

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



**Estrategias para promover la germinación *in vitro* de
Colobanthus quitensis (Kunth.) Bartl. (Caryophyllaceae)**

PROYECTO DE TÍTULO
PRESENTADO PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

Constanza Paz Salgado Espinoza
LOS ÁNGELES - CHILE
2023

**Estrategias para promover la germinación *in vitro* de *Colobanthus quitensis*
(Kunth.) Bartl. (Caryophyllaceae)**

Alumna

**Constanza Paz Salgado Espinoza
Ingeniero en Biotecnología Vegetal**

Profesora Guía

**Dra. Marely Cuba Díaz
Profesor Titular**

Co-guía

**Yadiana Ontivero Vasallo
C. Dra. Cs de la Agronomía
Biólogo**

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 momento de mirar hacia atrás y percatarme de mi proceso universitario, es imposible no sentir un sin fin de emociones y ver hasta donde he podido llegar, y darme cuenta de quienes han estado conmigo en todo este proceso y en cada paso.

De manera inicial quiero agradecerles a mis padres María Teresa Salgado y Felipe Cabezas, quienes siempre han estado al lado mío dándome ánimos y apoyo en cada momento, agradecerles por nunca cortarme las alas y por dejarme ser como soy, en especial a mi mami por siempre contestar y estar en los momentos en que yo más la necesito, gracias mamá por absolutamente todo, todo lo que soy es por ellos. Agradecerle a mi tata, quien es mi segundo papá, por siempre estar para mi cuando lo necesito, por todas esas veces que me ha salvado en todo ámbito de mi vida, también agradecerle a mi abuela, quien no está físicamente con nosotros pero que, sin duda, durante toda mi infancia fue un motor para salir adelante, siendo ella un gran ejemplo de mujer trabajadora e independiente y quien siempre quiso que mi futuro fuera igual e incluso mejor, a ella un beso al cielo y sé que está conmigo en cada momento.

No puedo dejar atrás a mis pollos quienes son mi motor día a día, en especial mis hermanas quienes siempre han estado para darme apoyo moral y consolarme cuando yo ya no podía más, y a mi hermanito quien llegó a mi vida a llenarla de luz y alegría, por ustedes soy todo y pretendo ser mejor día a día y son quienes están en cada momento de mi vida presente, los amo y gracias por hacerme feliz, día a día.

Agradecerles a mis mejores amigos Consu, Nati y Seba por estar a mi lado, por escucharme, aunque no entiendan nada, y por simplemente acompañarme siempre. A mis amigos de afuera también agradecerles por siempre decirme que yo lo iba a lograr, Julio, Pauli, Seba, Karencilla, Oscar, y también a mis amigas de universidad quienes no saben lo mucho que han marcado mi vida en general, Thiare, Marce, Soe, Vjeru, Gaby, Fran, Cote y Barbi, sin duda mis amigas y futuras colegas han sido un impulso en todos estos años y nos hemos hecho la vida mucho más linda, a todos ellos los quiero mucho y simplemente gracias.

A mi profesora guía Dra Marely Cuba, por siempre creer en mí, y por ayudarme a crecer dentro de mi área, y por nunca darse por vencida conmigo, y también a mi co guía Yadiana ya que durante todo el proceso de tesis nos hemos apoyado mutuamente y por siempre darme ánimos y exigirme porque sabe que así trabajo.

A todos ellos gracias y gracias, no se imaginan el gran impulso y lo mucho que han marcado mi vida.

Agradecer a mis gatas por acompañarme en todas esas noches de desvelo, si mami le agradezco a mis gatas también jaja

Simplemente gracias y los quiero.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	17
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Bancos de germoplasma.....	19
2.2 <i>Colobanthus quitensis</i>	20
2.3 Alternativas para potenciar la germinación.....	21
2.4 Quitina y sus derivados.....	22
2.5 Tratamiento osmótico	23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Material vegetal	25
5.2 Experimento 1: Censo de las semillas	26
5.3 Experimento 2: Efecto del tiempo de conservación en la capacidad de germinación de las poblaciones de <i>C. quitensis</i>	27
5.3.1 Prueba de germinación	27
5.3.2 Análisis de la pérdida de la germinación de <i>C. quitensis</i> con el tiempo de conservación.....	28
5.4 Experimento 3: Modificación del medio basal de germinación de <i>C. quitensis</i>	28
5.4.1 Porcentaje de germinación	28
5.4.2 Tiempo medio de germinación (MGT)	28
5.4.3 Velocidad de germinación (T50).	29
5.5 Experimento 4: Pruebas de germinación de semillas en medio con derivados de quitina	29
5.5.1 Preparación de medios con productos de quitina	29

5.6 Experimento 5: Pruebas de tratamiento osmótico	30
5.7 Diseño experimental y análisis estadístico.....	31
6. RESULTADOS	31
6.1 Experimento 1: Censo de semillas de <i>C. quitensis</i>	31
6.2 Experimento 2: Capacidad de germinación de las poblaciones de <i>C. quitensis</i> con el tiempo de conservación.....	32
6.2.1 Prueba de germinación <i>C. quitensis</i> sin tener en cuenta el factor poblacional.	34
6.3 Experimento 3: Modificación del medio basal de germinación de <i>C. quitensis</i>	34
6.3.1 Porcentaje de germinación de semillas sembradas en medios con distintas concentraciones de MS	34
6.3.2 Tiempo medio de germinación de semillas sembradas en medios con distintas concentraciones de MS.....	35
6.3.3 Velocidad de germinación (T50) de semillas sembradas en medios con distintas concentraciones de MS.....	36
6.4 Experimento 4: Pruebas de germinación de semillas en medio con componentes de quitina	37
6.5 Experimento 5: Pruebas de tratamiento osmótico	39
6.5.1 Porcentaje de germinación en semillas con tratamiento osmótico	39
6.5.2 Tiempo medio de germinación (MGT) en semillas con tratamiento osmótico	39
6.5.3 Velocidad de germinación (T50) en semillas con tratamiento osmótico...	40
7. DISCUSIÓN.....	41
7.1 Experimento 1: Censo de semillas de <i>C. quitensis</i>	41
7.2 Experimento 2: Capacidad de germinación de diferentes poblaciones de <i>C. quitensis</i> en relación con el tiempo de conservación.....	42
7.2.1 Prueba de germinación <i>C. quitensis</i> a nivel de especie.....	43

7.3 Experimento 3: Modificación del medio de germinación de <i>C. quitensis</i>	43
7.4 Experimento 4: Pruebas de germinación de semillas en medio basal con componentes de quitina.....	44
7 5 Experimento 5: Pruebas con tratamientos osmóticos.....	45
8. CONCLUSIONES	46
9. BIBLIOGRAFÍA	48
10. ANEXOS	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sitios de recolección de las poblaciones de *Colobanthus quitensis*. 25

Tabla 2. Tratamientos con productos de quitina (CHT y NANOF) incorporado en el medio basal modificado (agar + sacarosa) de germinación para semillas de *Colobanthus quitensis* a pH 5.5..... 29

Tabla 3. Tratamientos osmóticos empleados para estimular la germinación *Colobanthus quitensis* aplicado 24 horas previas a su sembrado en medio basal de germinación modificado (agar + sacarosa)..... 30

Tabla 4. Censo de semillas de diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* de la colección del LBEA. En el cuadro de los meses, se hace referencia al periodo de tiempo (meses) que llevaban almacenadas las semillas al momento del censo. El periodo se clasifico en S1 (enero-febrero-marzo), S2 (abril-mayo-junio), S3 (julio-agosto-septiembre) y S4 (octubre-noviembre-diciembre)..... 31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización de diferentes poblaciones de *C. quitensis*. Distribución de las poblaciones La Parva (pPar), Conguillío (pC), Vega (pV), Laredo (pL), La Marisma (pPA) y Omora (pOm) Chile. B) Acercamiento del pasaje del Drake donde se localizan c) las Shetland del Sur y se distribuyen las poblaciones Península Byers (pBy), Punta Hannah (pH), Arctowski (pA) y Elefante (pEl) (Koc et al., 2018, modificado por Arroyo 2023). Con flecha roja se señalan las poblaciones estudiadas en esta investigación.

