

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
CAMPUS LOS ÁNGELES
Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal**



“EFECTOS DE LOS IONES Fe^{3+} EN LA GERMINACIÓN *IN VITRO* DE *Colobanthus quitensis*”

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

Por: Diego Octavio Farias Parraguez
Profesora guía: Dra. Marely Cuba Díaz

**LOS ÁNGELES - CHILE
2018**

**EFFECTOS DE LOS IONES Fe^{III} EN LA GERMINACIÓN *IN VITRO* DE
*Colobanthus quitensis***

Alumno

Diego Farias Parraguez
Ingeniero en Biotecnología
Vegetal

Profesor Guía



Dra. Marely Cuba Díaz
Profesor Titular
Biólogo

Jefe de Carrera

Pedro Quiroz Hernández
Ing. En Ejecución Forestal

Director Departamento

MSc. Pablo Novoa Barra
Profesor Asistente
Ingeniero de Ejecución Forestal

Contenido

1. Introducción.....	11
2. Marco teórico	13
2.1. Función del hierro en las Plantas	13
2.2. Exceso de Hierro en Plantas.....	14
2.3. Germinación de semillas	15
2.4. Especie en estudio	16
3. Hipótesis	18
4. Objetivos	18
4.1. Objetivo general	18
4.2. Objetivos específicos	18
5. Materiales y métodos	19
5.1. Material vegetal.....	19
5.2. Medios de Germinación	19
5.3. Escarificación y Desinfección de las Semillas.....	19
5.4. Siembra de semillas en los medios.....	20
5.5. Porcentaje de Germinación y Supervivencia.....	20
5.6. Test de Tetrazolio.....	21
5.7. Evaluaciones morfo-fisiológicas	21
5.8. Evaluación de Recuperación de las plántulas.....	22
5.9. Análisis estadístico.....	23
6. Resultados	24
6.1. Porcentaje de germinación.....	24
6.2. Test de viabilidad de semillas.	25
6.3. Análisis morfofisiológicos	26
6.3.1. Número de Hojas	27
6.3.2. Longitud de Raíz.....	28
6.3.3. Numero de raíces	29
6.3.3.1. Raíces Principales.....	29
6.3.3.2. Raíces Laterales.....	30
7. Recuperación de las Plántulas.....	31
7.1. Número de Hojas	31
7.2. Longitud de Raíz	33
7.3. Raíces Principales.....	34

7.4. Raíces Laterales	34
7.5. Tasa de Crecimiento Relativo	36
7.6. Contenido Hídrico	37
8. Discusión.....	39
9. Conclusión	42
10. Referencias	43



Índice de Tablas

Tabla 1. Porcentaje de germinación, tiempo medio de germinación (T50) y porcentaje de supervivencia en <i>Colobanthus quitensis</i> en presencia de 0µM (control), 100µM y 500µM de iones de Fe ³⁺ . Promedio ± SE (n=10). Las diferencias se consideraron significativas con un p<0,05.	24
Tabla 2. Porcentaje de viabilidad de semillas de <i>Colobanthus quitensis</i> evaluado mediante la prueba de Tetrazolio. Control +, semillas procedentes del Banco de Germoplasma. Control, 100µM y 500µM, semillas no germinadas tomadas desde los tratamientos con las diferentes concentraciones de iones Fe ³⁺	26
Tabla 3 Variables morfológicas en plántulas de <i>Colobanthus quitensis</i> germinadas en presencia de 0µM (Control), 100µM, 500µM de iones Fe ³⁺ durante 28 días. Promedio ± SE (n=18). Las diferencias se consideraron significativas con un p<0,05.	28
Tabla 4 Variables morfológicas en plántulas de <i>Colobanthus quitensis</i> después de 14 días en medio de recuperación (libres de iones Fe ³⁺). Promedio ± SE (n=18). Las diferencias se consideraron significativas con un p<0,05.	32
Tabla 5 Tasa de Crecimiento Relativo en plántulas de <i>Colobanthus quitensis</i> germinadas en presencia de 0µM (Control), 100µM, 500µM de iones Fe ³⁺ durante 28 días y posterior a 14 días en recuperación (medios libres de iones Fe ³⁺). Promedio ± SE (n=10). Las diferencias se consideraron significativas con un p<0,01.	37

Índice de figuras

Figura 1. Aplicación del software *RootNav* en una planta de *Colobanthus quitensis*. a, selección del origen de las raíces (círculo azul), raíces principales (círculo rojo) y raíces laterales (círculo amarillo). b, aplicación del algoritmo del software para la auto selección de la planta en la digitalización. c, correspondencia de raíces laterales por cada raíz primaria; cada raíz primaria queda con un color único, su raíz lateral correspondiente le pertenece el mismo color. d, sobre posición de la imagen original para corregir errores del largo de raíz o raíces que no hubiese encontrado el software por sí solo. e, figura entregada por el programa, el cual adjunto entrega información como largo total de raíces y un conteo de raíces primarias y secundarias (Pound et al., 2013) 22

Figura 2. Germinación de *Colobanthus quitensis* en presencia de diferentes concentraciones de iones de Fe^{3+} por 28 días. (a), 0 μM (control). (b), 100 μM (c), 500 μM 25

Figura 3. Plántulas de *Colobanthus quitensis* después de 28 días en presencia de iones Fe^{3+} . (a), tratamiento 0 μM (control). (b), 100 μM (c), 500 μM de iones Fe^{3+} 27

Figura 4. Número de Hojas en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0 μM (Control), 100 μM , 500 μM de iones Fe^{3+} y mantenidas durante 28 días. Promedio \pm SE (n=18). Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0,05$ 28

Figura 5. Longitud radicular en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0 μM (Control), 100 μM , 500 μM iones Fe^{3+} y mantenidas durante 28 días. Promedio \pm SE (n=18). Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0,05$ 29

Figura 6. Número raíces principales y laterales en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0 μM (Control), 100 μM , 500 μM de iones Fe^{3+} y mantenidas durante 28 días. Promedio \pm SE (n=18). Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0,01$ 30

Figura 7. Morfología de plántulas de *Colobanthus quitensis* posterior a 14 días en medios de recuperación (libres de iones de Fe^{3+}). Procedentes de: a, tratamiento control. b, tratamiento con 100 μM y c, tratamiento de 500 μM de iones Fe^{3+} 31

Figura 8. Número de Hojas en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0 μM (Control), 100 μM , 500 μM de iones Fe^{3+} posterior a 14 días de recuperación en medios libres de iones Fe^{3+} . Promedio \pm SE (n=18). Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0,01$ 32

Figura 9. Longitud radicular en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0 μ M (Control), 100 μ M, 500 μ M de iones Fe³⁺ posterior a 14 días de recuperación en medios libres de iones Fe³⁺. Promedio \pm SE (n=18). Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0,05$ 33

Figura 10. Comparación entre raíces principales y laterales en las plantas de *Colobanthus quitensis* germinadas en tratamientos de 0 μ M (Control), 100 μ M, 500 μ M de iones Fe³⁺ después de 14 días de recuperación en medios libre de exceso de iones Fe³⁺. Promedio \pm SE (n=18). Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0,05$ 35

Figura 11. Definición con software *RootNav* de raíces principales y raíces laterales de plántulas de *Colobanthus quitensis* provenientes de medios de recuperación, raíces de plantas control. b, raíces de plantas provenientes de 100 μ M de FeCl₃. c, raíces de plantas provenientes de 500 μ M de FeCl₃. Los números representan la cantidad de raíces. P= principal y L=Lateral. 36

Figura 12. TCR en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0 μ M (Control), 100 μ M, 500 μ M de iones Fe³⁺ durante 28 días y posterior a 14 días en recuperación (medios libres de iones Fe³⁺). Promedio \pm SE (n=10). Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0,05$ 37

Figura 13. Contenido hídrico en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0 μ M (Control), 100 μ M, 500 μ M de iones Fe³⁺ durante 28 días y posterior a 14 días en recuperación (medios libres de iones Fe³⁺). Promedio \pm SE (n=10). Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0,05$ 38

Lista de Abreviaturas

ADESI	: Agua desionizada estéril
ANOVA	: Análisis de varianza
atm	: Atmósfera
CH	: Contenido hídrico
cm	: Centímetros
Fe	: Hierro
Fe ³⁺	: Óxido de Hierro III
FeCl ₃	: Cloruro de Hierro
Fig.	: Figura
Hrs	: Horas
H ₂ SO ₄	: Ácido sulfúrico
ln	: Logaritmo Natural
MS	: Medio basal, sales y vitaminas Murashige & Skoog (1962)
N	: Tamaño Muestral
PF	: Peso Fresco
PS	: Peso Seco
ROS	: Especies reactivas de oxígeno
SE	: Error estándar
t	: Tiempo
TCR	: Tasa de crecimiento relativo
μM	: Micro Molar
μmol m ² s ⁻¹	: Micromoles por metro cuadrado por segundo



Resumen

El hierro es un micronutriente esencial para las plantas, necesario para procesos vitales tales como la respiración y la fotosíntesis. Sin embargo, el exceso de hierro, tal como otros metales pesados, puede causar efectos adversos en las plantas. El primer efecto negativo se manifiesta en las semillas, produciendo disminución en la germinación y reducción del alargamiento de las raíces y brotes, lo que lleva a la toxicidad de las semillas y la pérdida de su productividad. *Colobanthus quitensis* (KUNTH) Bartl. (Caryophyllaceae) extiende su rango de distribución desde el continente Antártico hasta el sur de México. Esta especie ha sido objeto de varios estudios ecofisiológicos y moleculares debido a su adaptabilidad y mecanismos de tolerancia a condiciones abióticas extremas tales como temperaturas muy frías o congelantes, alta incidencia de rayos UV, salinidad, suelos ácidos e insuficiencia de nutrientes. Recientemente se han observado altos contenidos de Fe en los tejidos de esta especie, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los iones Fe^{3+} en la germinación de *C. quitensis*. Las semillas se mantuvieron durante 28 días en un medio MS suplementado con cloruro de hierro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a concentraciones de iones Fe^{3+} de 100 μM y 500 μM . Las concentraciones de iones Fe^{3+} evaluadas no produjeron diferencias significativas en el porcentaje o el tiempo medio de la germinación (GT50), pero sí en el número de hojas y la arquitectura radicular. Las plántulas fueron capaces de recuperarse y mantener un crecimiento relativo positivo, lo cual podría indicar la presencia de mecanismos de tolerancia a la presencia de concentraciones tóxicas de iones Fe^{3+} .

Abstract

Iron is an essential nutrient for plants that is necessary for life-sustaining processes such as respiration and photosynthesis. The main effects of heavy metals on seeds are manifested by general anomalies, decreased germination and reduced elongation of roots and shoots, leading to seed toxicity and loss of productivity. *Colobanthus quitensis* (KUNTH) Bartl (Caryophyllaceae) extends its range of distribution from the Antarctic continent to southern Mexico. Many ecophysiological and molecular studies have been performed on *C. quitensis* due to its adaptability to adverse conditions such as extreme temperatures, high incidence of UV rays, salinity, acidic soils and insufficient nutrients. High levels of Fe have recently been observed in tissues of this species; thus the objective of this study was to evaluate the effect of Fe³⁺ ions on the germination of *C. quitensis*. The seeds were maintained for 28 days in an MS medium supplemented with Iron Chloride (FeCl₃·6H₂O) at Fe³⁺ ions concentrations of 100µM and 500µM. The concentrations of Fe³⁺ ions evaluated did not produce significant differences in percentage or mean time (GT₅₀) of germination, but the leaves number and the roots architecture were affected. The seedlings were able to recover and maintain a positive relative growth, which could indicate the presence of tolerance mechanisms to the presence of toxic Fe³⁺ particles.

