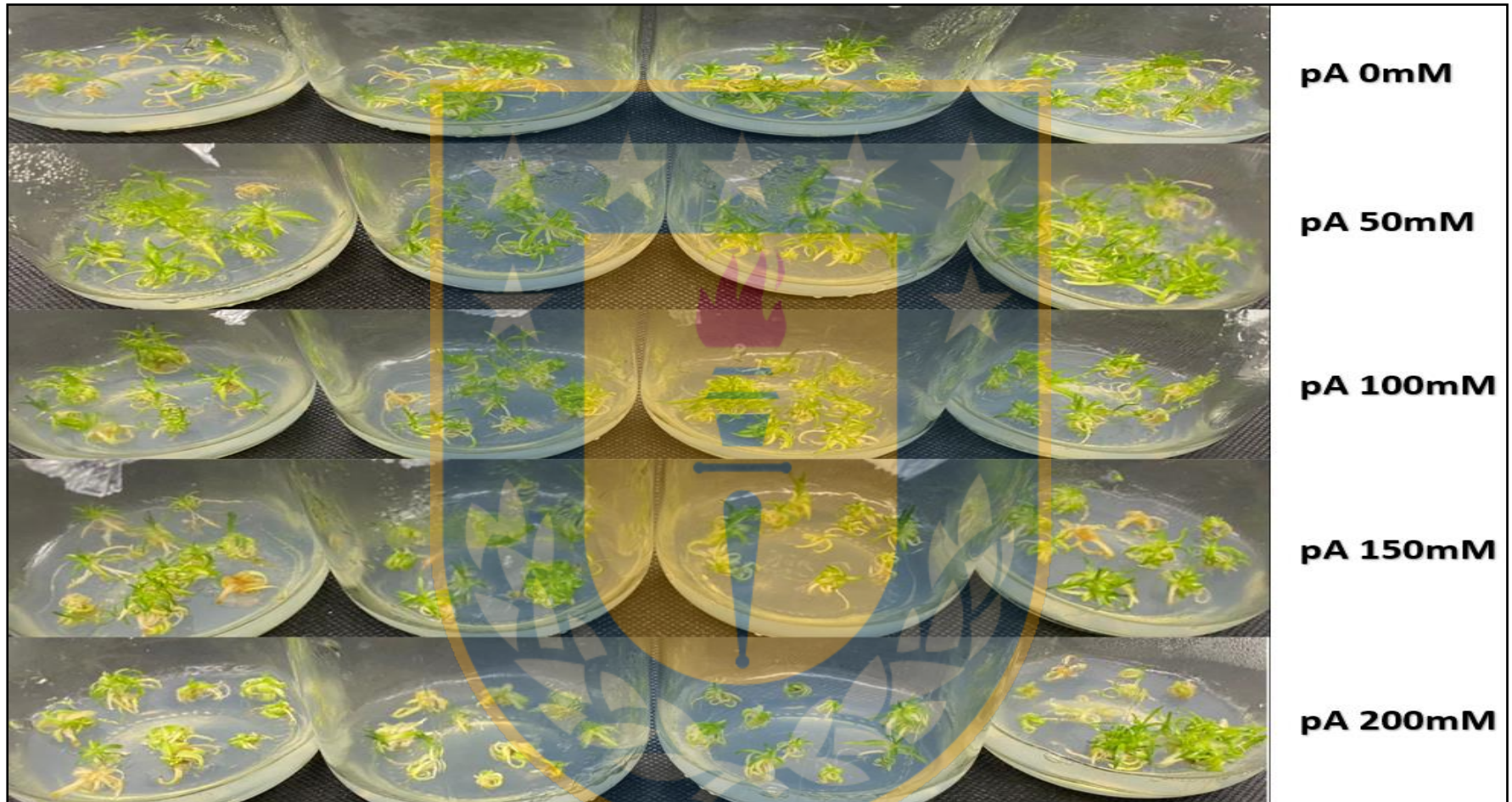


Figura Anexo 1: Registro fotográfico población Arctowski (pA) para determinación de clorosis en evaluaciones morfo-fisiológicas de 5 poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM).