26

Figura 2. Semillas de *Colobanthus quitensis* sobre papel milimetrado. 27

Figura 3. Porcentaje de germinación en semillas de las poblaciones de *Colobanthus quitensis* con distintos tiempos de conservación (mes 1 hasta mes 84 de almacenamiento). a) población Hannah (pH); b) Arctowski (pA); c) La Marisma (pPA); d) Laredo (pL) y e) Conguillío (pC). Todos los tratamientos se evaluaron hasta los 30 días desde la siembra. Las barras representan el promedio $\pm$ DS (n= 15, 4 réplicas). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía seguido de un test de Tuckey HSD ($p \leq 0,05$). 33

Figura 4. Porcentaje de germinación de *Colobanthus quitensis* en función del tiempo de conservación obviando el factor poblacional. Se evaluó a los 30 días desde su sembrado. Las barras representan el promedio $\pm$ DS (n= 15, 4 réplicas). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía seguido de un test de Tuckey HSD ($p \leq 0,05$). 34

Figura 5. Porcentaje de germinación de semillas de *Colobanthus quitensis* sembradas en medios con distinta concentración (%) de Murashige y Skoog (MS) Todos los tratamientos se evaluaron hasta los 30 días desde su sembrado. Las barras representan el promedio $\pm$ DS (n= 15, 4 réplicas). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía seguido de un test de Tuckey HSD ($p \leq 0,05$). 35

Figura 6. Tiempo medio de germinación de semillas (días) de *Colobanthus quitensis* sembradas en medios con distinta concentración de Murashige y Skoog (MS). Todos

los tratamientos se evaluaron hasta los 30 días desde su sembrado. Las barras representan el promedio $\pm$ DS (n= 15, 4 réplicas) utilizando un total de 240 semillas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía seguido de un test de Tuckey HSD ($p \leq 0,05$).....36

Figura 7. Tiempo al que se alcanza el 50% de la germinación (T50) de las semillas de *Colobanthus quitensis* sembradas en medios con distintas concentraciones de Murashige y Skoog (MS). Todos los tratamientos se evaluaron hasta los 30 días desde su sembrado. Las barras representan el promedio $\pm$ DS (n= 15, 4 réplicas) utilizando un total de 240 semillas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía seguido de un test de Tuckey HSD ($p \leq 0,05$).37

Figura 8. Porcentaje de germinación (a), tiempo medio de germinación (b) y T50 (c) de semillas de *Colobanthus quitensis* en medios de cultivo *in vitro* con productos derivados de quitina añadidos al medio. Todos los tratamientos se evaluaron hasta los 30 días desde su sembrado. Las barras representan el promedio $\pm$ DS (n= 15, 4 réplicas) utilizando un total de 300 semillas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía seguido de un test de Tuckey HSD ($p \leq 0,05$).38

ÍNDICE DE ANEXOS

Tabla Anexo 1: Tabla de datos del n muestral utilizado para el experimento 2. ... 58

Figura Anexo 1: Plantas de *Colobanthus quitensis* cultivadas en Jardín Común en el Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales, de las cuales se colectan las semillas usadas en los estudios de germinación *in vitro*. Las plantas crecen en cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad a una temperatura de $13 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 59

Figura Anexo 2: Largo radicular de plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en medio con distintos porcentajes (%) de concentración de Murashige y Skoog (MS). La medición se realizó al finalizar el ensayo (día 30). Se realizó test de una vía Tuckey HSD. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)..... 60

Figura Anexo 3: Plántulas de *Colobanthus quitensis* al finalizar el ensayo preliminar de productos de quitina (Quitosano y Nanofibras de quitina), para hacer comparación en la diferencia del largo radicular. En medio basal de 100% de MS y ajustado a pH 5.5 para evitar grumos. Las fotos fueron tomadas a los 60 días desde el experimento. a) Medio MS 100% + Nanofibras de quitina (NANOF) 5%, PH 5.5; b) Medio MS 100% + Nanofibras de quitina (NANOF) 10%, PH 5.5; c) Medio MS 100% + quitosano (CHT) 5%, PH 5.5; d) Medio MS 100% + quitosano (CHT) 10%, PH 5.5; e) Medio MS 100%, PH 5.5. 61

Figura Anexo 4: Largo radicular de plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en medio modificado (Agar + Sacarosa) más concentraciones de productos de quitina (Nanofibras de quitina (NANOF) y quitosano (CHT)), la medición se realizó al finalizar el ensayo (día 30). Se realizó test de una vía Tuckey HSD. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p > 0,05$)..... 62

Figura Anexo 5: Plántulas de *Colobanthus quitensis* a los 30 días post ensayo de germinación, en medios Agar + Sacarosa pH 5.7, Con tratamiento osmótico aplicado a las semillas de *Colobanthus quitensis* 24 horas previas al sembrado. a) control, se aplica agua destilada a las semillas; b) Polietilenglicol (PEG) al 5%; c) Polietilenglicol (PEG) al 10%; d) Cloruro de potasio (KCl) al 5% y e) Cloruro de potasio (KCl) al 10%.

Figura Anexo 6: Largo radicular de plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en medio modificado (Agar + Sacarosa) sometidas a tratamiento osmótico previo a la siembra. La medición se realizó al finalizar el ensayo (día 30). Se realizó test de una vía Tuckey HSD. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p > 0,05$). ... 64

Figura Anexo 7: Plántulas de *Colobanthus quitensis* a los 30 días post ensayo de germinación, en medios con diferentes porcentajes del medio basal Murashige y Skoog (MS) (a)100%, b)50%, c)25% y d)0%). Se empieza a apreciar el amarillamiento de las plantas y las diferencias en el desarrollo radicular. En condiciones de cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 65

LISTA DE ABREVIATURAS

▪ A + S	Agar más Sacarosa
▪ ANOVA	Análisis de varianza
▪ CHT	Quitosano
▪ K⁺	Ion potasio
▪ KCl	Cloruro de Potasio
▪ LBEA	Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales
▪ MS	Medio de cultivo Murashige Skoog
▪ Mg	Miligramo
▪ mg/L	Miligramo por litro
▪ MGT	Tiempo medio de germinación
▪ mL	Mililitro
▪ msnm	Metro sobre el nivel del mar
▪ NANOF	Nanofibras de quitina
▪ NaOCl	Hipoclorito de sodio
▪ P	Valor p
▪ pA	Población Arctowski
▪ pByers	Población Península Byers
▪ pC	Población Conguillío
▪ PEG	Polietilenglicol
▪ PG	Porcentaje de germinación
▪ pH	Población Punta Hannah
▪ pL	Población Laredo
▪ pOm	Población Omora
▪ pPA	Población La Marisma
▪ pPAr	Población La Parva
▪ pV	Población La Vega

RESUMEN

Para los bancos de germoplasma enfocados en semillas, el mayor desafío es mantener la calidad fisiológica del material durante un largo período de tiempo. Para promover la germinación, se han evaluado alternativas como el tratamiento de semillas con hormonas vegetales, con quitina y sus derivados y estratificación de semillas en frío. Se han encontrado resultados alentadores utilizando concentraciones exógenas de giberelinas, ácido indolacético y melatonina, pero su alto costo limita su accesibilidad. En busca de optimizar la germinación en *Colobanthus quitensis*, una planta que crece en condiciones extremas como la Antártica y sobre la cual se realizan varios estudios de adaptación a estrés abiótico, en este estudio se evaluó el efecto del tiempo de conservación, la modificación del medio de germinación y diferentes tratamientos osmóticos en la capacidad de germinación *in vitro* de las semillas. Se encontró que un medio sin adición de nutrientes (agar + sacarosa) promueve una mayor germinación en comparación a medios con diferentes concentraciones del medio basal Murashige y Skoog (MS). El tratamiento osmótico con PEG y KCl demostró ser efectivo para mejorar la germinación de las semillas. Los productos a base de quitina, en las concentraciones probadas, no mostraron mejoras significativas en la germinación. Se concluye que, el tiempo de conservación afecta significativamente la germinación de las semillas de *C. quitensis*, y la modificación del medio de germinación y el tratamiento osmótico pueden mejorar este proceso. Estos resultados son fundamentales para la propagación y conservación adecuada de *C. quitensis* en bancos de germoplasma. Se sugiere continuar investigando y optimizando los tratamientos para aumentar la viabilidad de las semillas y facilitar la investigación con esta especie. Además, se recomienda investigar posibles mecanismos de dormancia y analizar su influencia en la germinación de las semillas de *C. quitensis*.

ABSTRACT

For germplasm banks focused on seeds, the major challenge is to maintain the physiological quality of the material over a long period of time. To promote germination, alternatives such as seed treatment with plant hormones, chitin and its derivatives and cold stratification of seeds have been evaluated. Encouraging results have been found using exogenous concentrations of gibberellins, indolacetic acid and melatonin, but their high cost limits their accessibility. In search of optimizing germination in *Colobanthus quitensis*, a plant that grows in extreme conditions such as Antarctica and on which several studies of adaptation to abiotic stress have been carried out, this study evaluated the effect of storage time, modification of the germination medium and different osmotic treatments on the *in vitro* germination capacity of seeds. A medium with no nutrient addition (agar + sucrose) was found to promote higher germination compared to media with different concentrations of Murashige and Skoog (MS) basal medium. Osmotic treatment with PEG and KCl proved to be effective in improving seed germination. Chitin-based products, at the concentrations tested, did not show significant improvements in germination. It is concluded that, storage time significantly affects the germination of *C. quitensis* seeds, and modification of the germination medium and osmotic treatment can improve this process. These results are fundamental for the proper propagation and conservation of *C. quitensis* in germplasm banks. It is suggested to continue investigating and optimizing treatments to increase seed viability and facilitate research with this species. In addition, it is recommended to investigate possible dormancy mechanisms and analyze their influence on the germination of *C. quitensis* seeds.

1. INTRODUCCIÓN

Los bancos de germoplasma tienen como objetivo conservar plantas de interés, optimizar su conservación y brindar conocimientos científicos sobre el uso de los recursos fitogenéticos (Cortés et al. 2017). El mayor reto de los bancos de germoplasma enfocados en la conservación de semillas es mantener un material con alta calidad fisiológica durante el mayor tiempo posible (FAO, 2014).