1. INTRODUCCIÓN

Los suelos en el mundo, que constituyen la parte básica y esencial del sistema ecológico, presentan altos niveles de contaminación (Cheng, 2003). Desde la revolución industrial, los impactos antropogénicos han causado la liberación de metales pesados cada vez más peligrosos al medio ambiente (Nagajyoti et al. 2010; Wu et al. 2010; Arrivabene et al. 2015). No obstante, si bien gran parte de la contaminación se genera por medio de los impactos antropogénicos, existen algunos factores naturales de contaminación, como lo son; la erosión de las rocas, la actividad volcánica y la deposición de minerales en diversas regiones del planeta (Nagajyoti et al. 2010).

El hierro (Fe) es un nutriente esencial para las plantas, necesario para procesos de mantenimiento desde la respiración a la fotosíntesis, donde participa en la transferencia de electrones a través de reacciones redox reversibles de Fe^{2+} a Fe^{3+} (Kim & Guerinot, 2007). A pesar de ser el metal más abundante en el suelo, su disponibilidad para las plantas es muy baja, debido a la baja solubilidad de este (Kobayashi & Nishizawa, 2012).

Las plantas, como organismos sésiles, están restringidas a sus hábitats, teniendo problemas cuando las condiciones nutricionales se vuelven limitantes. Para hacer frente a las deficiencias de nutrientes, las plantas superiores poseen una variedad de respuestas tanto a su estado nutricional interno como a la disponibilidad externa de nutrientes (Stacey et al. 2007).

Por otro lado, debido a las propiedades del Fe las células vegetales requieren limitar su acumulación (Kim & Guerinot, 2007). El superóxido y el peróxido de hidrógeno, que se producen en las células durante la reducción del oxígeno molecular, son catalizados por Fe^{2+} y Fe^{3+} para formar radicales hidroxilo altamente reactivos (Halliwell & Gutteridge, 1992). Por esto la captación de hierro en la planta está muy bien regulada para no generar acumulaciones. La distribución de Fe entre los tejidos y dentro de la célula ha sido poco documentada hasta el momento (Roschztardt et al. 2009).

Colobanthus quitensis (Kunth) Bartl. es una especie perteneciente a la familia Caryophyllaceae que presenta un amplio rango de distribución desde el continente Antártico a lo largo de los Andes hasta el Ecuador, con un sitio en el sur de México y desde los 0 hasta los 4200 m.s.n.m. (Moore, 1970). Es una de las dos únicas plantas vasculares nativas que habitan en el continente Antártico, crece como una hierba perenne formando cojines achaparrados de aproximadamente 8 a 10 cm de altura dispuestos en manchones, con flores blancas o amarillas en forma de campana alargada (Alberdi et al. 2002). Ha sido considerada como planta modelo para estudios ecofisiológicos y moleculares gracias a su capacidad de adaptación a condiciones abióticas extremas, como las temperaturas congelantes de la Antártica, alta incidencia de rayos UV, suelos ácidos, baja disponibilidad hídrica, varias semanas de oscuridad, entre otros. Recientemente se ha observado altos contenidos de Fe en tejidos de esta planta (Contreras & Cuba-Díaz, 2015).

El Rasafi et al. (2016) mostraron que metales traza afectaron el porcentaje de germinación y el crecimiento temprano de plántulas monocotiledóneas y dicotiledóneas de manera diferente. Por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de iones de Fe^{3+} en la germinación de *C. quitensis*. Las semillas fueron germinadas en medios MS con adición de Cloruro de Hierro ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) a concentraciones de $100\mu M$ y $500\mu M$. Las plantas fueron mantenidas durante 28 días en medios con adición de iones Fe^{3+} y luego una posterior recuperación durante 14 días en medios libres de exceso de iones Fe^{3+} . Esto para determinar el porcentaje de germinación y variaciones morfológicas que pudiesen presentar las plántulas en presencia de diferentes concentraciones del ion metálico.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Función del hierro en las Plantas

Los elementos minerales, como el fósforo (P), el nitrógeno (N), el calcio (Ca), el hierro (Fe), el zinc (Zn), el magnesio (Mg) y el manganeso (Mn), entre otros, desempeñan papeles esenciales en todos los seres vivos (López-Arredondo et al. 2013). Un equilibrio apropiado de todos estos nutrientes es necesario en cada etapa del desarrollo de la planta para alcanzar el rendimiento máximo. Las plantas requieren grandes cantidades de P y N que son nutrientes esenciales porque son bloques de construcción para las moléculas biológicas fundamentales, tales como nucleótidos, aminoácidos y proteínas, mientras que sólo necesitan pequeñas cantidades de micronutrientes, como Fe, Zn y B, que generalmente actúan como cofactores en reacciones enzimáticas (López-Arredondo et al. 2013). Entre los micronutrientes, se necesita hierro en la mayor cantidad y su disponibilidad depende del pH del medio (Goiba et al. 2018). El hierro es esencial para todas las células vivas ya que es constituyente de una serie de macromoléculas importantes, incluidas las que participan en la respiración, la fotosíntesis, la síntesis de ADN (Ravet et al. 2009), como cofactor en procesos metabólicos tales como división celular y la biosíntesis de ácidos grasos y aminoácidos ramificados (Roschttardt et al. 2011). Además la deficiencia de hierro hace que las raíces de las plantas liberen protones, lo que reduce el pH de la rizósfera y el hierro es solubilizado (Guerinot & Yi, 1994).

Fe^{2+} y Fe^{3+} son iones relativamente pequeños con una marcada propensión a formar seis complejos de coordinadas con ligandos que contienen O, N y S. Esta propiedad, combinada con el notable rango de potenciales redox de las enzimas que contienen hierro, tienen un papel en reacciones tan fundamentales como la reducción de ribonucleótidos y los dinitrógenos, así como en las reacciones de transferencia de electrones que producen energía de la respiración y la fotosíntesis (Guerinot & Yi, 1994).

Las ferritinas son una clase de proteínas multiméricas (proteína creada por 3 o más sub-unidades proteicas) universales de 24-meros, presentes en todos los reinos de la vida y capaces de acomodar varios miles de átomos de hierro en su cavidad central (Harrison y Arosio 1996; Ravet et al. 2009). En las plantas, la mayoría de las hipótesis formuladas con respecto a las funciones de la ferritina se basan en correlaciones entre la localización de las proteínas y su expresión en respuesta a factores ambientales y etapas de desarrollo (Briat et al. 1999).

2.2. Exceso de Hierro en Plantas

Las concentraciones naturales de metales pesados en los suelos varían según la naturaleza de las rocas, su ubicación y edad. Pero la contaminación más importante de los suelos urbanos y agrícolas es la antropogénica. La minería, la fabricación y el uso de productos sintéticos (por ejemplo, plaguicidas, pinturas, baterías, desechos industriales y aplicaciones de lodos industriales o domésticos en la tierra) son las principales fuentes de este tipo de contaminación (El Rasafi et al. 2016).

Las propiedades químicas del hierro imponen limitaciones en la acumulación celular de este elemento (Guerinot & Yi, 1994). La capacidad de las plantas terrestres para hacer frente a una amplia gama de condiciones abióticas ha permitido que ciertas especies de plantas se adapten a ambientes extremadamente rigurosos. Uno de los potenciales estrés abióticos que una planta puede enfrentar son los niveles tóxicos de metales pesados en el suelo (Milner & Kochian, 2008). La mayoría de las especies vegetales adoptan la denominada estrategia de exclusión, mediante la cual, los metales se almacenan en la pared celular de las raíces y en las vacuolas donde se mantienen apartados de los tejidos fotosintéticamente activos (Hanikenne & Nouet, 2011). Por el contrario, un pequeño número de especies de plantas (~ 500) que viven en suelos contaminados natural o antropogénicamente poseen la capacidad de acumular y tolerar concentraciones de metal extraordinariamente altas en tejidos sobre el suelo (Milner & Kochian, 2008).

Los niveles excesivos de Fe tienen efectos perjudiciales en el desarrollo de la planta, principalmente debido a la reacción del Fe con peróxido de hidrógeno, a través de la reacción de Fenton, que produce especies reactivas de oxígeno nocivas. La interrupción de los genes que codifican las proteínas del depósito de hierro (ferritinas), provoca un aumento de la sensibilidad a la oxidación en *Arabidopsis* (Ravet et al. 2009).

Nozoe et al. (2009) realizan ensayos en diferentes gramíneas utilizando un espectro de adición al medio desde los 1 mg Fe²⁺/L (2,5 μM del ion Fe²⁺) hasta los 100 mg Fe²⁺/L (250 μM del ion Fe²⁺), encontrando diferencias significativas en la germinación de las plántulas.

Estudios sobre los efectos de los iones Cu²⁺ en plántulas de *C. quitensis* fueron realizados por Marín (2015), en este estudio se utilizaron concentraciones de 100 μM y 500 μM del ion Cu²⁺ para encontrar diferencias en la germinación y en la morfología de la planta.

2.3. Germinación de semillas

La semilla es una etapa en el ciclo de vida de la planta que está bien protegida contra diversas tensiones (Li et al. 2005). Sin embargo, poco después de la imbibición y los posteriores procesos de desarrollo vegetativo, se vuelven sensibles al estrés en general. Por lo tanto, se cree que las semillas controlan cuidadosamente parámetros externos tales como luz, temperatura y nutrientes para mantener el estado de protección hasta que las condiciones externas sean favorables para seguir los procesos de desarrollo (Bungard et al. 1997). Los principales efectos de los metales pesados se manifiestan por anomalías generales y disminución de la germinación, reducción de la elongación de las raíces y los brotes, peso seco, daño oxidativo total soluble, alteración de la membrana, nivel de proteína, metabolismo alterado del azúcar y proteínas, pérdida de nutrientes. Todo esto llevando a la toxicidad en las semillas y la pérdida de productividad (Ghosh & Sethy, 2013).

La disminución de la germinación puede estar dada por las estrategias de absorción de iones Fe que utilice la planta. Las mayorías de plantas que se encuentran en la familia de las gramináceas utilizan una estrategia de captación de iones Fe^{2+} el cual es denominado “Estrategia II”. Las demás plantas utilizan un distinto sistema de captación de iones de Fe en el medio llamado “Estrategia I” (Kobayashi & Nishizawa, 2012).

2.4. Especie en estudio

El crecimiento clonal y la reproducción vegetativa juegan un papel muy importante en la propagación de plantas que habitan regiones frías de la Tierra, incluyendo el Ártico, la Antártida y las altas cordilleras (Kellmann-Sopyła et al. 2017). Actualmente se cree que hay alrededor de 400 especies de plantas procedentes de diferentes familias, tales como las Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Poaceae, Violaceae y Fabaceae que poseen la capacidad de tolerar niveles muy altos de metales pesados en el suelo y, lo que es más importante, en sus brotes (Milner & Kochian, 2008).

Colobanthus quitensis (KUNTH) Bartl. es una especie perteneciente a la familia de las Caryophyllaceae, y extiende su rango de distribución desde el continente Antártico, a lo largo de los Andes hasta el Ecuador, con un sitio en el sur de México y desde los 0 hasta los 4200 m.s.n.m. (Moore, 1970). Es una de las dos plantas vasculares nativas que habitan en el continente Antártico, crece como una hierba perenne formando cojines achaparrados de aproximadamente de 8 a 10 cm. de altura dispuestos en manchones y flores blancas o amarillas en forma de campana alargada (Moore, 1970).

La especie se ha adaptado a distintas condiciones microambientales a lo largo de su distribución, en la cordillera se desarrolla generalmente en vegas a mayores altitudes, en Antártica su reproducción ocurre solo en verano. Cuando las semillas germinan, las plántulas son capaces de hacer fotosíntesis a temperaturas muy bajas (Navarrete et al. 2012).