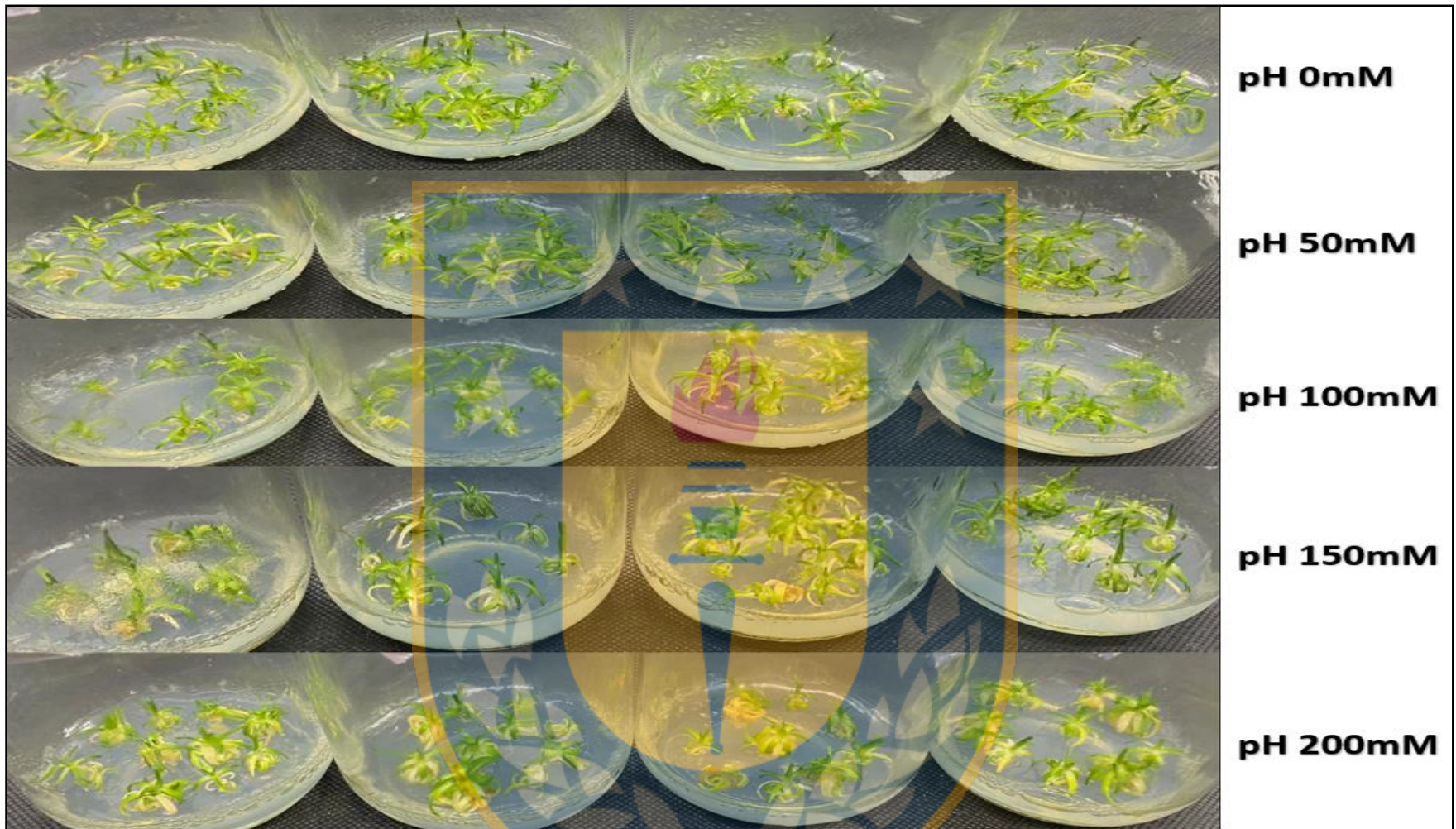


Figura Anexo 2: Registro fotográfico población Punta Hannah (pH) para determinación de clorosis en evaluaciones morfo-fisiológicas de 5 poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM).