Colobanthus quitensis (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) se distribuye desde México hasta la península Antártica desarrollándose en condiciones de fuertes vientos, bajas temperaturas, baja disponibilidad de nutrientes, déficit hídrico, alta radiación UV, aerosoles de agua salada y cobertura de nieve (Alberdi et al. 2002; Smith, 2003; Chwedorzewska, 2009), por lo que sus mecanismos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y genéticos han sido estudiados (Cuba-Díaz et al. 2014; 2017b; Koc et al. 2018). Por esta razón, *C. quitensis* puede ser empleada como modelo para estudios ecofisiológicos sobre estrés ambiental (Cuba-Díaz et al. 2014; 2019). La inaccesibilidad a las áreas de distribución es una limitante para el desarrollo de investigaciones que utilizan a *C. quitensis* como planta modelo; por lo que, nueve de sus poblaciones se propagan en el Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales (LBEA) de la Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles, lo que ha generado la creación de una colección activa de germoplasma. Con el desarrollo de pruebas de germinación, se ha observado que algunas poblaciones de *C. quitensis* tienen dificultades para germinar, lo que se ha relacionado con la presencia de dormancia (Gielwanowska et al. 2011; Cuba-Díaz et al. 2019) o al deterioro producto del tiempo de conservación. Los problemas germinativos dificultan la propagación de la especie en condiciones controladas y, por tanto, el correcto funcionamiento de la colección de plantas antárticas del LBEA.

Existen variadas alternativas para promover la germinación como el empleo de la estratificación de semillas en frío o la escarificación con ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Pipinis et al. 2017; Cuba-Díaz et al. 2019), el tratamiento con hormonas vegetales (Tourmi et al. 2017) o el tratamiento osmótico (De Carvalho et al. 2017). La efectividad de estos tratamientos depende de la especie, aunque la meta es encontrar la

alternativa más económica que promueva en mayor medida la capacidad de germinación de las semillas (Coelho y Romano 2021; Mihir et al. 2022).

El tratamiento de las semillas con concentraciones exógenas de giberelinas, ácido indolacético y melatonina contribuye a incrementar la germinación y aumenta la cantidad de pelos radicales, con lo que se incrementa la captación de nutrientes promoviendo el crecimiento y rendimiento de las plantas (Park et al. 2005; Carranza et al. 2016). A pesar de la eficacia de estas hormonas, su costo es elevado, lo que dificulta su accesibilidad (Álvarez et al. 2020) y existen reportes donde se considera que la acumulación de hormonas es un factor que puede afectar de forma positiva o negativa en la germinación de las semillas (Kosakivska et al. 2019). Una alternativa para mejorar el proceso germinativo se centra en modificar el medio de germinación (Miransari y Smith, 2014) utilizando, entre otros, productos naturales a base de quitina; los cuales son económicos y han favorecido el proceso germinativo en especies como *Dendrobiun digibbum* var. *Compactum* CT White (orquídea cooktown) y *Dendrobium formosum* Roxb. Ex Lindl (Coelho y Romano, 2021). Por otro lado, el osmo-acondicionamiento o tratamiento osmótico de las semillas con sales puede promover la capacidad de germinación, ya que regula la tasa de absorción de agua de las semillas contribuyendo a la uniformidad del crecimiento inicial de las plántulas (Marín et al. 2007; Yang et al. 2021). En el manejo de *C. quitensis* son pocas las experiencias que evalúan estrategias que estimulan la germinación, por lo que, el objetivo de esta investigación es evaluar alternativas para potenciar la germinación de las semillas de *C. quitensis in vitro*. Esta investigación contribuye al cumplimiento de dos de Los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la agenda 2030 de las Naciones Unidas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bancos de germoplasma

Los bancos de germoplasma son colecciones de material vivo en forma de semillas, bulbos, polen y esporas que se conservan a temperaturas entre -20°C y 4°C, aunque se pueden conservar a -196°C (criopreservación); para mantener el material con óptima calidad fisiológica por el mayor tiempo posible (Solberg et al. 2020). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO): “los bancos de germoplasma desempeñan un papel fundamental en la conservación, la disponibilidad y el uso de una amplia diversidad fitogenética para la mejora de los cultivos y con ello la seguridad alimentaria y nutricional”. Además de asegurar la disponibilidad continua de los recursos fitogenéticos para futuras investigaciones, reproducciones y mejora del suministro de semillas para un sistema agrícola sostenible y resiliente (Cortés et al. 2017).

La conservación de semillas en bancos de germoplasma es la forma más eficaz de conservar, compartir y mejorar genéticamente la agrobiodiversidad (Whitthehouse et al. 2020). Cada especie requiere de protocolos de almacenamiento propios para optimizar su conservación. Los bancos de germoplasma verifican la calidad fisiológica de sus semillas mediante el desarrollo de pruebas de germinación y análisis de vigor (Mangena, 2021). Para el correcto desarrollo de estas pruebas, se deben conocer las características de las especies que se están analizando (Yang et al. 2021). La inadecuada conservación de semillas genera su deterioro, el cual está asociado con la pérdida de la integridad de las membranas celulares, cambios en las actividades enzimáticas, disminución en la actividad de las proteínas y en la síntesis de ácidos nucleicos, así como daños en el ADN (Arellano et al. 2022).

Desde 2009 en el Campus Los Ángeles de la Universidad de Concepción, se mantiene una colección de especies vasculares antárticas, donde se mantienen diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis*, así como ejemplares de *Deschampsia antarctica* (segunda especie nativa de la Antártica) y de las especies no nativas de *Poa annua* y *Juncus bufonius*. Esto ha permitido la obtención de una colección de semillas de *C. quitensis* provenientes de su propagación y crecimiento

en condiciones controladas en el LBEA. *C. quitensis*, ha sido ampliamente estudiada dentro del LBEA por su potencial aplicación biotecnológica orientada en el perfeccionamiento de protocolos de cultivo *in vitro* (Acuña, 2014; Cuba-Díaz et al. 2014, 2020; Burgos, 2020), su respuesta fisiológica a la salinidad (Kastel, 2014; Klagges, 2015; Cuba-Díaz et al. 2017a), los efectos de los iones de Fe^{3+} en la germinación (Farías, 2018) y además del manejo y análisis de semillas en los bancos de germoplasma (Cuba-Díaz et al. 2019; Vásquez, 2019). De las cuales, varias de estas líneas de investigación, continúan actualmente en desarrollo en el LBEA.

2.2 *Colobanthus quitensis*

Colobanthus quitensis (Kunth) Bartl. Pertenece a la familia Caryophyllaceae, comúnmente conocida como perla o clavelito antártico, se distribuye desde los 17°N (México) hasta los 68°S (Península Antártica) y en 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). Esta amplia distribución latitudinal y altitudinal (Moore 1970) ha contribuido a la variabilidad fenotípica y genética en sus poblaciones (Gianoli et al. 2004; Cuba-Díaz et al. 2017b). Para realizar investigaciones sin necesidad de acceder a sus zonas naturales de distribución, es vital poseer material vegetal de diferentes poblaciones que representan su diversidad genética, lo que se ha logrado mediante su propagación en condiciones de laboratorio (Sanhueza et al. 2017; Cuba-Díaz et al. 2014, 2019, 2020). Esto ha permitido generar un banco de semillas producidas *ex situ*, donde se han observado rápidas pérdidas de germinación (Cuba-Díaz et al. 2019), cuya causa aún no se ha definido.

La propagación en condiciones de laboratorio ha permitido identificar que la germinación de *C. quitensis* se prolonga entre los 30 a 60 días (Kellmann-Sopyla y Gielwanowska, 2015; Farías, 2018; Cuba-Díaz et al. 2019), aunque su tiempo medio de germinación se encuentra entre los días 11 y 20 (Sanhueza et al. 2017). Diversas investigaciones se han enfocado en analizar en qué condiciones de estrés, *C. quitensis* es capaz de germinar y cómo esto influye sobre los índices germinativos (Cuba-Díaz et al. 2015; Sanhueza et al. 2017; Vásquez 2017; Farías 2018; Dulská et al. 2019). Sin embargo, pocos hacen alusión al empleo de alternativas para promover

este proceso, uno de los cuales se centró en el efecto de la escarificación con ácido sulfúrico y la estratificación en frío (Cuba-Díaz et al., 2019). A pesar de esto, las poblaciones antárticas mantienen porcentajes de germinación bajos, mientras que el tiempo de germinación es elevado (Cuba-Díaz et al. 2019), por lo que se deben buscar alternativas para favorecer este proceso.

2.3 Alternativas para potenciar la germinación

Una de las primeras causas que genera problemas germinativos es el empleo de protocolos inadecuados de germinación, por lo que la modificación de factores externos como la iluminación, temperatura y humedad pueden ser la respuesta a este problema (Varela et al. 2011). En estudios de germinación en lentejas, se observó que el empleo de luz continua favorece este proceso y modifica los perfiles polifenólicos y la actividad biológica de las semillas (Swieca et al. 2012; Ostojic et al. 2022). Mientras que la modificación del tratamiento osmótico y/o la temperatura a la que están sometidas las semillas de *Amaranthus dubius* (Moyo et al. 2022) y *Prosopis laevigatta* aumenta su germinación (Contreras-Navarrete et al. 2021; Bhatt et al. 2022).

Cuando los problemas en la germinación se mantienen aún en presencia de condiciones óptimas y un buen protocolo de germinación, se pueden emplear alternativas para potenciar este proceso, por ejemplo, el empleo de hormonas sintéticas o la escarificación con ácido sulfúrico, el cual ha permitido alcanzar un 87% de germinación en diferentes especies vegetales (Pereira et al. 2016; Cuba-Díaz et al. 2019). Además, la utilización de productos a base de quitina o los tratamientos osmóticos favorecen la germinación (Ventury et al. 2022).