Colobanthus quitensis ha sido considerada como planta modelo para estudios ecofisiológicos y moleculares gracias a su capacidad de adaptación a condiciones tan adversas, como las temperaturas extremas de la Antártica, alta incidencia de rayos UV, suelos ácidos, déficit hídrico y varias semanas de oscuridad (Cuba - Díaz et al. 2014). En recientes estudios se ha encontrado que *C. quitensis* es capaz de acumular grandes concentraciones de Fe (Contreras & Cuba-Díaz, 2015), por lo cual se espera obtener información sobre el comportamiento de la especie frente a este metal.



3. HIPÓTESIS

Colobanthus quitensis es capaz de germinar en presencia de concentraciones de iones Fe^{3+} que pueden ser tóxicas para la sobrevivencia en otras especies vegetales.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de los iones Fe^{3+} en la capacidad de germinación *in vitro* de *Colobanthus quitensis*.

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Evaluar la capacidad de germinación de *Colobanthus quitensis* en presencia de Fe^{3+} .
- 4.2.2. Determinar cambios morfológicos que se puedan observar entre plántulas germinadas a distintas concentraciones de Fe^{3+} .



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material vegetal

Para la obtención del material vegetal se realizó un pool de semillas de distintas poblaciones de *C. quitensis* logrando un total aproximado de 1000 semillas. Estas semillas se obtuvieron desde el Banco de Germoplasma del Laboratorio de Biotecnología y Estudio Ambientales, Campus los Ángeles, Universidad de Concepción. Los ensayos de germinación de semillas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología, Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción.

5.2. Medios de Germinación

Dentro de 3 matraces Erlenmeyer, se adicionó el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) complementado con sacarosa 3%. El medio, fue disuelto con la adición de agua destilada estéril, ajustando el pH a 5,7 y finalmente se agregó el agar 0,7% (Cuba-Díaz, Castel, et al., 2017). El medio de cultivo fue esterilizado en una autoclave a 121°C y 1 atm de presión durante 20 min. Cuando disminuyó la temperatura del medio de cultivo (50°C aproximadamente) se llevó a cámara de flujo laminar donde se le adicionó sal de Cloruro de Hierro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) para alcanzar las concentraciones de 100 μM y 500 μM de iones Fe^{3+} , estos 2 medios de cultivo con adición de Fe fueron catalogados como tratamientos más un medio control el cual no tenía adición de Fe externo. Luego se dispensaron 20 ml de medio en placas Petri estériles de 9 cm de diámetro.

Se realizó un total de 10 réplicas en cada tratamiento y fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta el día de su utilización.

5.3. Escarificación y Desinfección de las Semillas

Las semillas fueron escurificadas bajo campana de extracción, donde se adicionó H_2SO_4 1% en un tubo eppendorf por 30 segundos. Posteriormente se lavó con agua

destilada 3 veces para remover el exceso de ácido en las semillas. Luego, se desinfectaron con un lavado de etanol al 70% durante 30 segundos, seguido de un lavado de 7 min hipoclorito de sodio 5% (Blanqueador comercial Clorox al 10%) para posteriormente se lavadas tres veces con agua destilada estéril (Cuba-Díaz et al., 2019)

5.4. Siembra de semillas en los medios

Bajo cámara de flujo laminar se dispersaron las semillas en los medios MS sólido. Esto se llevó a cabo con ayuda de una jeringa con aguja, se colectó las semillas más agua ADESI. De esta forma se sembró una cantidad de 30 semillas por placa. Las semillas y luego plántulas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 20 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 hrs luz/ 8 hrs oscuridad con una intensidad lumínica de $60 \pm 6 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ durante 28 días.

5.5. Porcentaje de Germinación y Sobrevivencia

Se registró el porcentaje de semillas germinadas cada 2 días en cada una de las réplicas de cada tratamiento. Se optó como criterio de semilla germinada lo descrito por Sanhueza et al. (2016), el cual postula que la germinación de una semilla ocurre cuando la radícula alcanza el doble del tamaño de la semilla. Además, se calculó el 50% de las semillas germinadas (T_{50}) según lo descrito por Basra et al. (2005).

$$T_{50} = t_i + \frac{\frac{N-1}{2} + n_i}{n_j - n_i} * (t_j - t_i)$$

Donde N es el número final de semillas germinadas y n_i y n_j el número acumulativo de semillas germinadas por cuentas adyacentes de t_i y t_j cuando $n_i < (N+1)/2 < n_j$.

Finalmente se calculó el porcentaje final de germinación al día 28.

Después de la germinación de las semillas, se procedió a la evaluación de la recuperación de las plántulas traspasándolas a medios sin adición de Fe^{3+} y

manteniéndolas ahí durante 14 días, la plántula se caracterizó por la aparición de cuatro hojas verdaderas.

5.6. Test de Tetrazolio

La evaluación con tetrazolio (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloride) se realizó para determinar la viabilidad de las semillas que no germinaron en las distintas concentraciones de Fe^{3+} . Este test fue realizado según Sanhueza et al. (2016), con la diferencia en que en este experimento se tomaron 100 semillas no germinadas desde los ensayos, esto para comprobar la inhabilidad germinativa de las semillas que se encontraban en el ensayo y así comprobar que las semillas que no germinaron tuvieron problemas de viabilidad antes del ensayo con Fe^{3+} . Además, se colectaron 100 semillas que se encontraban en el banco de germoplasma para utilizarlo como control positivo de este test.

5.7. Evaluaciones morfo-fisiológicas

Se evaluaron variables morfológicas como; número de hojas, largo radicular y número de raíces primarias y secundarias. Se tomó registro de 18 plantas por tratamiento, tomadas al azar.

Se midió el largo de las raíces. Esto se realizó extendiendo cada parte radicular de las muestras, luego las plantas fueron escaneadas (HP Deskjet Ink Advantage 4615). Las plantas digitalizadas fueron procesadas con el software *RootNav* (Fig1), esta es una herramienta de análisis de imágenes que permite la cuantificación semiautomatizada de arquitectura de sistemas de raíces complejas. Al extraer las plántulas desde las placas, se registró el peso fresco de 10 plántulas en una balanza analítica (RADWAG as220/c2 e=1mg). Terminadas estas mediciones, se procedió a introducir cada planta en un sobre de papel para luego ser llevada dentro de una estufa a $37\pm 2^\circ\text{C}$, con esto se obtuvo el peso seco de las plantas. Las plantas se mantuvieron dentro de la estufa hasta que lograron mantener un peso constante.

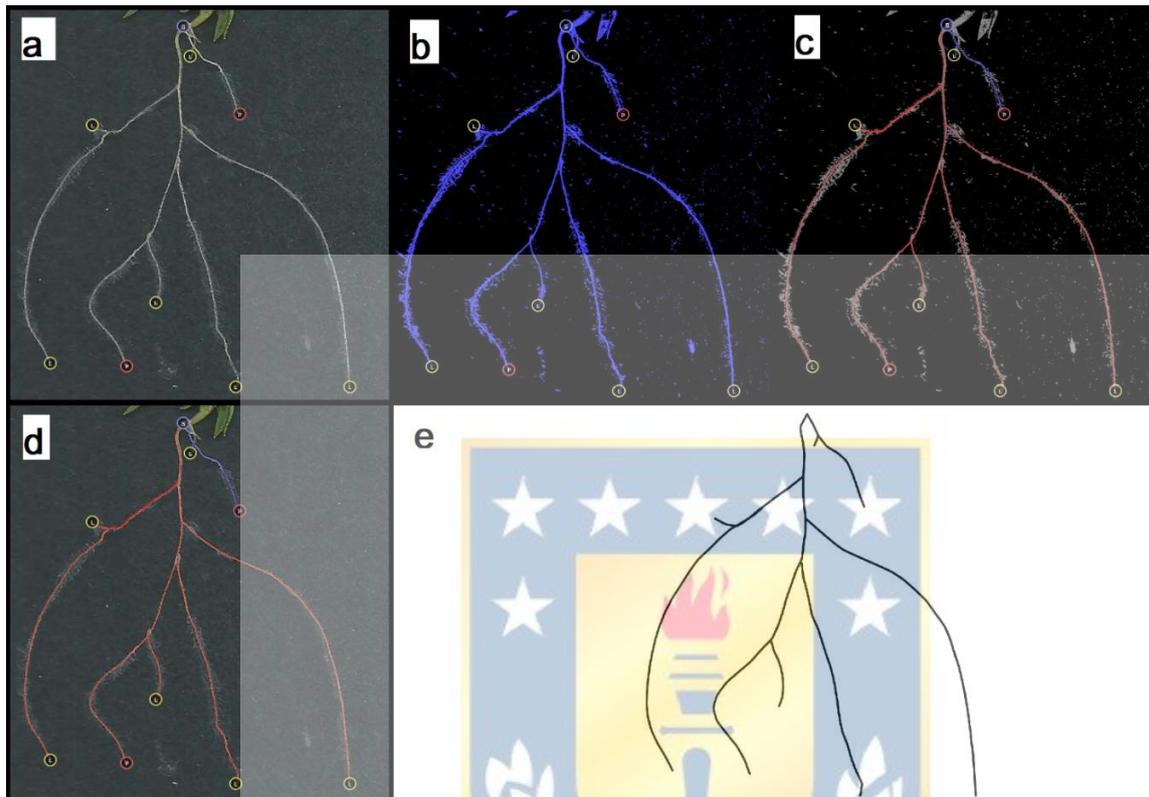


Figura 1. Aplicación del software *RootNav* en una planta de *Colobanthus quitensis*. a, selección del origen de las raíces (círculo azul), raíces principales (círculo rojo) y raíces laterales (círculo amarillo). b, aplicación del algoritmo del software para la auto selección de la planta en la digitalización. c, correspondencia de raíces laterales por cada raíz primaria; cada raíz primaria queda con un color único, su raíz lateral correspondiente le pertenece el mismo color. d, sobre posición de la imagen original para corregir errores del largo de raíz o raíces que no hubiese encontrado el software por sí solo. e, figura entregada por el programa, el cual adjunto entrega información como largo total de raíces y un conteo de raíces primarias y secundarias (Pound et al., 2013)

5.8. Evaluación de Recuperación de las plántulas

Las plántulas se mantuvieron en medios con excedentes de Fe^{3+} hasta el día 28. Luego, se trasplantaron a medios sin exceso de Fe^{3+} por 14 días y se determinó el porcentaje de supervivencia de las plántulas a este medio.

Para evaluar las plantas que tuvieron la capacidad de recuperarse después de ser estresadas en un medio de cultivo contaminado con hierro, se calculó la tasa de crecimiento relativo (TCR) según los expuesto por Castro-Díez et al. (2017).

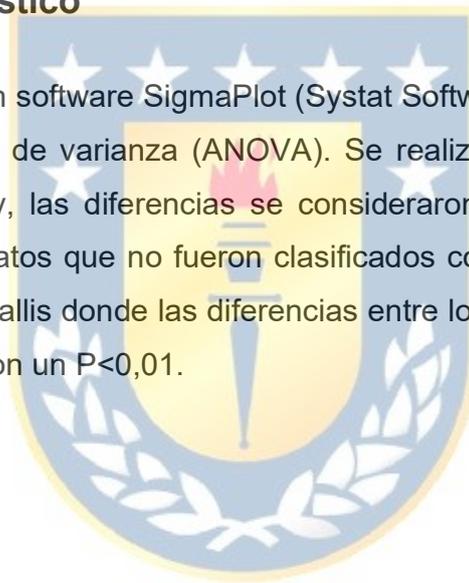
$$TCR = \frac{\ln PS2 - \ln PS1}{t2 - t1}$$

Donde PS1 es el peso seco muestreado en t1, el cual corresponde al día 28. PS2 es la segunda medición del peso seco en t2 correspondiente a 14 días posteriores al día 28.