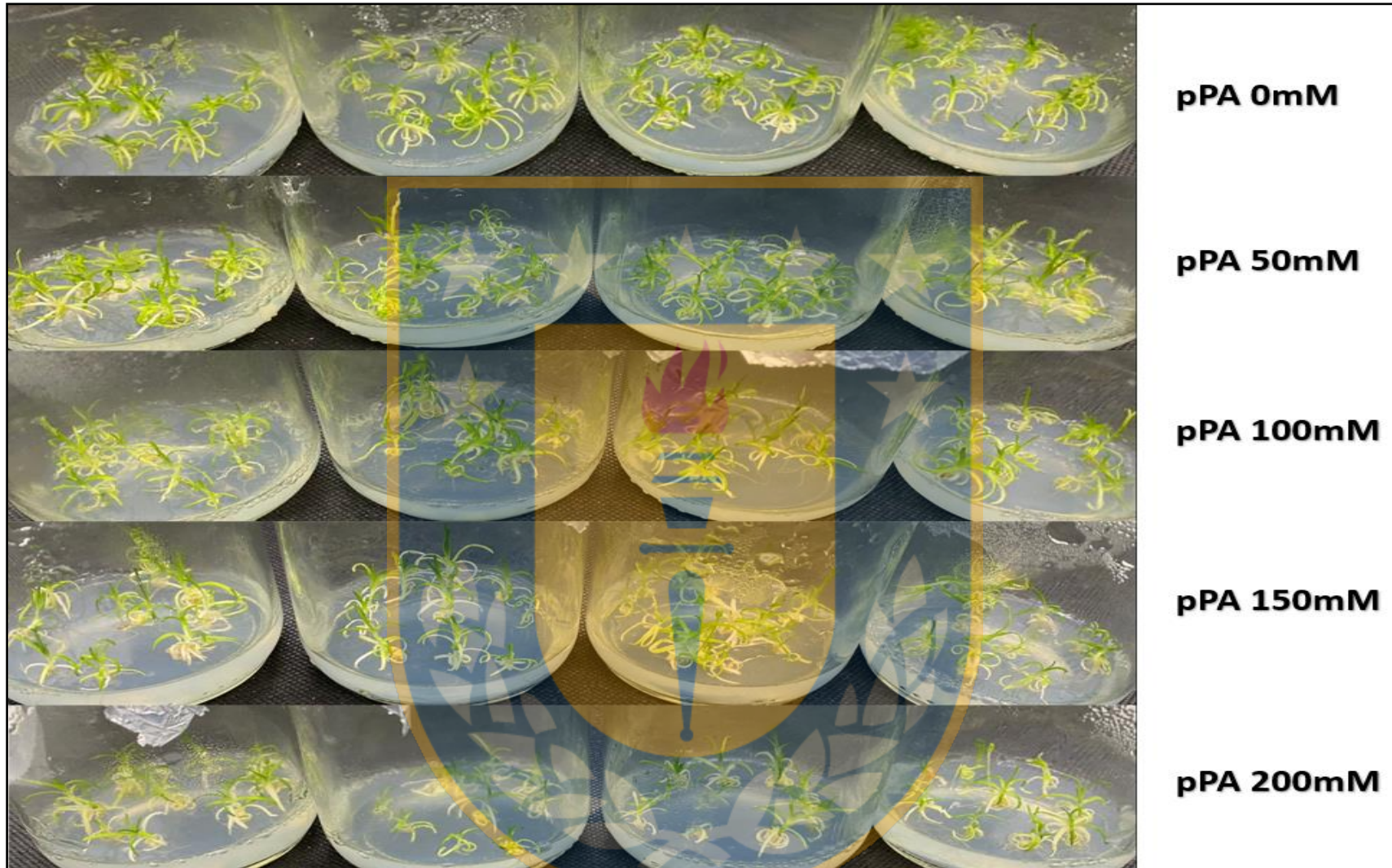


Figura Anexo 3: Registro fotográfico población La Marisma (pPA) para determinación de clorosis en evaluaciones morfo-fisiológicas de 5 poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM).