En algunas especies se puede observar que, al estar en un hábitat adaptadas al déficit hídrico, constante aerosol marino, altas concentraciones de sales y/o bajas concentraciones de nutrientes, como es el caso de *C. quitensis*, estas deben desarrollar adaptaciones y estrategias para sobrevivir. Es por esto que se consideran estas especies capaces de germinar en condiciones *in vitro* con menores requerimientos de macro y micronutrientes, hormonas reguladoras del crecimiento, entre otros (Llanes et al. 2016; Hussains et al. 2019). Por lo cual, podemos considerar

que al utilizar medios bajos en nutrientes pero ricos en azúcares como fuente de carbono, aumentará la germinación inicial de esta especie.

2.4 Quitina y sus derivados

Uno de los enfoques para mejorar la germinación es el uso de productos orgánicos de origen natural en el medio de cultivo como alternativa a los reguladores de crecimiento sintéticos (Wiszniewka et al. 2013), ya que estos influyen sobre procesos fisiológicos y bioquímicos de las semillas durante la germinación (Coelho y Romano, 2021). La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, luego de la celulosa; el cual es un biopolímero lineal, altamente insoluble en agua, además de contener un alto peso molecular y una estructura porosa lo que favorece la absorción de agua (Sastosque-Cala et al. 2007). La quitina está formada por glúcidos nitrogenados, los cuales forman parte del exoesqueleto de los artrópodos y los hongos (Lopez et al. 2017). Los compuestos a base de quitina o sus derivados, han incrementado el porcentaje de germinación (Ventury et al. 2022), funcionan como reguladores del crecimiento en plantas y contribuyen al control de enfermedades y plagas (Ramírez et al. 2010). Dentro de los derivados de este compuesto se encuentra el quitosano (CHT) que es la forma desacetilada de la quitina, cuyo compuesto se ha utilizado para mejorar la germinación de semillas *in vitro* y su crecimiento, así como para la acumulación de metabolitos secundarios (Nge et al. 2006; Mármol et al. 2011; Coelho y Romano, 2021). Debido a su origen natural, disponibilidad, precio, seguridad para los humanos y el medio ambiente; su uso en el cultivo de tejidos vegetales ha ido en aumento (Kananont et al. 2010), aunque su empleo aún se encuentra en fase experimental (Coelho y Romano, 2021). Las nanofibras de quitina (NANOF) son solubles en agua lo que facilita su uso como fertilizante en el cultivo hidropónico de tomate y como promotor del crecimiento en coles y fresas (Aklog et al. 2016; Egusa et al. 2020). Además, el empleo de estos productos en los medios de cultivo puede favorecer la germinación de semillas, ya sea acelerando el tiempo de germinación o aumentando el porcentaje de germinación (Velásquez, 2008; de Olivera y de Olivera, 2020; Espinosa-Cavazos et al. 2020). También, se han utilizado para contrarrestar infecciones de patógenos, ya que inducen la resistencia sistémica a enfermedades (Parada et al. 2018).

2.5 Tratamiento osmótico

El osmo-acondicionamiento de las semillas permiten un rápido y sincronizado establecimiento de plántulas debido a que este tipo de tratamiento promueve la germinación (Gammoudi et al. 2021). Es un tratamiento efectivo para retardar el deterioro fisiológico de las semillas, propiciado por la producción de radicales libres (Black y Bewley, 2000). Esta técnica se ha utilizado en especies como *Capsicum annum* L., *Lycopersicon*, *Suaeda maritima* y *Pinus nigra* para obtener una mayor velocidad en la germinación (Michel y Kaufmann, 1973; Gammoudi et al. 2021; Seal et al. 2021).

Los tratamientos osmóticos más comunes se basan en el empleo de soluciones de polietilenglicol (PEG), cloruro de potasio (KCl) y quitosano (CHT) (Labanowska et al. 2013; Su et al. 2021). Estos se aplican en concentraciones entre 1% y 10% (Jorge et al. 2019; Carvalho et al. 2020; Li et al. 2020) por un período de 1 a 5 días previos a la germinación (Semba et al. 2021). A pesar de esto, se ha demostrado que someter las semillas a este proceso solo por 24 horas genera una mayor efectividad y una menor pérdida en la capacidad germinativa (Marín et al. 2022).

En cuanto a las soluciones utilizadas en el tratamiento osmótico el uso del PEG en semillas de tomate, zanahoria, sorgo y cebolla, estimuló en mayor medida la germinación (Haigh y Barlow 1987; Marín et al. 2007). En un estudio realizado por Benadjaoud et al (2002) se evaluó el uso de KCl sobre la capacidad de germinación en semillas de *Lavandula stoechas* bajo condiciones de estrés hídrico y salino; se demostró que el uso de KCl en altas concentraciones aumentó la tasa de germinación, al mitigar los efectos negativos de la salinidad y el estrés hídrico en la germinación de estas semillas poco tolerantes a la salinidad y el déficit hídrico.

3. HIPÓTESIS

La reducción del contenido de nutrientes en el medio de germinación, la adición de quitosano o nanofibras de quitina y la aplicación de tratamientos osmóticos promueven la germinación *in vitro* de semillas de *Colobanthus quitensis*.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar alternativas para potenciar la germinación *in vitro* de semillas de *C. quitensis*.

Objetivos específicos

- Investigar el impacto de la modificación de las concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo *in vitro* sobre el proceso de germinación.
- Analizar el efecto de la incorporación de productos a base de quitina en el medio de cultivo *in vitro* sobre la germinación de las semillas.
- Evaluar el efecto de los tratamientos osmóticos en las semillas de *C. quitensis* como método para mejorar la germinación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de las poblaciones de *C. quitensis*: Punta Hannah (pH), Arctowski (pA), La Marisma (pPA), Laredo (pL) y Conguillío (pC) (Fig. 1, Tabla 1), las cuales se obtuvieron a partir de plantas propagadas en condiciones de jardín común en el LBEA (Fig. Anexo 1). Las plantas se mantienen en recipientes de poliestireno (Plumavit) con una mezcla de suelo:turba:vermiculita (3:2:1) en cámara de crecimiento a $13 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa entre 75-85%, fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad e intensidad lumínica de $100 \pm 20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las semillas obtenidas de la propagación vegetal se almacenan a 4°C .

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

POBLACIÓN	ABREVIATURA	SITIO DE RECOLECCIÓN	COORDENADAS
Punta Hannah	pH	Punta Hannah, Isla Livingstone, Shetlands del Sur, Antártica	62°39'S; 60°37'W
Arctowski	pA	Cercanías Base Polaca Arctowski, Isla Rey Jorge, Shetlands del Sur, Antártica	62°09'S; 58°28'W
La Marisma	pPA	Punta Santa María, Sur de Punta Arenas	53°22'S; 70°58'W
Laredo	pL	Sector Laredo, Norte de Punta Arenas	53°58'S; 70°49'W
Conguillío	pC	Parque Nacional Conguillío	38°40'S; 71°39'W

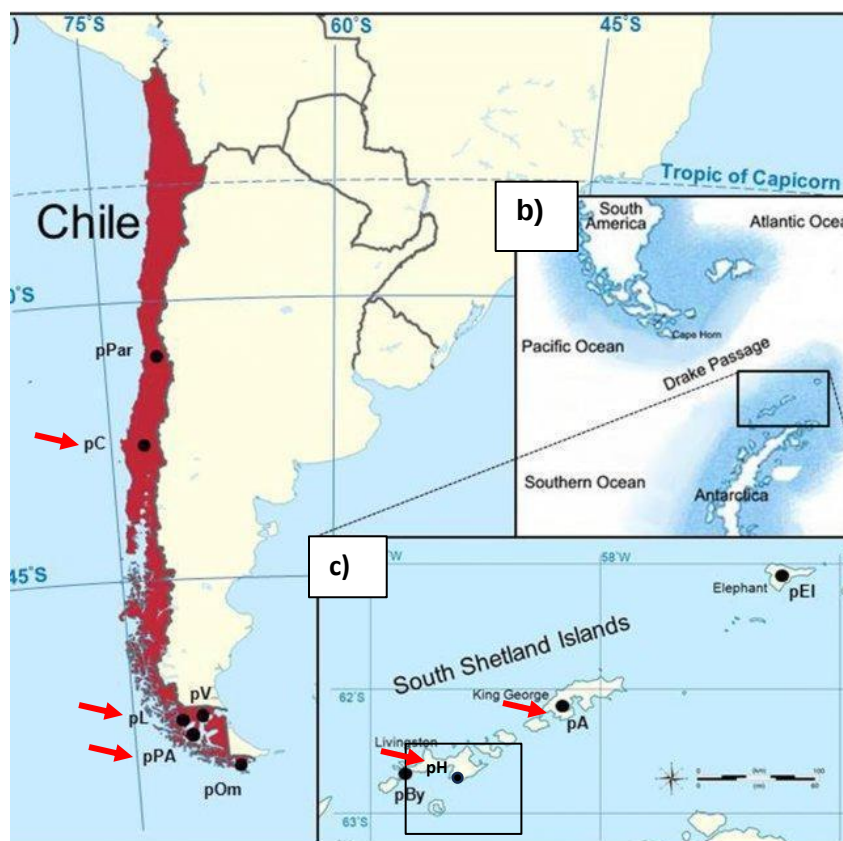


Figura 1. Localización de diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis*. Distribución de las poblaciones La Parva (pPar), Conguillío (pC), Vega (pV), Laredo (pL), La Marisma (pPA) y Omora (pOm) Chile. b) Acercamiento del pasaje del Drake donde se localizan c) las Shetland del Sur y se distribuyen las poblaciones Península Byers (pBy), Punta Hannah (pH), Arctowski (pA) y Elefante (pEI) (Koc et al., 2018, modificado por Arroyo 2023). Con flecha roja se señalan las poblaciones estudiadas en esta investigación.