Además se determinó el contenido Hídrico (CH) de las plántulas con la ecuación descrita por Klagges et al. (2013) obtenido con la fórmula: $CH = 100(PF - PS) / PF$

5.9. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con software SigmaPlot (Systat Software Inc., 2012) a estos se les realizaron análisis de varianza (ANOVA). Se realizaron pruebas de comparación múltiple de Tukey, las diferencias se consideraron significativas si $P < 0,05$. Finalmente, para los datos que no fueron clasificados como normales se les realizó un test de Kruskal-Wallis donde las diferencias entre los valores medios se consideraron significativas con un $P < 0,01$.



6. RESULTADOS

6.1. Porcentaje de germinación

En general el porcentaje de germinación de semillas fue bajo para todos los tratamientos, siendo el tratamiento de 500 μ M el que mostró el menor porcentaje de germinación (33,3%). Mientras que el mayor porcentaje de germinación se observó en el tratamiento de 100 μ M del ion Fe³⁺ (Tabla 1). A pesar de que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos y el control, si se evidenciaron diferencias cualitativas con las plántulas recién germinadas entre todos los tratamientos (Fig. 2).

El tiempo medio de germinación (T50) tampoco evidenció diferencias significativas, la germinación de semillas tanto en el control como en los tratamientos mostraron resultados cercanos al noveno día después de sembradas (Tabla 1). Se observó un 100% de sobrevivencia del total de plántulas (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de germinación, tiempo medio de germinación (T50) y porcentaje de supervivencia en *Colobanthus quitensis* en presencia de 0 μ M (control), 100 μ M y 500 μ M de iones de Fe⁺³. Promedio \pm SE (n=10). Las diferencias se consideraron significativas con un p<0,05.

Tratamiento	Semillas		Plántulas
	Germinación (%)	T50 (Día)	
Control	36 \pm 4,90 ^a	9,495 \pm 0,338 ^a	100 \pm 0,0 ^a
100 μ M	41,3 \pm 2,78 ^a	9,616 \pm 0,170 ^a	100 \pm 0,0 ^a
500 μ M	33,3 \pm 1,19 ^a	9,118 \pm 0,211 ^a	100 \pm 0,0 ^a

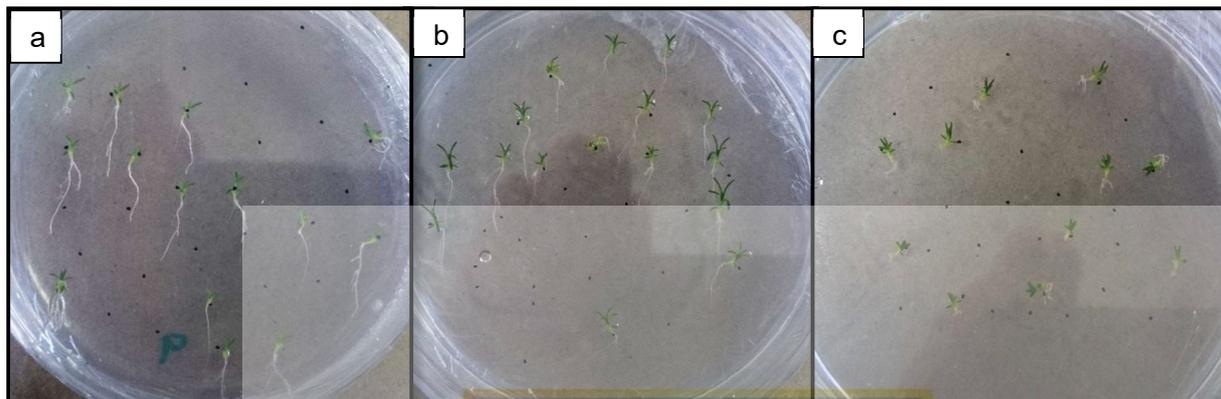


Figura 2. Germinación de *Colobanthus quitensis* en presencia de diferentes concentraciones de iones de Fe^{3+} por 28 días. (a), 0 μM (control). (b), 100 μM (c), 500 μM .

6.2. Test de viabilidad de semillas.

Debido el bajo porcentaje de germinación, las semillas que no germinaron en los diferentes tratamientos fueron sometidas a un test de viabilidad mediante la prueba de tetrazolio, utilizándose como control semillas tomadas de la colección del Banco de Germoplasma. El porcentaje de viabilidad de las semillas control + (45%) fue similar al presentado por las semillas en tratamiento (Tablas 1 y 2), mientras que el porcentaje de viabilidad mostrado por las semillas provenientes de cada tratamiento evidencia que la viabilidad de las semillas es cercana al 45 % y que el bajo porcentaje de germinación en presencia de Fe^{3+} no guarda relación con un efecto de éste (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de viabilidad de semillas de *Colobanthus quitensis* evaluado mediante la prueba de Tetrazolio. Control +, semillas procedentes del Banco de Germoplasma. Control, 100 μ M y 500 μ M, semillas no germinadas tomadas desde los tratamientos con las diferentes concentraciones de iones Fe³⁺.

Tratamiento	Semillas Viables (%)
Control +	45
Control	3
100 μ M	1
500 μ M	2

6.3. Análisis morfofisiológicos

Las plántulas que germinaron en los medios con 500 μ M de FeCl₃ presentaron diferencias visibles en la arquitectura de la planta (Fig. 2, 3), las plántulas que germinaron en condiciones de mayor concentración de hierro presentaron raíces más cortas en comparación con las plántulas en el medio control (Fig. 3).

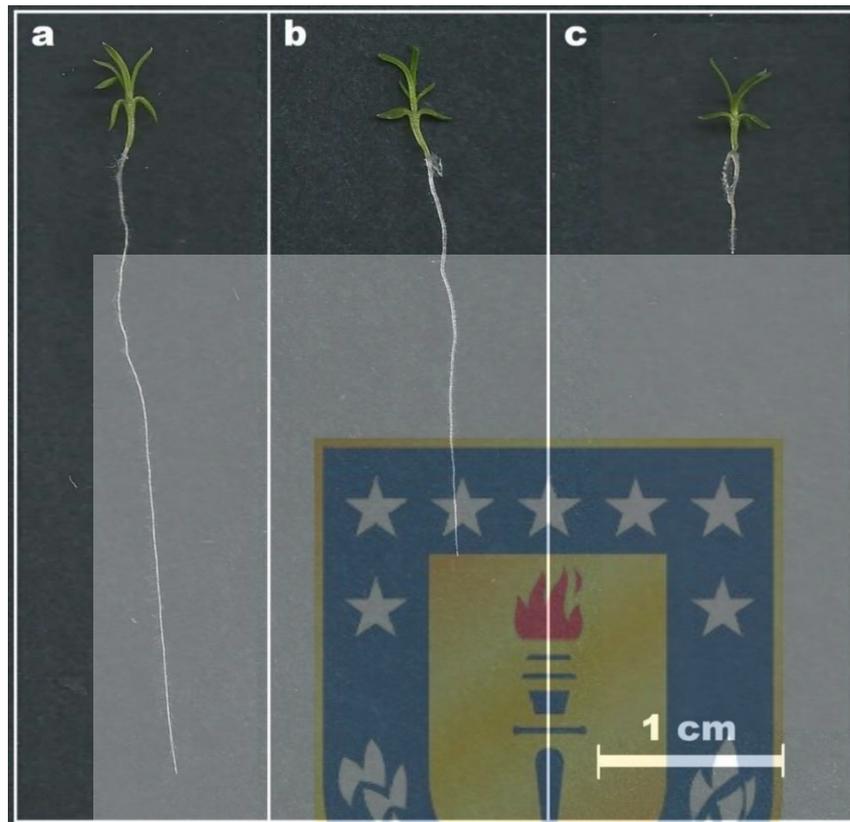


Figura 3. Plántulas de *Colobanthus quitensis* después de 28 días en presencia de iones Fe^{3+} . (a), tratamiento $0 \mu\text{M}$ (control). (b), $100 \mu\text{M}$ (c), $500 \mu\text{M}$ de iones Fe^{3+} .

6.3.1. Número de Hojas

Se observó un efecto de la concentración de Fe^{3+} en el número de hojas con una tendencia al incremento de éstas con el incremento de la concentración del ión metálico. Se encontraron diferencias significativas entre las plantas control y las plántulas que germinaron en $500 \mu\text{M}$ de FeCl_3 hasta el día 28 después de germinadas (Tabla 3), en cambio las plantas que se encontraban a $100 \mu\text{M}$ de FeCl_3 no mostraron diferencias significativas respecto de los otros tratamientos al día 28 después de germinadas (Fig. 4).

Tabla 3 Variables morfológicas en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0 μ M (Control), 100 μ M, 500 μ M de iones Fe³⁺ durante 28 días. Promedio \pm SE ($n=18$). Las diferencias se consideraron significativas con un $p<0,05$.

Tratamiento	Número de Hojas	Largo de Raíz (cm)	Número de Raíces	
			Principales	Laterales
Control	5,833 \pm 0,167 ^{cb}	2,797 \pm 0,351 ^a	1,167 \pm 0,0904 ^{cb}	0.167 \pm 0,121 ^{ba}
100 μ M	6,167 \pm 0,0904 ^{ba}	2,417 \pm 0,152 ^{ba}	1,222 \pm 0,101 ^b	0 \pm 0
500 μ M	6,389 \pm 0,200 ^a	0,944 \pm 0,0577 ^c	2,000 \pm 0,140 ^a	0.333 \pm 0,114 ^a

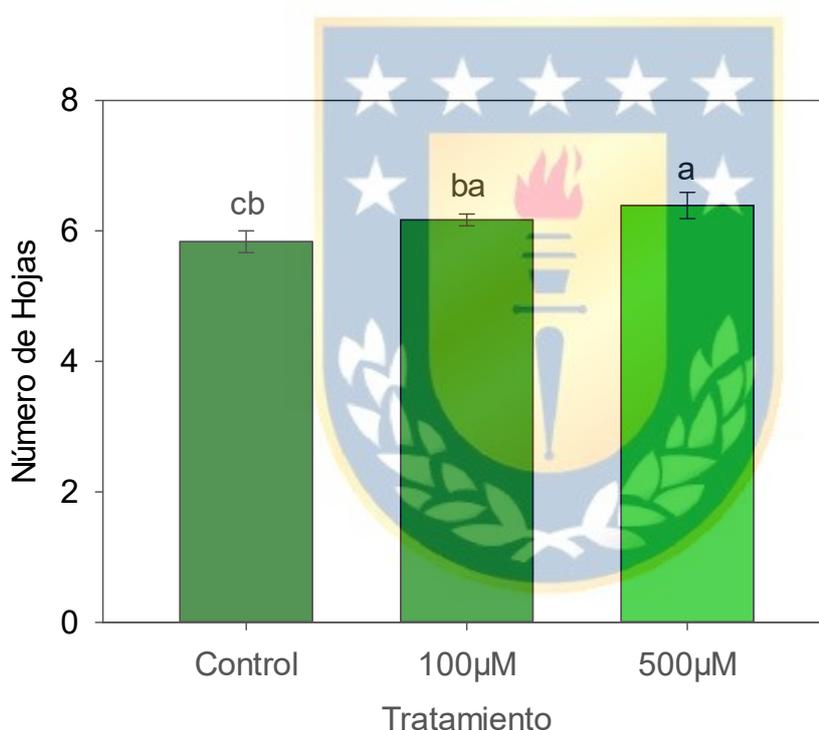


Figura 4. Número de Hojas en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0 μ M (Control), 100 μ M, 500 μ M de iones Fe³⁺ y mantenidas durante 28 días. Promedio \pm SE ($n=18$). Las diferencias se consideraron significativas con un $p<0,05$.