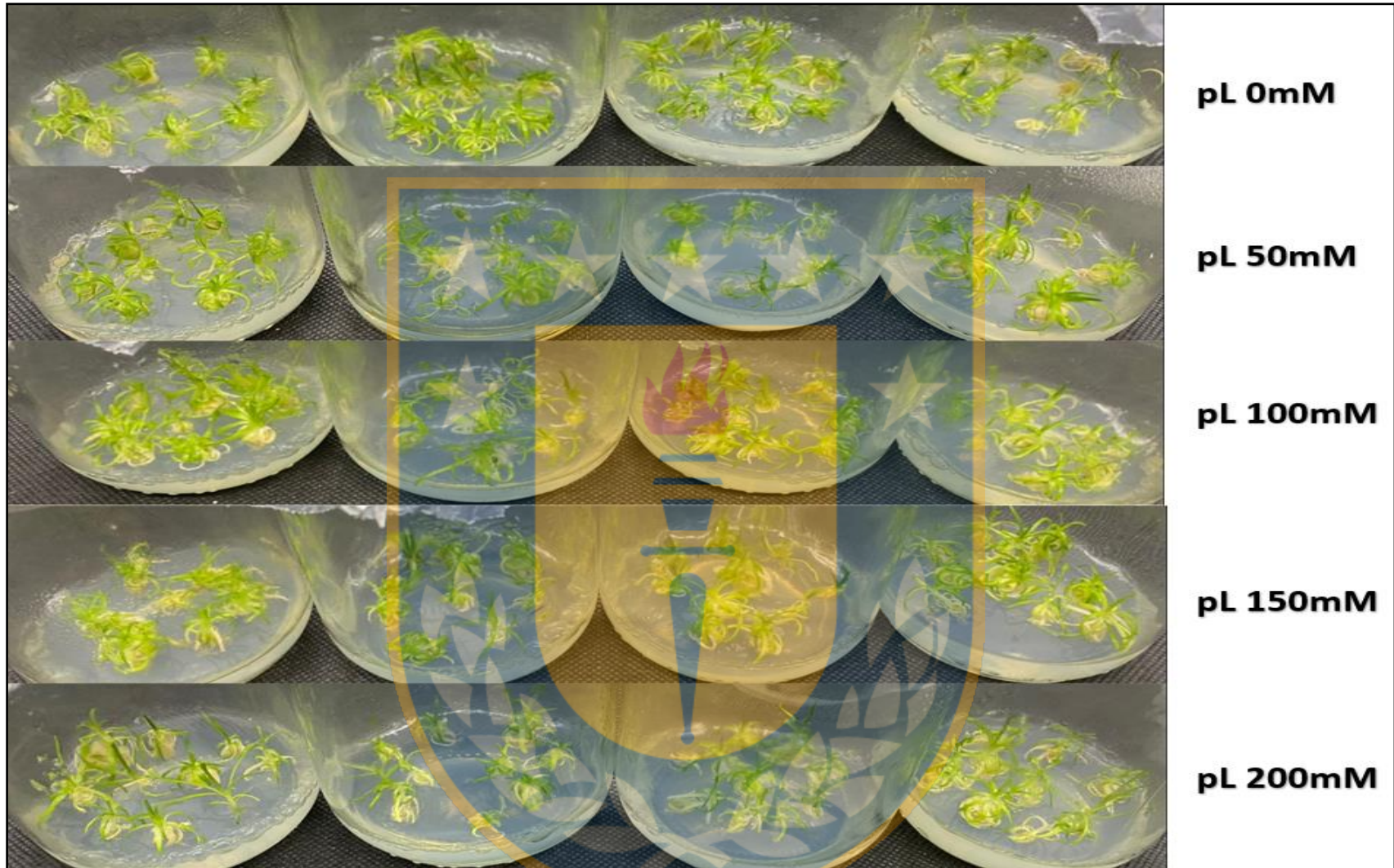


Figura Anexo 4: Registro fotográfico población Laredo (pL) para determinación de clorosis en evaluaciones morfo-fisiológicas de 5 poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM).