5.2 Experimento 1: Censo de las semillas

Se realizó un inventario de semillas de pH, pA, pPA, pL y pC presentes en el LBEA, las cuales habían sido colectadas desde los años 2015 hasta 2022. El objetivo era ordenar y contabilizar las semillas de las diferentes poblaciones para lo cual se agruparon por trimestres: S1 (enero, febrero y marzo), S2 (abril, mayo y junio), S3 (julio, agosto y septiembre) y S4 (octubre, noviembre y diciembre) del año correspondiente. El censo se realizó contabilizando las semillas una por una (en el

caso de las colecciones con menor número de semillas). En el caso de las colecciones con mayor número de semillas, se pesaron 5 mg y se contabilizó la cantidad de semillas, para luego pesar el total de las semillas y estimar el total de semillas. Debido al tamaño que tienen estas semillas, se utilizó esta metodología para contabilizarlas, ya que al ser pequeñas se dificulta su conteo (Fig. 2).



Figura 2. Semillas de *Colobanthus quitensis* sobre papel milimetrado.

5.3 Experimento 2: Efecto del tiempo de conservación en la capacidad de germinación de las poblaciones de *C. quitensis*

5.3.1 Prueba de germinación

Previo a la prueba de germinación se realizó una prueba de flotación (Suma y Srimathi, 2014), a partir de la cual se seleccionaron las semillas viables para realizar la prueba de germinación. Se consideraron como viables las semillas que quedaron en el fondo del recipiente posterior a las 24 horas en agua destilada. Posteriormente, las semillas viables se germinaron *in vitro*, para lo cual se desinfectaron con etanol al 70% por 30 segundos en agitación constante en un vórtex, seguido de una esterilización con hipoclorito de sodio al 5% (NaOCl 35 gl^{-1} blanqueador comercial) durante 7 minutos en agitación. Finalmente, las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril (Cuba-Díaz et al. 2017a). De cada población se sembraron doce semillas al azar por placa Petri, considerándose cada placa como una réplica, con un total de tres réplicas por población. El medio para la germinación *in vitro* contenía medio MS 100% (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 3%, pH ajustado a 5.7 y agar 0,7%. Las semillas se colocaron a germinar durante 32 días a temperatura de $18 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad y una intensidad lumínica de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se consideró como semilla germinada, aquella cuya radícula tenga

el doble del tamaño de la semilla (Sanhueza et al. 2017; Cuba-Díaz et al. 2019). Con los datos tomados se calculó el porcentaje de germinación (PG):

$PG (\%) = \frac{n}{N} \times 100$, donde, n: número de semillas germinadas al finalizar el ensayo; N: número total de semillas sembradas.

5.3.2 Análisis de la pérdida de la germinación de *C. quitensis* con el tiempo de conservación

Se realizó un análisis de la influencia del tiempo de conservación sobre la germinación de *C. quitensis*, sin tener en cuenta el factor poblacional. Para esto, se agruparon los datos del experimento anterior, por lo que el n muestral y la cantidad de réplicas fue diferente para cada período de tiempo analizado (Tabla Anexo 1).

5.4 Experimento 3: Modificación del medio basal de germinación de *C. quitensis*

Se realizó una prueba de germinación a semillas con un año de conservación, para lo cual se hizo un “pool” de semillas de diferentes poblaciones de *C. quitensis*. En este experimento, solo se modificó las concentraciones de nutrientes del medio de cultivo basal empleado en el experimento 2, empleándose medio MS (Murashige y Shooqe, 1962) al 0, 25, 50 y 100%. Para este ensayo se mantuvieron las mismas condiciones de desinfección previas (Cuba-Díaz et al. 2017a) y de germinación (Sanhueza et al. 2017; Cuba-Díaz et al. 2019). Se tomaron al azar 15 semillas que fueron sembradas en placas Petri, con un total de cuatro réplicas por tratamiento, considerándose cada placa como una réplica. Las semillas utilizadas en este experimento fueron seleccionadas considerando el periodo de conservación entregado en el censo realizado en el experimento 1 y sus fechas se encontraban en el periodo S1- 2022 (1-3 meses de conservación a 4°C). De acuerdo con esto se calcularon los siguientes índices:

5.4.1 Porcentaje de germinación

5.4.2 Tiempo medio de germinación (MGT)

$MGT = \sum n_i \cdot t / n$ donde n_i : número de semillas germinadas en el día t ; n : número de semillas germinadas en el ensayo.

5.4.3 Tiempo al que se alcanza el 50% de la germinación (T50) (Come,1970):

$$T50 = \frac{[(n/2) - n_1] * (T_2 - T_1)}{n_2 - n_1} + T_1$$
 donde n: porcentaje final de semillas germinadas, n_1 : porcentaje de semillas germinadas por debajo de $n/2$, n_2 : porcentaje de semillas germinadas por encima de $n/2$, T_1 : número de días que corresponden a n_1 . y T_2 : número de días que corresponden n_2 .

5.5 Experimento 4: Pruebas de germinación de semillas en medio con derivados de quitina

5.5.1 Preparación de medios con productos de quitina

En base al mejor medio de cultivo *in vitro* que se obtuvo en el experimento 4, se prepararon los nuevos medios a los que se les incorporó NANOF y CHT al 5 y 10%. Debido a las características de estos compuestos el pH del medio se ajustó lentamente a 5.5 para evitar la formación de grumos (Tabla 2). Al igual que en el experimento 3, se tomaron al azar 15 semillas que fueron sembradas en placas Petri, con un total de cuatro réplicas por tratamiento, considerándose cada placa como una réplica. Las semillas utilizadas en este experimento fueron seleccionadas considerando el periodo de conservación entregado en el censo realizado en el experimento 1 y sus fechas se encontraban en el periodo S1- 2022 (1-3 meses de conservación a 4°C). Con estos datos se calculó PG, MGT y T50, descritas en el punto 5.4.1, 5.4.2, 5.4. 3.

Tabla 2. Tratamientos con productos de quitina (CHT y NANOF) incorporado en el medio basal modificado (agar + sacarosa) de germinación para semillas de *Colobanthus quitensis* a pH 5.5.

Tratamiento	pH	Medio de germinación
Control	pH 5.5	A + S
Nanofibras de quitina 5%	pH 5.5	A + S + NANOF 5%
Nanofibras de quitina 10%	pH 5.5	A + S + NANOF 10%
Quitosano 5%	pH 5.5	A + S + CHT 5%

Quitosano 10%	pH 5.5	A + S + CHT 10%
---------------	--------	-----------------

5.6 Experimento 5: Pruebas de tratamiento osmótico

En este experimento las semillas se sumergieron en agua destilada (control), PEG al 5 y 10% (Michel y Kaufman, 1973) y KCl al 5 y 10% (Wiggans y Gardner, 1959) durante 24 h previo a su germinación *in vitro* (Tabla 3). Se utilizaron semillas de *C. quitensis* de un año de conservación, las cuales se colocaron en medio con agar 0,7%, sacarosa 3% y pH 5,7 (Tabla 3). Se mantuvieron las mismas condiciones de desinfección antes mencionadas (Sanhueza et al. 2017; Cuba-Díaz et al. 2017a, 2019). En esta ocasión, al igual que en el experimento 4, se tomaron al azar 15 semillas que fueron sembradas en placas Petri, con un total de cuatro réplicas por tratamiento, considerándose cada placa como una réplica. Las semillas utilizadas en este experimento fueron seleccionadas considerando el periodo de conservación entregado en el censo realizado en el experimento 1 y sus fechas se encontraban en el periodo S1- 2022 (1-3 meses de conservación a 4°C). Con estos datos se calculó PG, MGT y T50, como se describió en el punto 5.4.1; 5.4.2 y 5.4. 3.

Tabla 3. Tratamientos osmóticos empleados para estimular la germinación de *Colobanthus quitensis* aplicado 24 horas previas a su sembrado en medio basal de germinación modificado (agar + sacarosa).

Tratamiento	Período	Medio + pH
Agua destilada (control)	24h	A + S con pH 5.7
PEG 5%	24h	A + S con pH 5.7
PEG 10%	24h	A + S con pH 5.7
KCl 5%	24h	A + S con pH 5.7
KCl 10%	24h	A + S con pH 5.7

5.7 Diseño experimental y análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre los tratamientos y el control se desarrollaron mediante ANOVA de una vía (one way ANOVA), en caso de todos los experimentos cumpliendo los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianza e independencia de errores, y aplicando el test HSD de Tukey, usando el software STATISTICA (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 ($p \leq 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 Experimento 1: Censo de semillas de *C. quitensis*.

El censo realizado permitió clasificar y agrupar a las semillas de la colección por trimestres (S1, S2, S3 y S4) (Tabla 4). La diferenciación por trimestres permite realizar estudios sobre la viabilidad de las semillas de acuerdo con el tiempo de conservación. Se observó que las poblaciones que contaban con mayor número de semillas fueron pL con 110.819 semillas de los años 2017 a 2022 y pC con 61.311 semillas de los años 2015 a 2021. De las cinco poblaciones censadas, pH, pA, pPA y pL cuentan con semillas colectadas durante el primer trimestre del año 2022 lo que facilitó la selección de material para los ensayos posteriores.