6.3.2. Longitud de Raíz

En el largo de las raíces se observaron diferencias significativas en las plántulas en medios con 500 μ M de Fe³⁺ y los tratamientos control, con una relación inversamente proporcional entre el incremento de la concentración de Fe³⁺ y la disminución del largo radicular. Las plántulas de *C. quitensis* que se encontraban en

medios control presentaron la mayor longitud de raíces (2,8 cm), mientras que las plántulas que se encontraban a una concentración de 100 μ M de FeCl₃ mostraron un menor largo radicular hasta los 2,4 cm. Las plántulas que se encontraban a 500 μ M de FeCl₃ presentaron la menor longitud radicular total, llegando solo a los 0,9 cm (Fig. 5, Tabla 3).

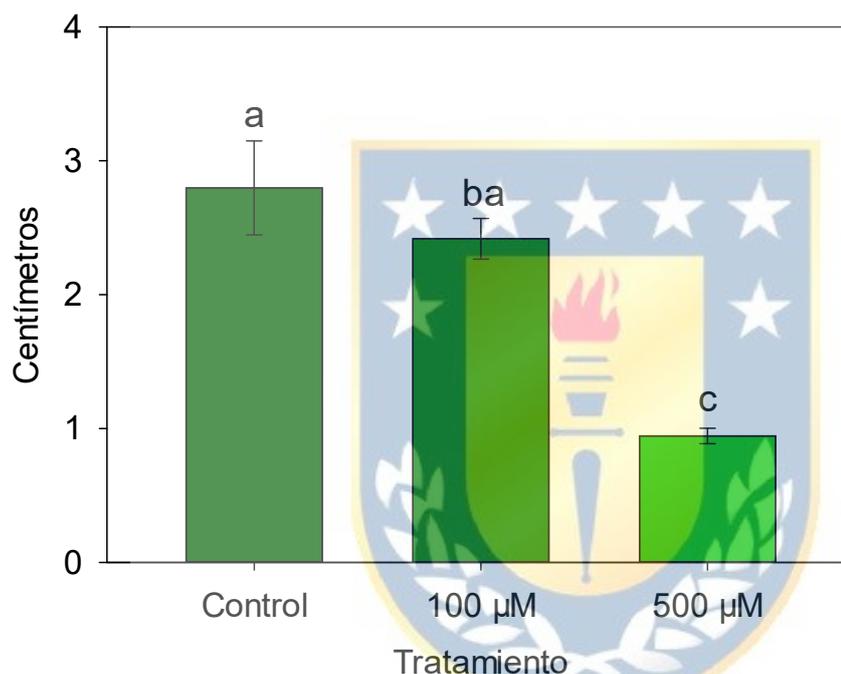


Figura 5. Longitud radicular en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0 μ M (Control), 100 μ M, 500 μ M iones Fe³⁺ y mantenidas durante 28 días. Promedio \pm SE (n=18). Las diferencias se consideraron significativas con un p<0,05.

6.3.3. Numero de raíces

6.3.3.1. Raíces Principales

El número de raíces principales se vio afectado con el aumento de la concentración de iones Fe³⁺, observándose un incremento de estas con el aumento de la concentración de Fe³⁺ en plántulas de 28 días después de germinadas. Las plántulas en medio control presentaron un menor promedio de raíces principales (1,1 raíces por planta), mientras que, las que se encontraban a una concentración

de 100 μM llegaron hasta un promedio de 1,2 raíces principales por planta. El mayor incremento en el número promedio de raíces principales se observó en las plántulas que se encontraban expuestas a la máxima concentración de iones Fe^{3+} (500 μM), con un promedio de 2 raíces principales por planta, siendo significativo respecto del control y de la concentración de 100 μM (Fig. 6, Tabla 3).

6.3.3.2. Raíces Laterales

Las raíces laterales de las plántulas germinadas en medios con adición de iones Fe^{3+} y evaluadas el día 28, no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 6, Tabla 3).

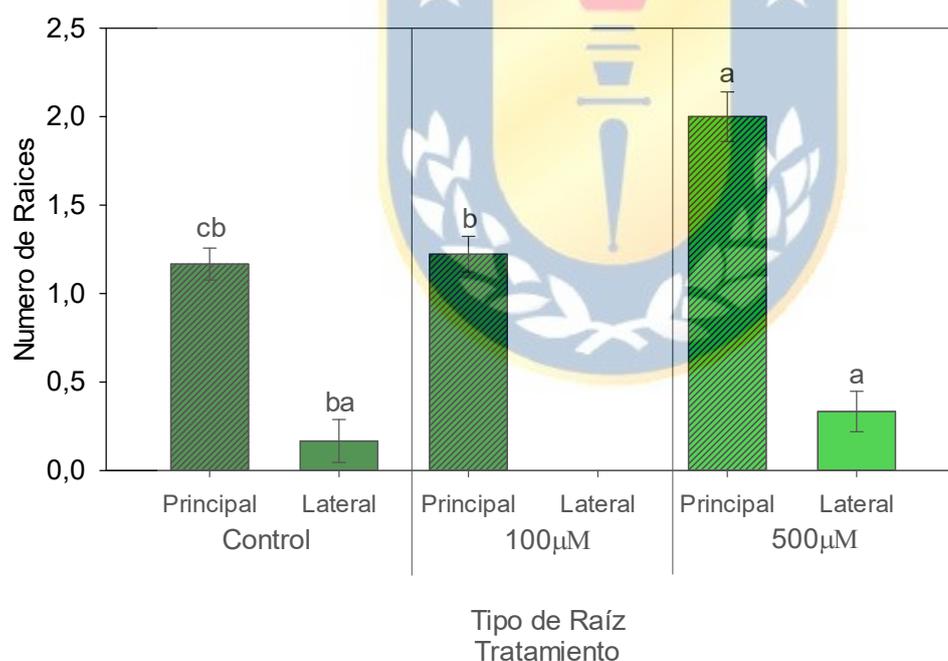


Figura 6. Número raíces principales y laterales en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0 μM (Control), 100 μM , 500 μM de iones Fe^{3+} y mantenidas durante 28 días. Promedio \pm SE (n=18). Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0,01$.

7. RECUPERACIÓN DE LAS PLÁNTULAS

Después de evaluar la supervivencia de las plántulas de *C. quitensis* germinadas en medios de cultivo en presencia de diferentes concentraciones de iones Fe^{3+} (Tabla 1), las plántulas que fueron pasadas a medios en ausencia de fuentes externas de iones Fe^{3+} , sobrevivieron en un 100% y continuaron creciendo sin evidencias cualitativas de daños por efectos de los iones Fe^{3+} pero mantuvieron diferencias en su morfología (Fig.7).

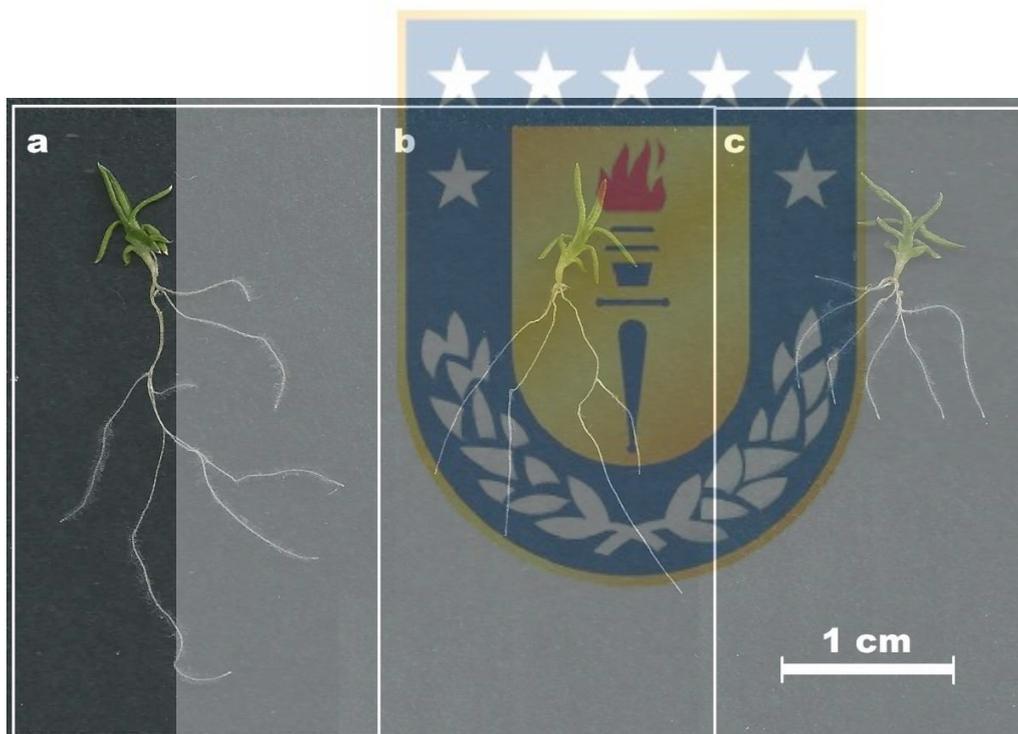


Figura 7. Morfología de plántulas de *Colobanthus quitensis* posterior a 14 días en medios de recuperación (libres de iones de Fe^{3+}). Procedentes de: a, tratamiento control. b, tratamiento con $100\mu\text{M}$ y c, tratamiento de $500\mu\text{M}$ de iones Fe^{3+} .

7.1. Número de Hojas

Pasados 14 días en el medio de recuperación, el número de hojas en las plántulas provenientes de los diferentes tratamientos, mantuvieron las diferencias observadas previamente en presencia de los iones de Fe^{3+} (Tabla 3). En promedio en los 3 tratamientos hubo un incremento de 3 hojas por plántulas (Tablas, 3 y 4). Las

plántulas provenientes de la concentración mayor (500 μM), mostraron el mayor número de hojas (9.8) siendo significativo respecto del número de hojas de las plántulas provenientes del tratamiento control (Tabla 4, Fig. 8).

Tabla 4 Variables morfológicas en plántulas de *Colobanthus quitensis* después de 14 días en medio de recuperación (libres de iones Fe^{3+}). Promedio \pm SE ($n=18$). Las diferencias se consideraron significativas con un $p<0,05$.

Tratamiento	Número de Hojas	Largo de Raíz (cm)	Número de Raíces	
			Principales	Laterales
Control	8,556 \pm 0,294 ^c	7,539 \pm 0,443 ^a	1,944 \pm 0,0981 ^c	3,944 \pm 0,4 ^a
100 μM	9,167 \pm 0,345 ^{bc}	5,578 \pm 0,210 ^b	2,556 \pm 0,145 ^b	2,444 \pm 0,390 ^b
500 μM	9,833 \pm 0,305 ^{ab}	3,622 \pm 0,222 ^c	3,278 \pm 0,158 ^a	1,889 \pm 0,241 ^{cb}

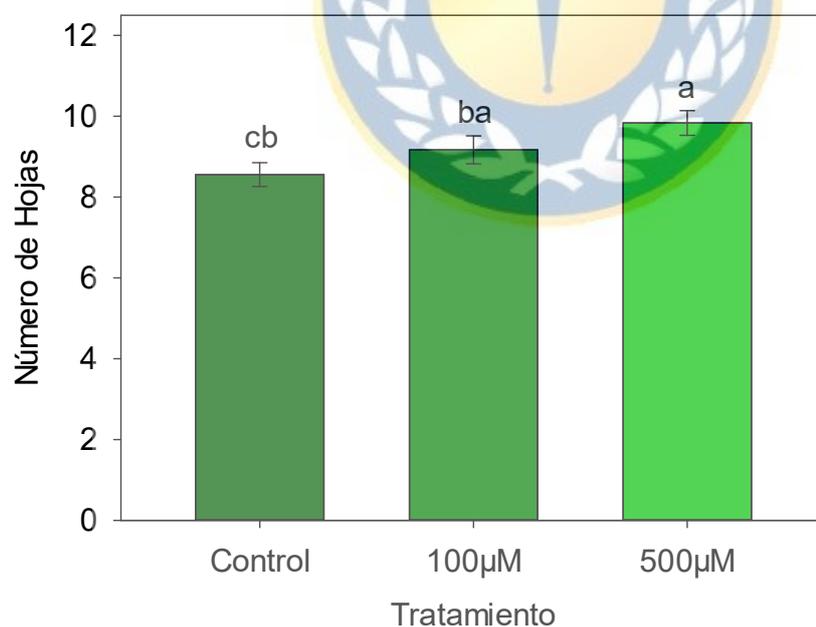


Figura 8. Número de Hojas en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0 μM (Control), 100 μM , 500 μM de iones Fe^{3+} posterior a 14 días de recuperación en medios libres de iones Fe^{3+} . Promedio \pm SE ($n=18$). Las diferencias se consideraron significativas con un $p<0,01$.