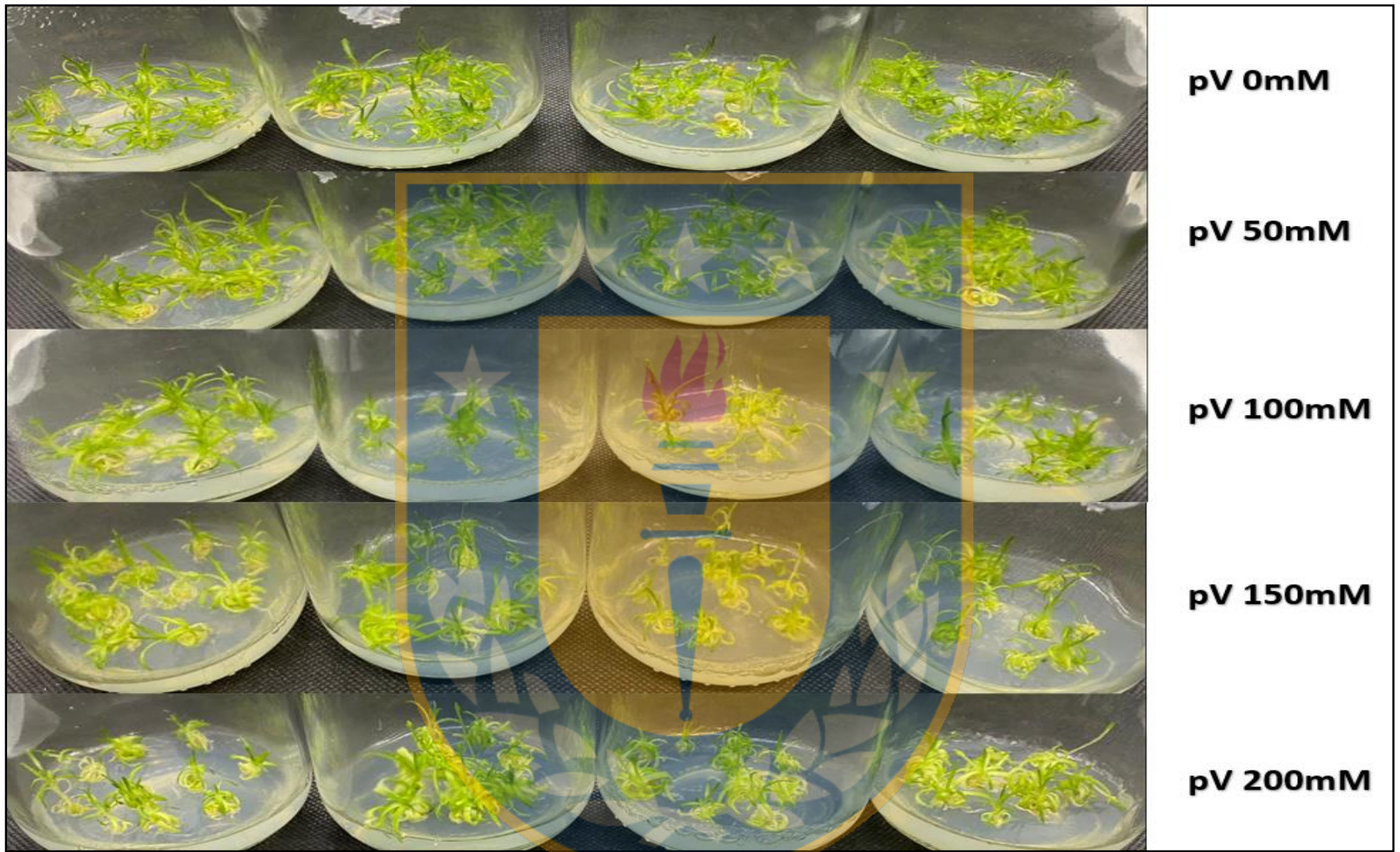


Figura Anexo 5: Registro fotográfico población La Vega (pV) para determinación de clorosis en evaluaciones morfo-fisiológicas de 5 poblaciones de *Colobanthus quitensis* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM).



Figura Anexo 6: Presencia de semillas viables germinando en botones florales de *Colobanthus quitensis* propagado *in vitro*.