Tabla 4. Censo de semillas de diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* de la colección del LBEA. En el cuadro de los meses, se hace referencia al periodo de tiempo (meses) que llevaban almacenadas las semillas al momento del censo. El periodo se clasificó en S1 (enero-febrero-marzo), S2 (abril-mayo-junio), S3 (julio-agosto-septiembre) y S4 (octubre-noviembre-diciembre).

Población	Período	Peso de semillas total (mg)	Número de semillas estimadas	Meses
pH	S4-2020	67,4	1.375	16 a 18
	S3-2021	108,3	2.209	7 a 9
	S4-2021	72	1.469	4 a 6
pA	S2-2020	344,7	5.791	22 a 24
	S3-2020	522,8	8.783	19 a 21
	S1-2021	675,7	11.352	13 a 15
	S4-2021	215,9	3.612	4 a 6
pPA	S2-2019	38,1	594	34 a 36
	S2-2021	155,9	2.432	10 a 12
	S4-2021	618,3	9.645	4 a 6
	S1-2022	617,8	9.638	1 a 3
pL	S4-2017	462,5	8.048	52 a 54
	S1-2020	106,9	1.860	25 a 27
	S2-2020	233,9	4.070	22 a 24
	S3-2020	841,8	14.647	19 a 21
	S4-2020	551,1	9.589	16 a 18
	S1-2021	889,1	15.470	13 a 15
	S2-2021	772	13.433	10 a 12
	S3-2021	893	15.538	7 a 9
	S4-2021	853,1	14.844	4 a 6
	S1-2022	765,5	13.320	1 a 3
pC	S3-2015	487,1	9.060	82 a 84
	S2-2016	669,2	12.447	70 a 72
	S2-2017	318,6	5.915	58 a 60
	S1-2020	801,8	14.913	25 a 27
	S3-2020	850,2	15.814	19 a 21
	S4-2020	61,7	1.148	16 a 18
	S2-2021	108,3	2.014	10 a 12

6.2 Experimento 2: Capacidad de germinación de las poblaciones de *C. quitensis* con el tiempo de conservación.

En el caso de pPA se mantienen los porcentajes de germinación cercanos al 100% en todo el período de análisis, pC pierde su porcentaje de germinación posterior a los 24 meses de conservación, y en el caso de pL se mantiene su porcentaje de germinación alto durante los meses 7 a 24 de conservación, con valores que superan el 60% de germinación, mientras que las poblaciones pH y pA durante los primeros meses de conservación tuvieron una baja e incluso nula germinación (Fig. 3a y 3b).

Las semillas de pL y pC con más de 2 años de conservación mostraron una disminución de su germinación (Fig. 3 d y e), mientras que pPA no se vio afectada (Fig. 3c).

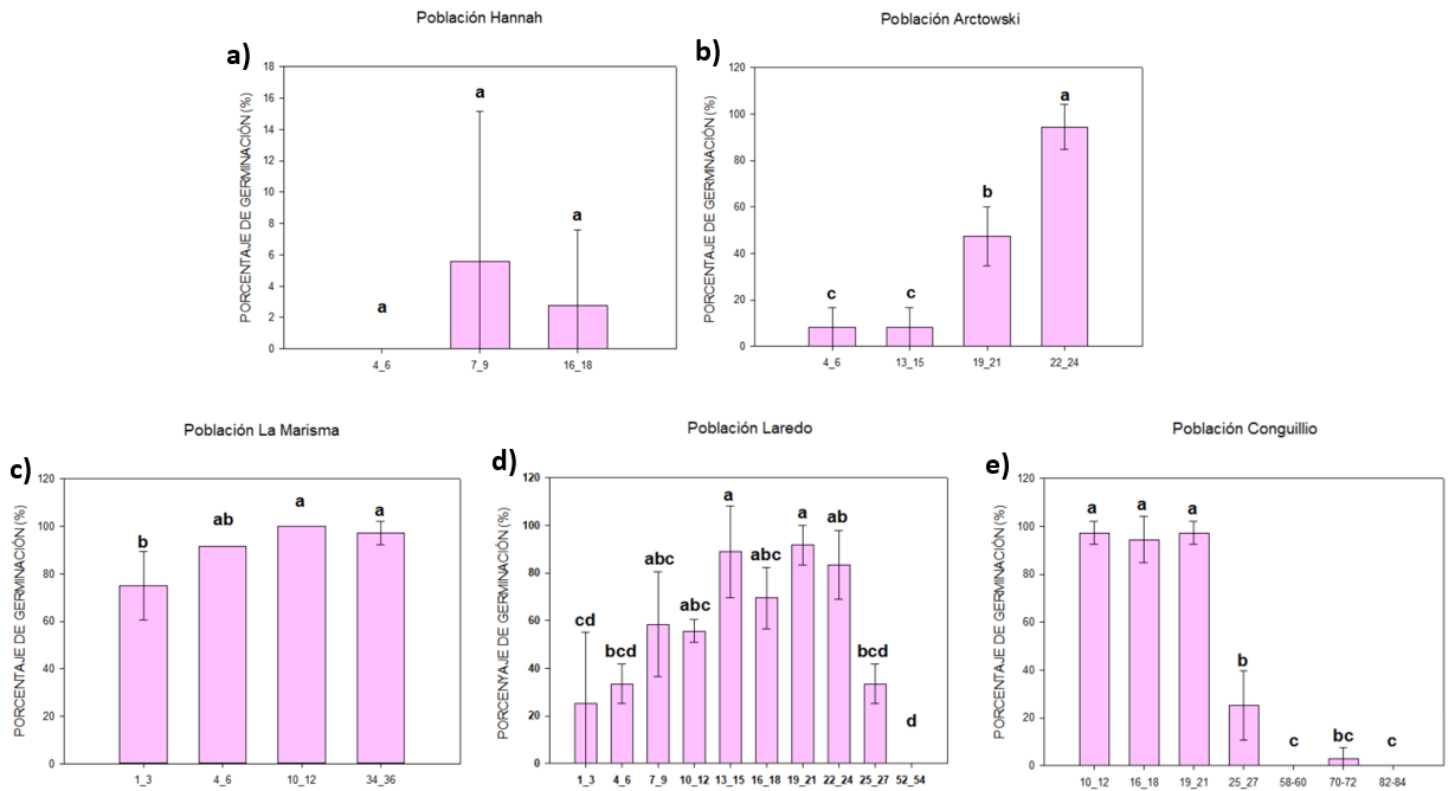


Figura 3. Porcentaje de germinación en semillas de las poblaciones de *Colobanthus quitensis* con distintos tiempos de almacenamiento (mes 1 hasta mes 84 de almacenamiento). a) población Punta Hannah (pH); b) Arctowski (pA); c) La Marisma (pPA); d) Laredo (pL) y e) Conguillío (pC). Todos los tratamientos se evaluaron hasta los 30 días desde la siembra. Las barras representan el promedio $\pm$ DS ($n=15$, 4 réplicas). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía seguido de un test de Tuckey HSD ($p \leq 0,05$).

6.2.1 Prueba de germinación *C. quitensis* sin tener en cuenta el factor poblacional.

Al analizar el comportamiento germinativo de *C. quitensis*, en función del tiempo de almacenamiento se observó que hasta los 9 meses de conservación la germinación tiende a ser menor que en las semillas conservadas por 12 a 36 meses. Posterior a este tiempo, hay una disminución significativa del porcentaje de germinación (Fig. 4).

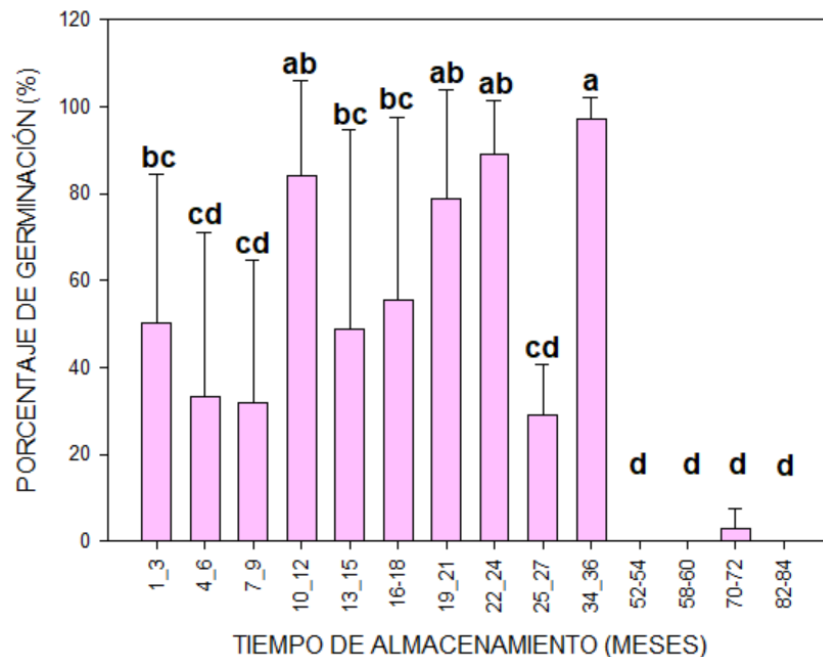


Figura 4. Porcentaje de germinación de *Colobanthus quitensis* en función del tiempo de conservación obviando las poblaciones. Se evaluó a los 30 días desde su sembrado. Las barras representan el promedio $\pm$ DS ($n= 15$, 4 réplicas). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía seguido de un test de Tuckey HSD ($p \leq 0,05$).