7.2. Longitud de Raíz

La longitud de la raíz de las plántulas después de 14 días en medio de recuperación mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos (Tabla 4). Se mantuvo la tendencia de la relación inversamente proporcional entre la longitud de raíz y la concentración de iones Fe de donde provenían las plántulas (Tabla 4, Fig. 9). En todos los tratamientos se observó un incremento de la longitud de raíces, mientras en el control este incremento fue de aproximadamente 5 cm, en las plántulas provenientes de ambos tratamientos con iones Fe este incremento fue sólo de 3 cm (Tablas 3 y 4).

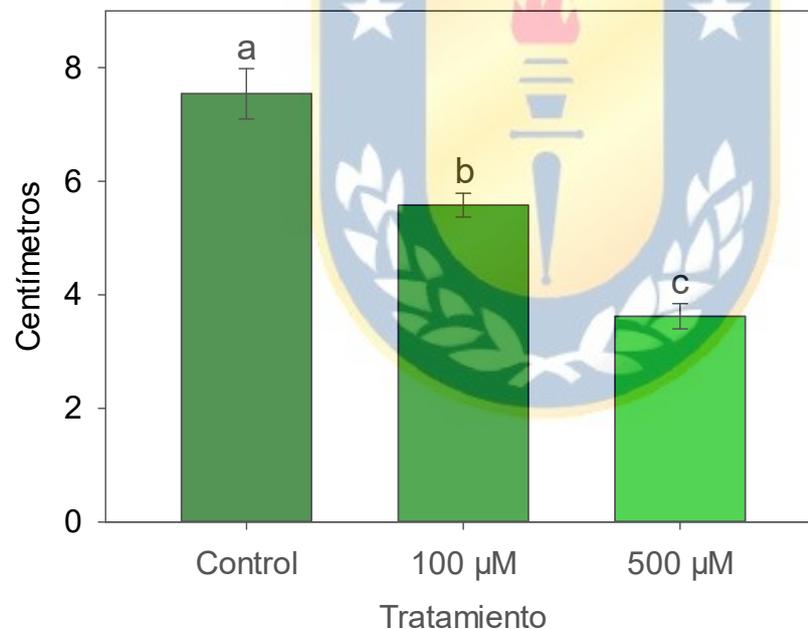


Figura 9. Longitud radicular en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0µM (Control), 100µM, 500µM de iones Fe^{3+} posterior a 14 días de recuperación en medios libres de iones Fe^{3+} . Promedio \pm SE (n=18). Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0,05$.

7.3. Raíces Principales

El número de raíces principales en las plántulas de *C. quitensis* que se sometieron a medios de recuperación por 14 días se mantuvo afectado por las concentraciones de iones Fe^{3+} . Se obtuvieron diferencias significativas en el número de raíces principales entre todos los tratamientos (Tabla 4). El menor promedio de raíces principales se observó en las plántulas control (1,9 raíces), mientras que las plántulas provenientes de $100\mu\text{M}$ de iones Fe^{3+} mostraron un promedio de 2,5 raíces. El mayor número de raíces principales se observaron en las plántulas provenientes de $500\mu\text{M}$ de Fe^{3+} , llegando a un promedio de 3,3 raíces (Fig. 10, Tabla 4).

7.4. Raíces Laterales

En el medio de recuperación, el número de raíces laterales mostraron una disminución significativa respecto del incremento de las concentraciones de iones Fe^{3+} de procedencia. Las plántulas provenientes del tratamiento control mostraron un número significativamente mayor de raíces laterales (3.9) mientras que las provenientes de los tratamientos con iones Fe mostraron 2.4 ($100\mu\text{M}$) y 1.8 ($500\mu\text{M}$), sin diferencias significativas entre ellas (Tabla 4, Fig. 10).

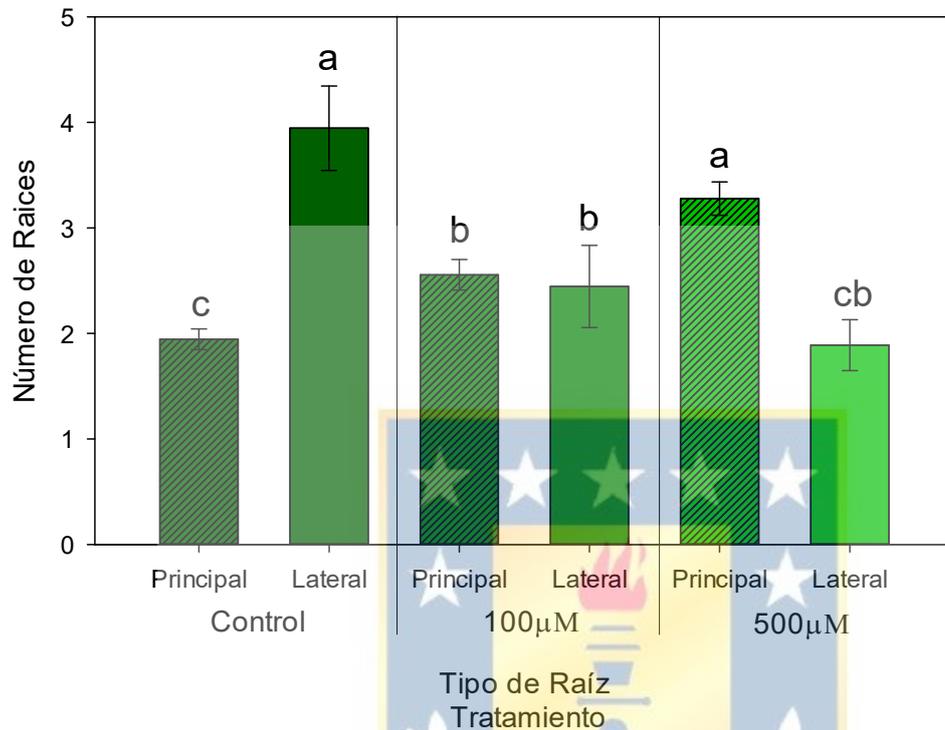


Figura 10. Comparación entre raíces principales y laterales en las plantas de *Colobanthus quitensis* germinadas en tratamientos de 0µM (Control), 100µM, 500µM de iones Fe^{3+} después de 14 días de recuperación en medios libre de exceso de iones Fe^{3+} . Promedio \pm SE (n=18). Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0,05$.

La fig. 11 muestra la clasificación de raíces principales y laterales obtenidas a partir del Software *RootNav*, el cual usa como criterio de diferenciación el origen de las raíces. Se evidencia que con el incremento de la concentración de iones Fe^{3+} disminuye el número de raíces laterales y aumenta el número de raíces principales, aún después de 14 días en un medio con ausencia de los iones Fe.

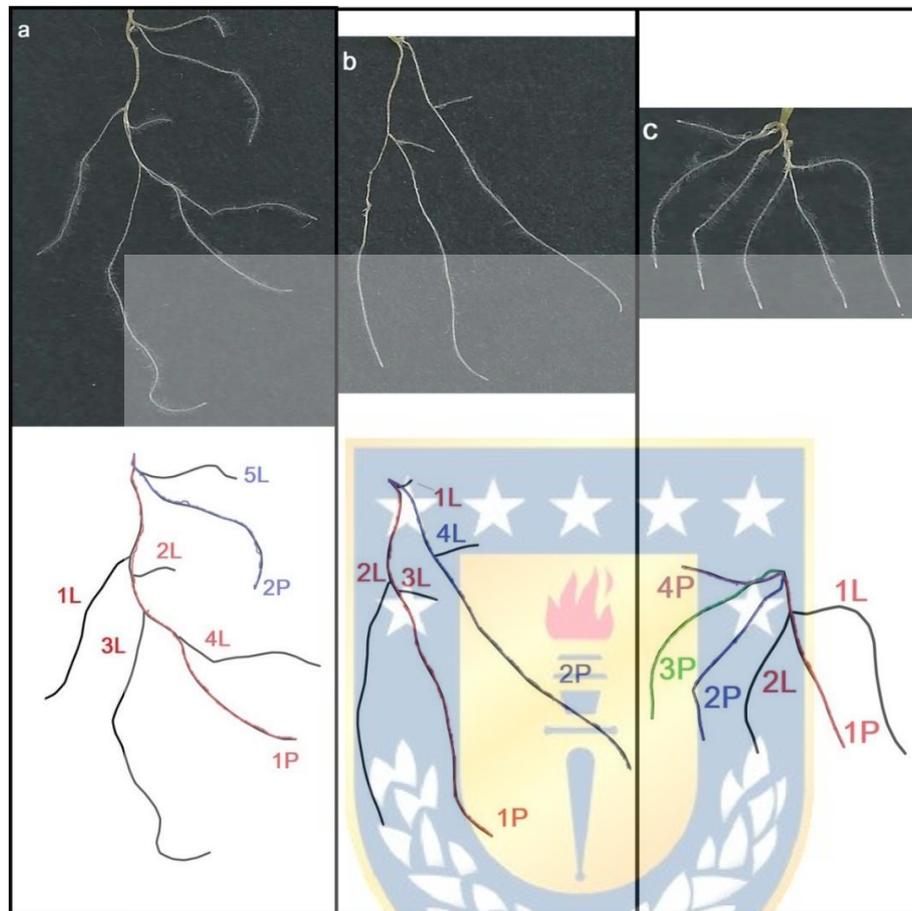


Figura 11. Definición con software *RootNav* de raíces principales y raíces laterales de plántulas de *Colobanthus quitensis* provenientes de medios de recuperación, raíces de plantas control. b, raíces de plantas provenientes de 100 μ M de FeCl₃. c, raíces de plantas provenientes de 500 μ M de FeCl₃. Los números representan la cantidad de raíces. P= principal y L=Lateral.

7.5. Tasa de Crecimiento Relativo

Las plántulas que fueron trasplantadas a medios de recuperación mostraron un incremento en su crecimiento de acuerdo con la tasa crecimiento relativo (TCR). Las plántulas provenientes del tratamiento control mostraron el mayor promedio en TCR (1,9), difiriendo significativamente de las plantas provenientes de ambos tratamientos con iones de Fe. Las plántulas provenientes de los tratamientos con 100 μ M y 500 μ M de Fe³⁺ no mostraron diferencias significativas en la TCR entre ellas (Tabla 5, Fig. 12).

Tabla 5 Tasa de Crecimiento Relativo en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0 μ M (Control), 100 μ M, 500 μ M de iones Fe³⁺ durante 28 días y posterior a 14 días en recuperación (medios libres de iones Fe³⁺). Promedio \pm SE ($n=10$). Las diferencias se consideraron significativas con un $p<0,01$.