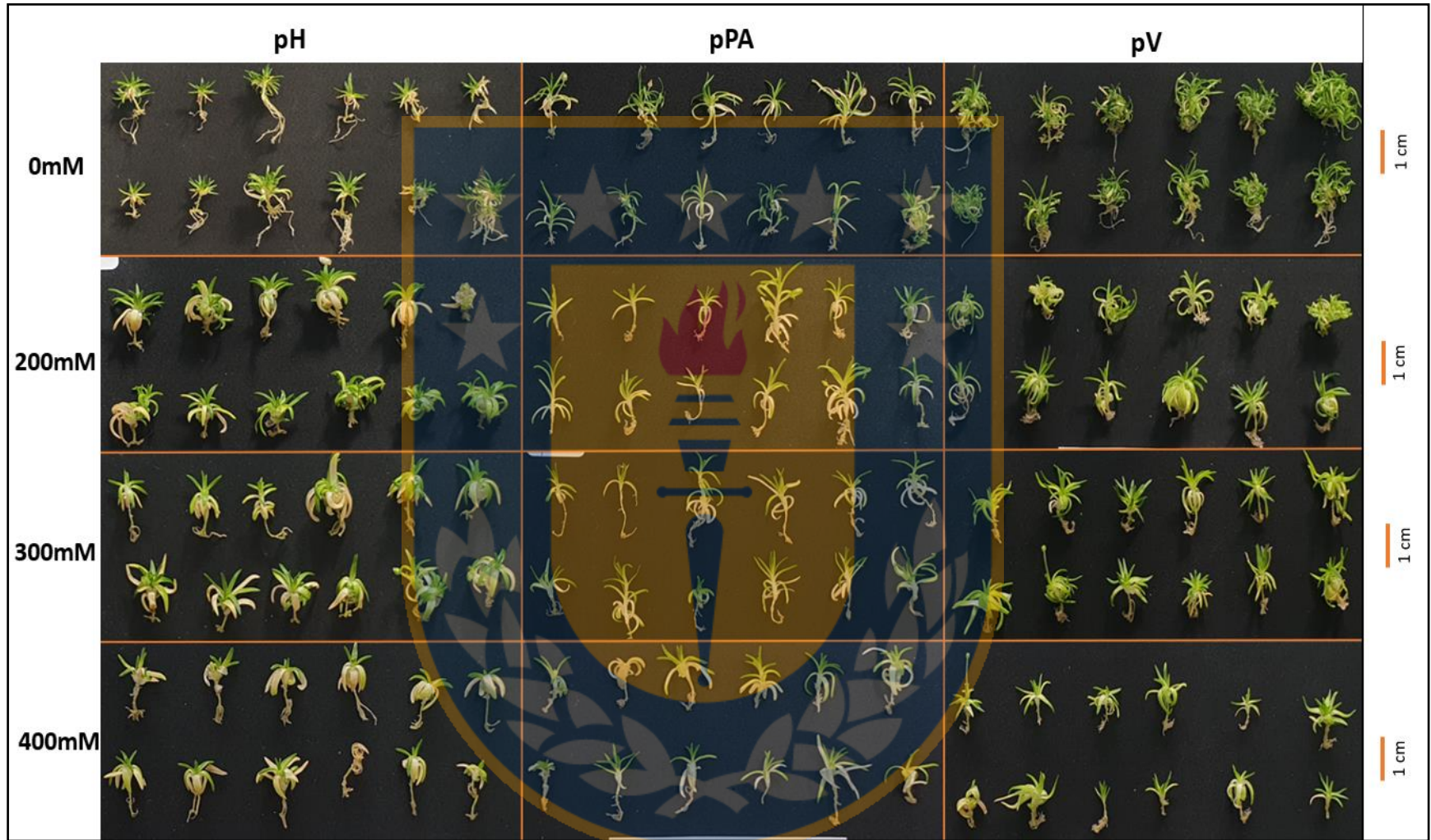


Figura Anexo 7: Registro fotográfico de ensayo de tolerancia a NaCl con 3 poblaciones de *Colobanthus quitensis in vitro*. **pH.** Población Punta Hannah; **pPA.** Población La Marisma; **pV.** Población La Vega.