6.3 Experimento 3: Modificación del medio basal de germinación de *C. quitensis*

6.3.1 Porcentaje de germinación de semillas sembradas en medios con distintas concentraciones de MS

Al realizar la prueba de germinación con diferentes concentraciones de MS en los medios (0, 25, 50 y 100), se observó que el mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el medio sin MS (46,5%) mientras que los menores porcentajes de

germinación se registraron en los medios con 25% (26,7%), 50% y 100% de MS (24,4% en ambos casos) (Fig. 5).

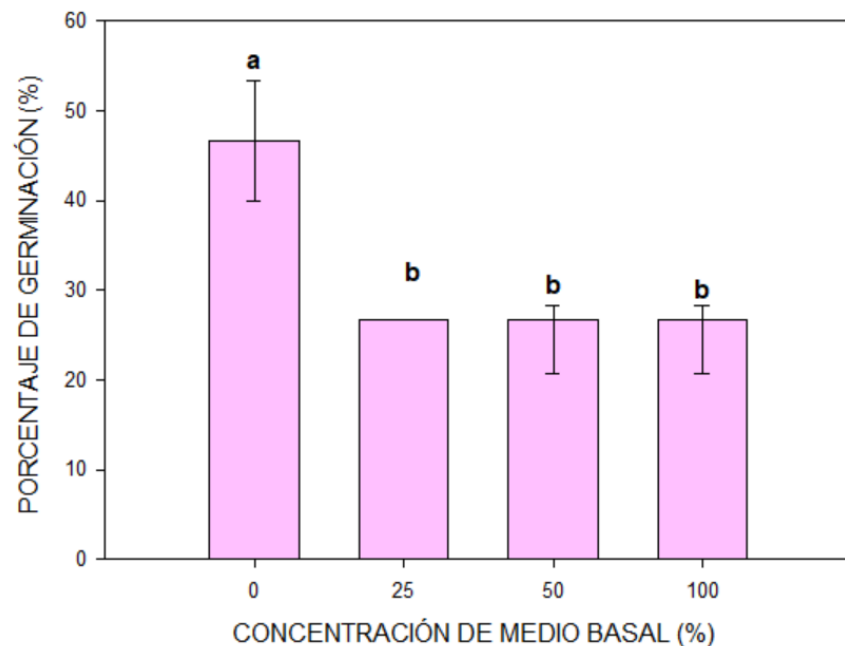


Figura 5. Porcentaje de germinación de semillas de *Colobanthus quitensis* sembradas en medios con distinta concentración (%) de Murashige y Skoog (MS) Todos los tratamientos se evaluaron hasta los 30 días desde su sembrado. Las barras representan el promedio $\pm$ DS ($n=15$, 4 réplicas). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía seguido de un test de Tuckey HSD ($p \leq 0,05$).

6.3.2 Tiempo medio de germinación de semillas sembradas en medios con distintas concentraciones de MS

No se observaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones del medio (agar + sacarosa, MS al 25%, 50% y 100%) en el tiempo medio de germinación (MGT) (Fig. 6). Donde en el medio con MS 50% se establece un MGT de 9,11 días; MS 25% de 9,91 días; MS 100% de 10 días y finalizando con agar + sacarosa con 10,38 días.

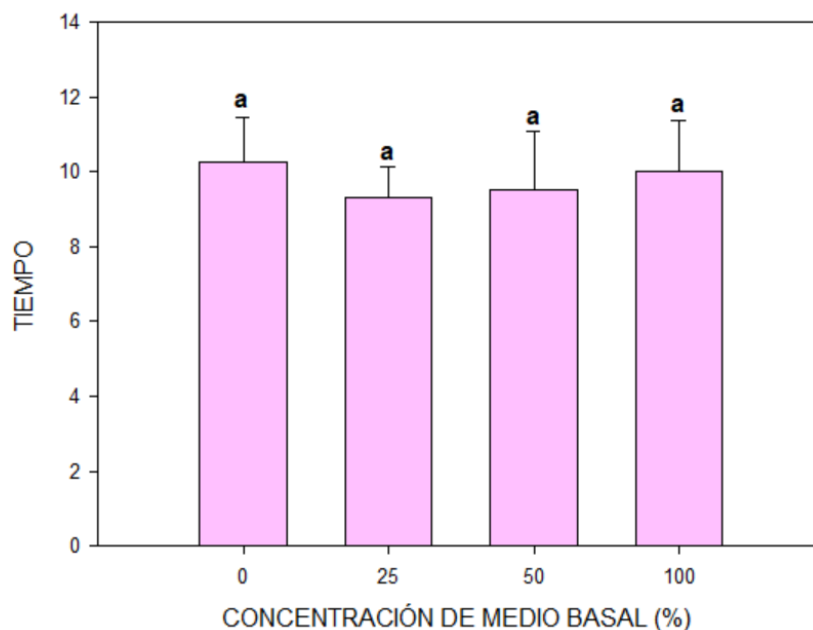


Figura 6. Tiempo medio de germinación de semillas (días) de *Colobanthus quitensis* sembradas en medios con distinta concentración de Murashige y Skoog (MS). Todos los tratamientos se evaluaron hasta los 30 días desde su sembrado. Las barras representan el promedio $\pm$ DS ($n= 15$, 4 réplicas) utilizando un total de 240 semillas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía seguido de un test de Tuckey HSD ($p \leq 0,05$).

6.3.3 Tiempo al que se alcanza el 50% de la germinación (T50) de semillas sembradas en medios con distintas concentraciones de MS

El tiempo al que se alcanza el 50% de la germinación de *C. quitensis*, es similar para todos los tratamientos. Para el medio con agar 0,7% y sacarosa al 3%, se observó un T50 de 8 días al igual que el medio con 25% y 100% MS. Mientras que para el medio con 50% de MS, el T50 se alcanzó a los 7,5 días (Fig. 7).

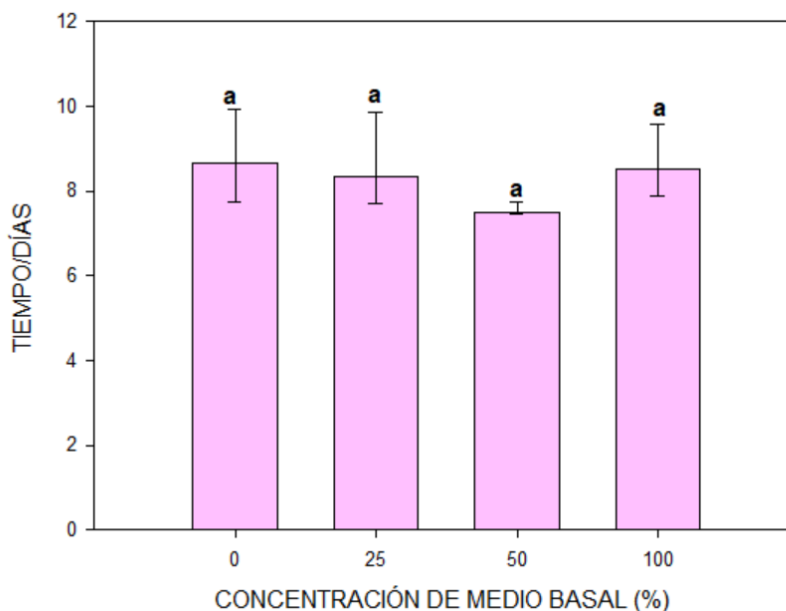


Figura 7. T50% de las semillas de *Colobanthus quitensis* sembradas en medios con distintas concentraciones de Murashige y Skoog (MS). Todos los tratamientos se evaluaron hasta los 30 días desde su sembrado. Las barras representan el promedio $\pm$ DS (n= 15, 4 réplicas) utilizando un total de 240 semillas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía seguido de un test de Tuckey HSD ($p \leq 0,05$).

6.4 Experimento 4: Pruebas de germinación de semillas en medio con componentes de quitina

6.4.1 Porcentaje de germinación con productos de quitina

La incorporación de NANOF y CHT al medio de cultivo no estimuló positivamente el PG respecto al control. Los PG más altos se obtuvieron en el medio sin compuestos de quitina (control) (40%), seguido de CHT 5% (38%), NANOF al 5% (37%) y 10% (30%). El tratamiento con CHT 10% (26,7%) generó el menor PG respecto al control (Fig. 8a).

6.4.2 Tiempo medio de germinación en medios con productos de quitina

Según el análisis MGT utilizando productos de quitina, NANOF y CHT en diferentes concentraciones, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos. En

donde se puede observar que el mejor resultado se ve reflejado en el control con un MGT de 6 días, al igual que en el caso de NANOF al 5%, en el caso de NANOF al 10%, CHT al 5% y 10%, el MGT arrojó como resultado 8 días (Fig. 8b).