Tratamiento	Tasa de Crecimiento Relativo
Control	1,940 \pm 0,0378a
100 μ M	1,812 \pm 0,0182b
500 μ M	1,763 \pm 0,0112cb

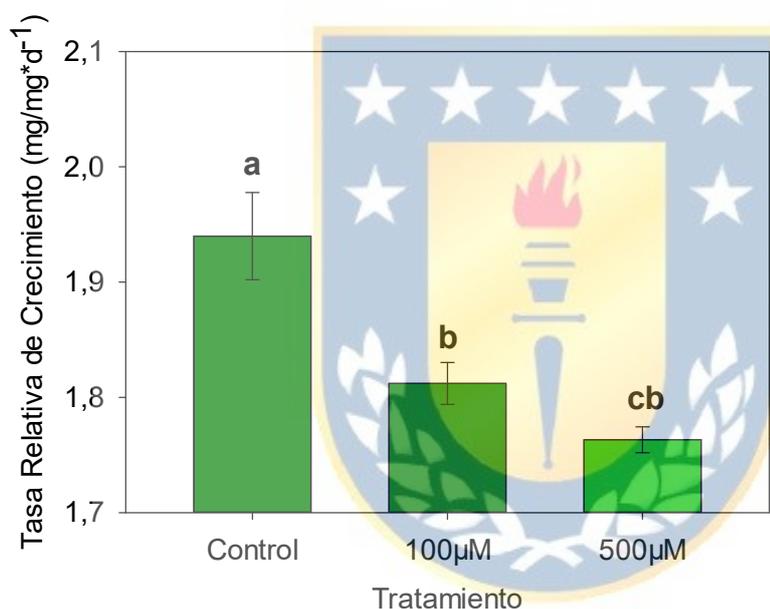


Figura 12. TCR en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0 μ M (Control), 100 μ M, 500 μ M de iones Fe³⁺ durante 28 días y posterior a 14 días en recuperación (medios libres de iones Fe³⁺). Promedio \pm SE ($n=10$). Las diferencias se consideraron significativas con un $p<0,05$.

7.6. Contenido Hídrico

No se observaron diferencias significativas en el contenido hídrico de las plántulas de *C. quitensis* provenientes de los tratamientos con diferentes concentraciones (0, 100 y 500 μ M) de iones Fe³⁺, pasados los 14 días en medio de recuperación (ausencia de iones Fe). Las plántulas evaluadas en el periodo de recuperación post 14 días en medios libres de exceso de Fe³⁺ mostraron un contenido hídrico de entre el 50% al 60%. (Fig. 13).

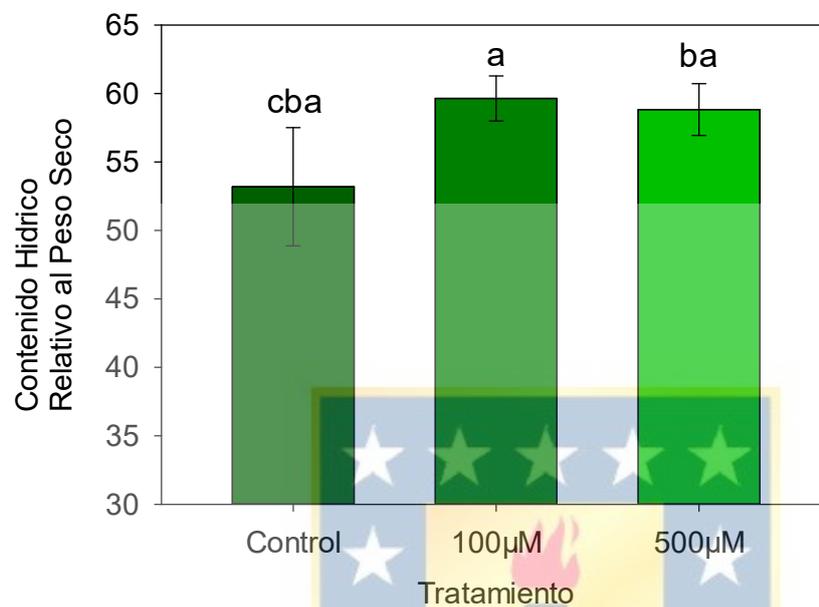


Figura 13. Contenido hídrico en plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en presencia de 0 μM (Control), 100 μM, 500 μM de iones Fe³⁺ durante 28 días y posterior a 14 días en recuperación (medios libres de iones Fe³⁺). Promedio ± SE ($n=10$). Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0,05$.

8. DISCUSIÓN

El presente estudio mostró que las semillas de *C. quitensis* no sufren pérdida de la capacidad germinativa, cambios en la velocidad de germinación (T50) ni muerte de las plántulas al adicionar una concentración de hasta 500µM de iones Fe³⁺ al medio (Tabla 1).

Las semillas no mostraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos ni entre los tratamientos. En cambio, en un estudio similar de germinación en *Arabidopsis thaliana* (W. Li et al., 2005), observaron que los metales pesados tienen efecto inhibitorio en la germinación dependiendo de la concentración a la que se les encuentre en el medio, éste estudio muestra diferencias significativas entre diferentes concentraciones de metales pesados (Pb²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺ y Cd²⁺).

Nozoe et al. (2009) evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de iones de hierro en la germinación de arroz y otras gramíneas observando que el arroz (*Oryza sativa*) y los pastos *Scirpus juncooides* y *Echinochloa oryzicola* no mostraron efectos negativos en la germinación en el rango de concentraciones evaluadas (desde 2,5 µM hasta 250 µM de iones de Fe²⁺) En estas especies estudiadas si se observó diferencias significativas en la germinación, donde incluso la especie *Cyperus difformis* no fue capaz de germinar a partir de los 25 µM de iones de Fe²⁺ (Nozoe et al. (2009). De acuerdo a estos resultados, podríamos inferir que *C. quitensis* mantendría su capacidad de germinación a concentraciones de iones de Fe más elevadas que las evaluadas en este estudio.

En este estudio se observaron diferencias significativas en las variables morfológicas evaluadas. Mientras que hubo un incremento en el número de hojas, el desarrollo radicular disminuyó en la medida que incrementó la concentración de iones de Fe evaluadas. El efecto negativo de los metales pesados en la morfología de las plantas ha sido descrito por varios autores (De la Guardia & Alcántara, 2002;

El Rasafi et al., 2016; Kobayashi & Nishizawa, 2012; G. Li et al., 2016; W. Li et al., 2005; Nozoye et al., 2007; Saaltink et al., 2017).

En general, se ha observado una disminución en el número de hojas y el área foliar en plántulas que han sido tratadas con concentraciones altas de iones Fe. Peña-Olmos et al. (2014) obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos en *Brassica oleracea*, donde el aumento de la concentración del ion de Fe disminuyó el número y área total de las hojas. A diferencia de estos resultados, en *C. quitensis* se observó un incremento en el número de hojas (Fig. 8) en la concentración más alta de iones Fe³⁺ (500 µM), por lo que podemos suponer que las concentraciones estudiadas no tienen efecto en el desarrollo aéreo de la especie.

La disminución de la longitud de la raíz observada en *C. quitensis*, concuerda con los resultados de varios autores (Adamski et al., 2012; Carlson et al., 1991; El Rasafi et al., 2016; Kim & Guerinot, 2007; Kobayashi & Nishizawa, 2012; Saaltink et al., 2017), quienes comprobaron que existía una disminución en la longitud de la raíz en la medida que se incrementó la concentración de iones Fe en el medio. La disminución de la longitud de la raíz ocurre debido a que la mayoría de las especies vegetales adoptan una estrategia de exclusión mediante la cual los metales se almacenan en la pared celular de las raíces y en las vacuolas, donde se mantienen apartados de los tejidos fotosintéticamente activos (Hanikenne & Nouet, 2011). La acumulación de iones metálicos producen daños en las membranas, el ADN y proteínas debido a la producción de radicales libres (De Dorlodot et al., 2005).

El aumento del número de raíces primarias y la disminución de raíces laterales observado en las plántulas de *C. quitensis* estuvieron directamente relacionados con el incremento de la concentración de iones Fe³⁺ presentes en el medio. Este resultado evidenció que la disponibilidad externa de Fe en este estudio afectó la arquitectura del sistema radicular en *C. quitensis* (Fig. 7).

En *A. thaliana* se observaron diferencias en el número de raíces laterales, el resultado obtenido en esta parte del estudio no tiene coincidencia con resultados descritos por Giehl et al. (2016), en donde describe un aumento en el número de raíces laterales al adicionar 200 μM iones de Fe^{3+} -EDTA al medio. Se ha demostrado que el exceso de Fe detiene el crecimiento de la raíz primaria disminuyendo el alargamiento y la división celular, por lo cual no se genera una raíz principal única (G. Li et al., 2016; Potters et al., 2009), según lo observado en los resultados obtenidos en plántulas *C. quitensis*, las raíces principales disminuyeron de longitud pero aumentaron en número.

No se observaron diferencias significativas en el contenido hídrico en ninguno de los tratamientos evaluados. En un estudio similar donde se estudió el efecto de los iones de Cu^{2+} en el desarrollo vegetativo de plántulas de *C. quitensis*, tampoco se observaron diferencias significativas en el contenido hídrico (Cuba-Díaz et al. 2017). Los efectos negativos sobre el contenido hídrico en presencia de metales pesados son consecuencia principalmente de daños en las membranas y desregulación en la homeostasis de la célula, incluso pudiéndose afectar la retención de vapor de agua en los estomas (Barceló & Poschenrieder, 1990).

La tasa relativa de crecimiento (TRC) fue positiva en todos los tratamientos evaluados (Tabla 5), lo que indica que las plántulas fueron capaces de recuperarse una vez que la fuente de Fe estuvo ausente. Las diferencias significativas observadas en la TRC (Fig. 12) están directamente en concordancia con el desarrollo morfológico diferencial observado en las plántulas germinadas en presencia de la fuente de Fe (Fig.2), el cual se mantuvo una vez que las plántulas fueron pasadas al medio de recuperación (Fig. 7). Las plantas poseen mecanismos por los cuales son capaces de captar, mover y almacenar metales pesados (Kim & Guerinot, 2007; Kobayashi & Nishizawa, 2012), como estrategias para evitar la toxicidad que estos iones podrían producir en su homeostasis en general. En este estudio *C. quitensis* fue capaz de germinar y sobrevivir en presencia de 500 μM de iones Fe^{3+} . A pesar de evidenciar efectos negativos en su desarrollo morfológico, la

modificación en la arquitectura radicular podría ser como respuesta a la presencia del agente tóxico, evitando aumentar la superficie de contacto con este (Kobayashi & Nishizawa, 2012).

Este es el primer trabajo que evidencia los efectos de la presencia de fuentes externas de hierro en la germinación y desarrollo de plántulas en *C. quitensis*. Preliminarmente, se podría inferir que ésta especie posee mecanismos para la absorción y compartimentalización de iones metálicos (ejemplo; hierro y cobre) en concentraciones que podrían ser tóxicas para el eficiente desarrollo fisiológico de las plantas.

9. CONCLUSIÓN

Colobanthus quitensis fue capaz de germinar y sobrevivir en presencia de una alta concentración de iones Fe^{3+} (500 μM).

Las concentraciones de iones Fe^{3+} evaluadas afectaron el desarrollo morfológico de las plántulas (arquitectura radicular), sin embargo, estas fueron capaces de recuperarse, con tasas relativas de crecimiento positivas, en ausencia de la fuente de iones metálicos.

A pesar de lo descrito en la literatura, *C. quitensis* fue capaz de incrementar el número de hojas en relación directa con el incremento de la concentración del ion metálica.

Esta investigación constituye la primera evidencia del efecto de los iones de Fe^{3+} en la germinación y desarrollo morfológico en *C. quitensis*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que no se rechaza la hipótesis de trabajo.