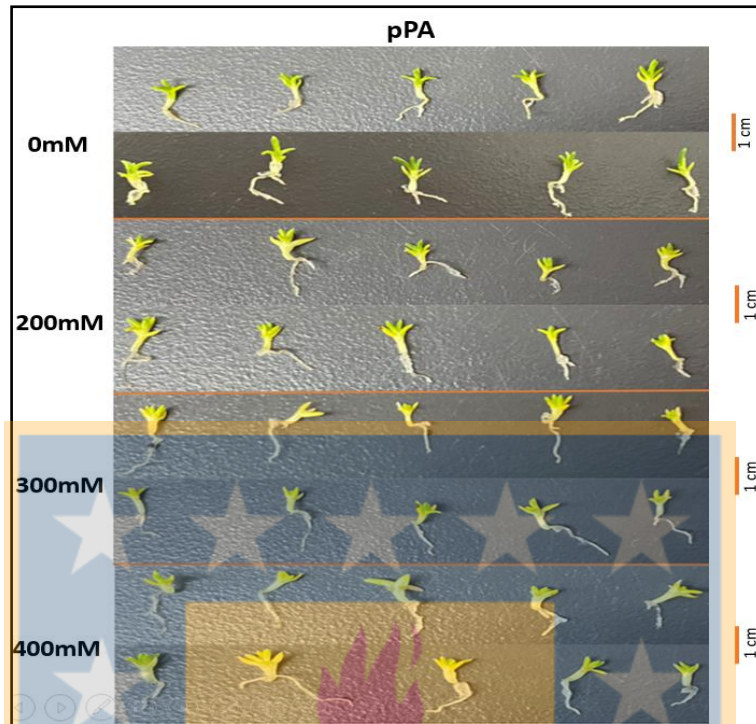


Figura Anexo 8: Registro fotográfico de ensayo de tolerancia a NaCl de plántulas recién germinadas de *Colobanthus quitensis*. **pPA**. Población La Marisma.