10. REFERENCIAS

- Adamski, J. M., Danieloski, R., Deuner, S., Braga, E. J. B., de Castro, L. A. S., & Peters, J. A. (2012). Responses to excess iron in sweet potato: Impacts on growth, enzyme activities, mineral concentrations, and anatomy. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(5), 1827–1836. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-0981-3>
- Alberdi, M., Bravo, L. A., Gutiérrez, A., Gidekel, M., & Corcuera, L. J. (2002). Ecophysiology of Antarctic vascular plants. *Physiologia Plantarum*, 115(4), 479–486. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150401.x>
- Arrivabene, H. P., Souza, I. da C., C6, W. L. O., Conti, M. M., Wunderlin, D. A., & Milanez, C. R. D. (2015). Effect of pollution by particulate iron on the morphoanatomy, histochemistry, and bioaccumulation of three mangrove plant species in Brazil. *Chemosphere*, 127, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.011>
- Barcel6, J., & Poschenrieder, C. (1990). Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. *Journal of Plant Nutrition*, 13(1), 1–37. <https://doi.org/10.1080/01904169009364057>
- Basra, S. M. A., Farooq, M., Tabassam, R., & Ahmad, N. (2005). Physiological and biochemical aspects of pre-sowing seed treatments in fine rice (*Oryza sativa* L.). *Seed Science and Technology*, 33(3), 623–628. <https://doi.org/10.15258/sst.2005.33.3.09>
- Briat, J. F., Lobréaux, S., Grignon, N., & Vansuyt, G. (1999). Regulation of plant ferritin synthesis: How and why. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56(1–2), 155–166. <https://doi.org/10.1007/s000180050014>
- Bungard, R. A., Mcneil, D., & Morton, J. D. (1997). Effects of chilling, light and nitrogen-containing compounds on germination, rate of germination and seed imbibition of *Clematis vitalba* L. *Annals of Botany*, 79(6), 643–650. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0391>
- Carlson, C. L., Adriano, D. C., Sajwan, K. S., Abels, S. L., Thoma, D. P., & Driver, J. T. (1991). Effects of selected trace metals on germinating seeds of six plants species. *Water, Air, and Soil Pollution*, 59, 231–240. <https://doi.org/10.1007/BF00211832>
- Castro-díez, A. P., Puyravaud, J. P., & Cornelissen, J. H. C. (2017). International Association for Ecology Stem Anatomy and Relative Growth Rate in Seedlings of a Wide Range of Woody Plant Species and Types Published by: Springer in cooperation with International Association for Ecology Stable URL : <http://www.jstor.org/s>. *Oecologia*, 116(1), 57–66.
- Cheng, S. (2003). Heavy metals in plants and phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 10(5), 335–340. <https://doi.org/10.1065/espr2002.11.141.3>
- Contreras, P., & Cuba-Díaz, M. (2015). Morpho.physiological in four populations of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. In *X Plant Biology Meeting* (p. 187).
- Coolbear, P., Francis, A., & Grierson, D. (1984). The effect of low temperature pre-sowing treatment on the germination performance and membrane integrity of artificially aged tomato seeds. *Journal of Experimental Botany*, 35(11), 1609–1617. <https://doi.org/10.1093/jxb/35.11.1609>
- Cuba-Díaz, M., Acuña, D., & Fuentes-Lillo, E. (2019). Antarctic pearlwort (*Colobanthus quitensis*) populations respond differently to pre-germination treatments. *Polar Biology*,

- 42(6), 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(01), 45–46. <https://doi.org/10.1017/S0954102016000432>
- Cuba-Díaz, M., Marín, C., Castel, K., Machuca, Á., & Rifo, S. (2017). *Effect of copper (II) ions on morpho-physiological and biochemical variables in Colobanthus quitensis*. 17(2), 429–440. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017005000031>
- Cuba - Díaz, M., Acuña, D., Cordero, C., & Klagges, M. (2014). Optimización de parámetros para la propagación in vitro de *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Gayana Bot.*, 71(1), 58–67.
- De Dorlodot, S., Lutts, S., & Bertin, P. (2005). Effects of ferrous iron toxicity on the growth and mineral composition of an interspecific rice. *Journal of Plant Nutrition*, 28(1), 1–20. <https://doi.org/10.1081/PLN-200042144>
- De la Guardia, M. D., & Alcántara, E. (2002). A comparison of ferric-chelate reductase and chlorophyll and growth ratios as indices of selection of quince, pear and olive genotypes under iron deficiency stress. *Plant and Soil*, 241(1), 49–56. <https://doi.org/10.1023/A:1016083512158>
- El Rasafi, T., Nouri, M., Bouda, S., & Haddioui, A. (2016). The Effect of Cd, Zn and Fe on Seed Germination and Early Seedling Growth of Wheat and Bean. *Ekológia (Bratislava)*, 35(3), 213–223. <https://doi.org/10.1515/eko-2016-0017>
- Ghosh, S., & Sethy, S. (2013). Effect of heavy metals on germination of seeds. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 4(2), 272. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.116964>
- Giehl, R., Lima, J., & Von Wirén, N. (2016). Localized Iron Supply Triggers Lateral Root Elongation in Arabidopsis by Altering the AUX1- Mediated Auxin Distribution. *The Plant Cell*, 23(1), 412–427.
- Goiba, P. K., Durgude, A. G., Pharande, A. L., Kadlag, A. D., Chauhan, M. R., & Nimbalkar, C. A. (2018). Effect of seed priming with iron and zinc on yield contributing parameters as well as the nutrient uptake of the soybean (*Glycine max*) in calcareous soil. *International Journal Of Chemical Studies*, 6(2), 758–760. <http://www.chemijournal.com/archives/2018/vol6issue2/PartK/6-1-236-815.pdf>
- Guerinot, M. L., & Yi, Y. (1994). Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. *Plant Physiology*, 104(3), 815–820. <https://doi.org/10.1104/pp.104.3.815>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation An update. *FEBS Letters*, 307(1), 108–112. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80911-Y](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80911-Y)
- Hanikenne, M., & Nouet, C. (2011). Metal hyperaccumulation and hypertolerance: A model for plant evolutionary genomics. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.04.003>
- Harrison, P. M., & Arosio, P. (1996). The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1275(3), 161–203. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(96\)00022-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(96)00022-9)

- Kellmann-Sopyła, W., Koc, J., Górecki, R. J., Domaciuk, M., & Gielwanowska, I. (2017). Development of generative structures of polar Caryophyllaceae plants: the Arctic *Cerastium alpinum* and *Silene involucrata*, and the Antarctic *Colobanthus quitensis*. *Polish Polar Research*, 38(1), 83–104. <https://doi.org/10.1515/popore-2017-0001>
- Kim, S. A., & Guerinot, M. Lou. (2007). Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters*, 581(12), 2273–2280. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.043>
- Klagges, M., Cordero, C., & Cuba-Díaz, M. (2013). Las poblaciones de *Colobanthus quitensis* presentan diferenciaciones morfo-fisiológicas que podrían evidenciar la formación de ecotipo en su hábitat. *Libro de Resúmenes VII Congreso Latinoamericano de Ciencia Antártica, August 2016*, 49–52.
- Kobayashi, T., & Nishizawa, N. K. (2012). Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 131–152. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105522>
- Li, G., Kronzucker, H. J., & Shi, W. (2016). The Response of the Root Apex in Plant Adaptation to Iron Heterogeneity in Soil. *Frontiers in Plant Science*, 7(March), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00344>
- Li, W., Khan, M. A., Yamaguchi, S., & Kamiya, Y. (2005). Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 46(1), 45–50. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-6324-2>
- López-Arredondo, D. L., Leyva-González, M. A., Alatorre-Cobos, F., & Herrera-Estrella, L. (2013). Biotechnology of nutrient uptake and assimilation in plants. In *International Journal of Developmental Biology* (Vol. 57, Issues 6–8, pp. 595–610). <https://doi.org/10.1387/ijdb.130268lh>
- Marín, C. (2015). *Efecto de los iones cobre(II) sobre los mecanismos bioquímicos y morfo-fisiológicos de tolerancia en cuatro poblaciones de Colobanthus quitensis*.
- Milner, M. J., & Kochian, L. V. (2008). Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system. *Annals of Botany*, 102(1), 3–13. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn063>
- Moore, D. (1970). Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. and *Deschampsia antarctica* Desv. II. Taxonomy, distribution and relationships. *Br Br Antarct Surv Bull*, 23, 63–80.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Navarrete, A., Bravo, L. A., Molina, M., & Corcuera, L. J. (2012). Respuestas antioxidantes en dos ecotipos de *Colobanthus quitensis* (Caryophyllaceae) expuestos a alta radiación UV-B y baja temperatura. *Revista Chilena de Historia Natural*, 85, 419–433.
- Nozoe, T., Tachibana, M., Uchino, A., & Yokogami, N. (2009). Effects of ferrous iron (Fe) on the germination and root elongation of paddy rice and weeds. *Weed Biology and Management*, 9(1), 20–26. <https://doi.org/10.1111/j.1445-6664.2008.00314.x>

- Nozoye, T., Inoue, H., Takahashi, M., Ishimaru, Y., Nakanishi, H., Mori, S., & Nishizawa, N. K. (2007). The expression of iron homeostasis-related genes during rice germination. *Plant Molecular Biology*, *64*(1–2), 35–47. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9132-4>
- Peña-Olmos, J. E., Casierra-Posada, F., & Olmos-cubides, M. A. (2014). The effect of high iron doses (Fe^{2+}) on the growth of broccoli plants (*Brassica oleracea* var . *Italica*). *Crop Physiology*, *32*(1), 22–28. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v32n1.42060>
- Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., & Jansen, M. A. K. (2009). Different stresses, similar morphogenic responses: Integrating a plethora of pathways. *Plant, Cell and Environment*, *32*(2), 158–169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01908.x>
- Pound, M. P., French, A. P., Atkinson, J. A., Wells, D. M., Bennett, M. J., & Pridmore, T. (2013). RootNav: Navigating Images of Complex Root Architectures. *Plant Physiology*, *162*(4), 1802–1814. <https://doi.org/10.1104/pp.113.221531>
- Ravet, K., Touraine, B., Boucherez, J., Briat, J. F., Gaymard, F., & Cellier, F. (2009). Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Journal*, *57*(3), 400–412. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03698.x>
- Roschzttardtz, H., Conéjéro, G., Curie, C., & Mari, S. (2009). Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the Arabidopsis embryo. *Plant Physiology*, *151*(3), 1329–1338. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144444>
- Roschzttardtz, H., Grillet, L., Isaure, M. P., Conéjéro, G., Ortega, R., Curie, C., & Mari, S. (2011). Plant cell nucleolus as a hot spot for iron. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(32), 27863–27866. <https://doi.org/10.1074/jbc.C111.269720>
- Saaltink, R. M., Dekker, S. C., Eppinga, M. B., Griffioen, J., & Wassen, M. J. (2017). Plant-specific effects of iron-toxicity in wetlands. *Plant and Soil*, *416*(1–2), 83–96. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3190-4>
- Sanhueza, C., Vallejos, V., Cavieres, L. A., Saez, P., Bravo, L. A., & Corcuera, L. J. (2016). Growing temperature affects seed germination of the antarctic plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl (Caryophyllaceae). *Polar Biology*, *June*. <https://doi.org/10.1007/s00300-016-1972-4>
- Stacey, M. G., Patel, A., McClain, W. E., Mathieu, M., Remley, M., Rogers, E. E., Gassmann, W., Blevins, D. G., & Stacey, G. (2007). The Arabidopsis AtOPT3 Protein Functions in Metal Homeostasis and Movement of Iron to Developing Seeds. *Plant Physiology*, *146*(2), 589–601. <https://doi.org/10.1104/pp.107.108183>
- Systat Software Inc. (2012). *SigmaPlot* (No. 12). <https://systatsoftware.com/>
- Wu, G., Kang, H., Zhang, X., Shao, H., Chu, L., & Ruan, C. (2010). A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *Journal of Hazardous Materials*, *174*(1–3), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.09.113>