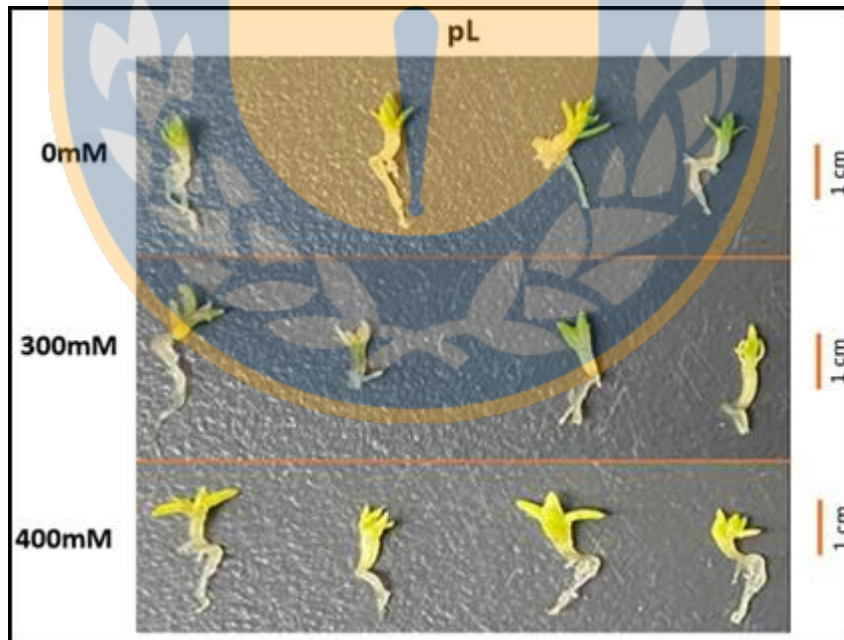


Figura Anexo 9: Registro fotográfico de ensayo de tolerancia a NaCl con plántulas recién germinadas de *Colobanthus quitensis*. **pL**. Población Laredo.

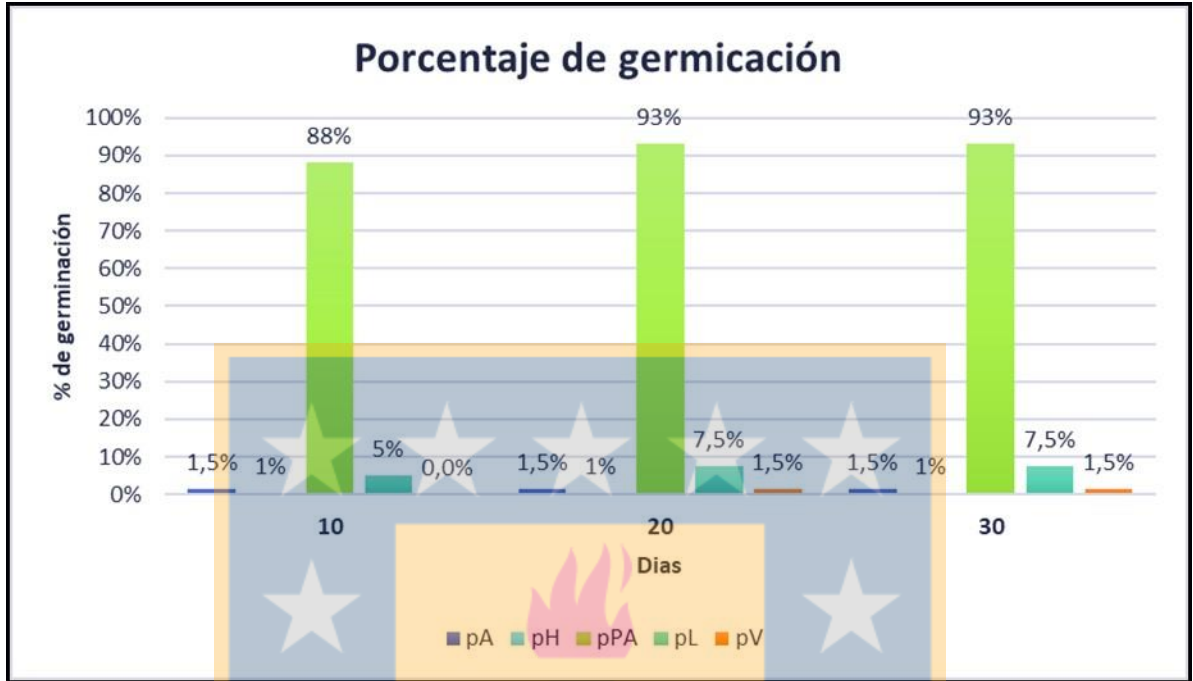


Figura Anexo 10: Porcentaje de germinación de 5 poblaciones estudiadas de *Colobanthus quitensis*. **pA.** población Arctowski; **pH.** población Punta Hannah; **pPA.** población La Marisma; **pL.** población Laredo; **pV.** población La Vega.