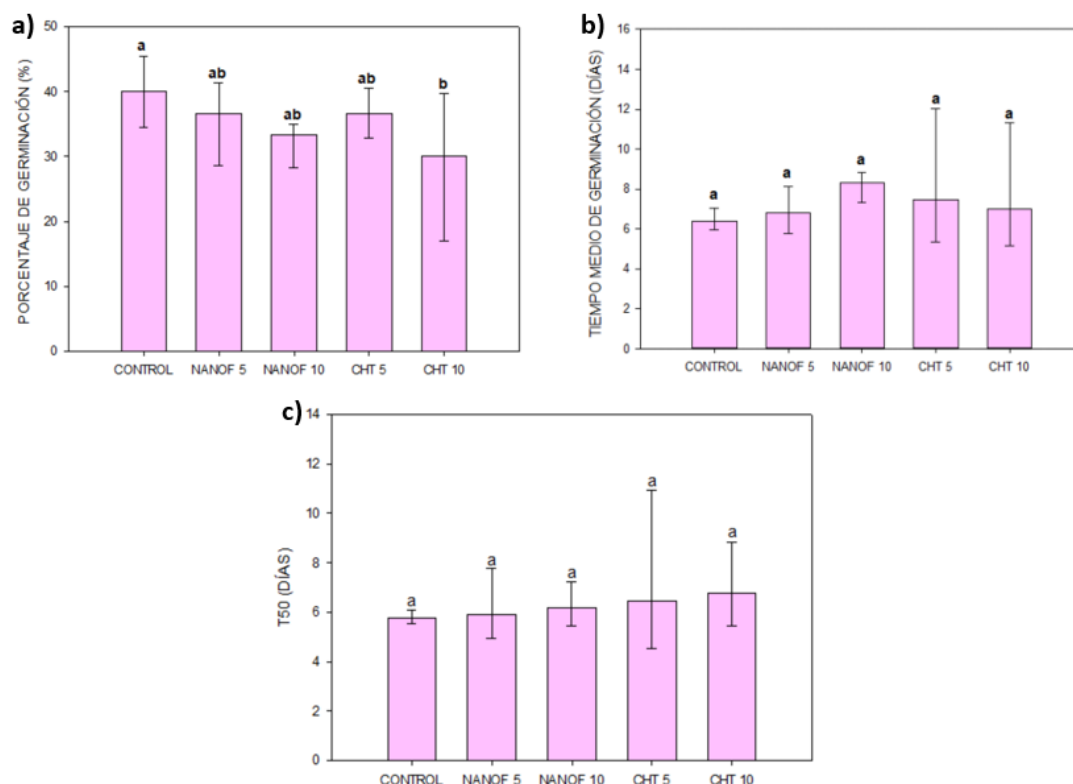


Figura 8. Porcentaje de germinación (a), tiempo medio de germinación (b) y T50 (c) de semillas de *Colobanthus quitensis* en medios de cultivo *in vitro* con productos derivados de quitina adheridos al medio. Todos los tratamientos se evaluaron hasta los 30 días desde su sembrado. Las barras representan el promedio $\pm$ DS (n= 15, 4 réplicas) utilizando un total de 300 semillas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía seguido de un test de Tuckey HSD ($p \leq 0,05$).

6.4.3 T50 de semillas con productos de quitina

Se observó al igual que en el caso del MGT, el control nos arroja un mejor resultado con un T50 igual a 5 días, en el caso de los medios con NANOF al 5 y 10% incorporado en el medio, obtuvo como resultado 6 días en los que se demora en

alcanzar el 50% de germinación en las semillas, y en el caso de los productos con CHT al 5 y 10% en los medios, se obtuvo el resultado más alto con un igual a 7 días (Fig. 8c)

6.5 Experimento 5: Pruebas de tratamiento osmótico

6.5.1 Porcentaje de germinación en semillas con tratamiento osmótico

El empleo de tratamiento osmótico con PEG y KCl previo a la germinación determinó que, de todos los tratamientos, los mayores PG se obtuvieron con PEG al 10% y KCl al 5% (73,3%), seguido de KCl al 10% (67%), para posterior mostrar una disminución en el porcentaje en los casos de PEG al 5% (42%) y el control (38%). (Fig. 9a).

6.5.2 Tiempo medio de germinación (MGT) en semillas con tratamiento osmótico

Se observaron diferencias significativas en cuanto al MGT, en donde los mejores resultados se establecieron con PEG al 5%, KCl al 5% y PEG al 10% con un resultado de 7 días, seguido por KCl al 10% con 8 días y finalizando con el control, el cual dio el resultado más alto con 9 días (Fig. 9b)

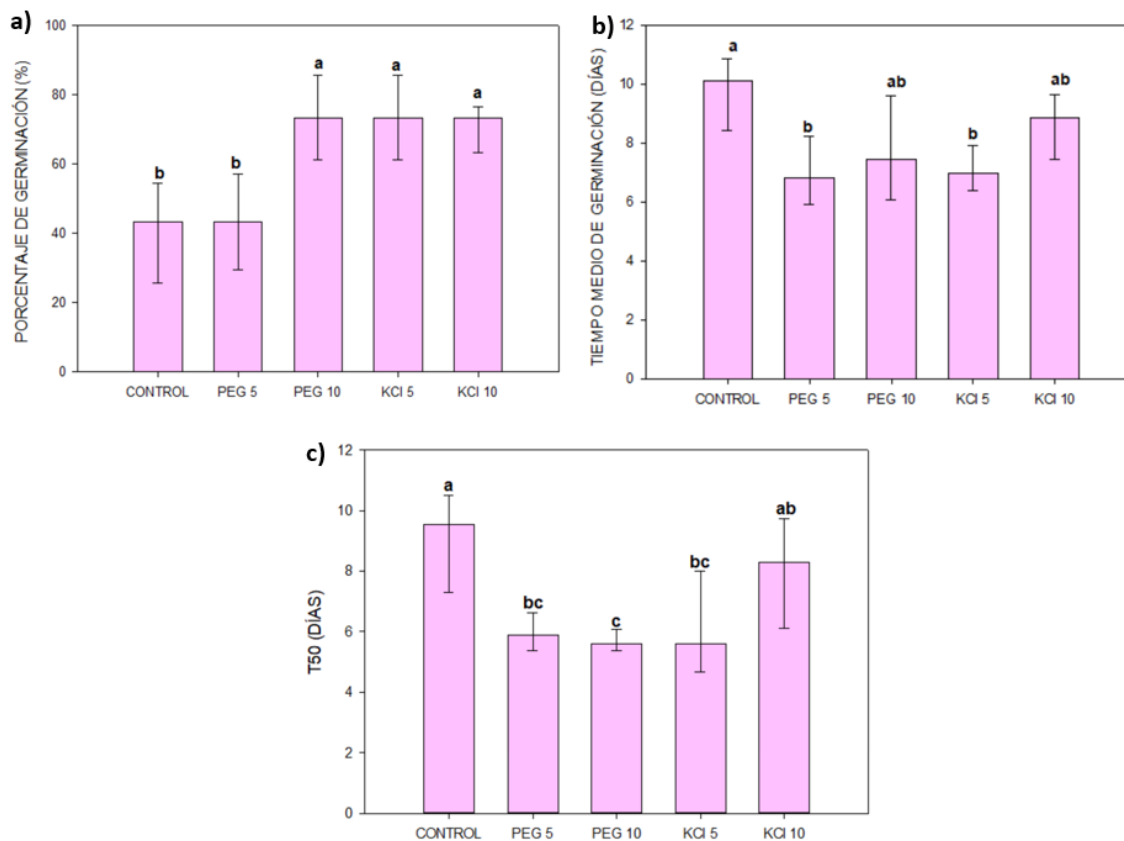


Figura 9. Porcentaje de germinación (a), tiempo medio de germinación (b) y T50 (c) de semillas de *Colobanthus quitensis* sometidas a tratamiento osmótico previo a la siembra en medios basal de germinación Agar + Sacarosa. Todos los tratamientos se evaluaron hasta los 30 días desde su sembrado. Las barras representan el promedio $\pm$ DS ($n=15$, 4 réplicas) utilizando un total de 300 semillas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía seguido de un test de Tuckey HSD ($p \leq 0,05$).

6.5.3 Velocidad de germinación (T50) en semillas con tratamiento osmótico

El empleo de PEG al 10%, permitió que el 50% de las semillas germinaran en 5,73 días, seguido por PEG al 5% con un tiempo de 6 días, con una diferencia decimal seguido por KCl al 5% con un tiempo de 6,34; KCl al 10% con 7,9 días y finalizando con el control, el cual se demoró en mayor tiempo (8,9 días) (Fig. 9c).

7. DISCUSIÓN

El deterioro fisiológico de las semillas y las condiciones de germinación son factores fundamentales que influyen en la capacidad de germinación (Hernández et al. 2015). El tiempo y las condiciones de conservación de las semillas producen su envejecimiento, lo que se traduce en su deterioro fisiológico, el cual constituye un fenómeno irreversible (Zhang et al. 2021). Se ha observado que las semillas de *C. quitensis* producidas *ex situ*, muestran una reducción de su capacidad germinativa a pesar de conservarse a 4°C (Cuba-Díaz et al. 2019). La conservación a esta temperatura es frecuente en diferentes especies de interés, ya que, se considera que las temperaturas más bajas contribuyen a prevenir el deterioro y prolongar su longevidad (van Treuren et al. 2018; Davies et al. 2020). Debido a que *C. quitensis* posee semillas ortodoxas (Kellmann-Sopyła y Gielwanowska, 2015), la criopreservación podría ser una alternativa futura para mantener su viabilidad y, por ende, altos porcentajes de germinación.

Así mismo, al crear un entorno óptimo para la germinación y emplear productos que estimulan este proceso, se pueden atenuar los efectos negativos del deterioro y lograr mayores porcentajes de germinación (Ashraf y Foolad, 2005). Esta investigación se centró en evaluar el efecto que tienen diferentes procedimientos en el porcentaje de germinación (PG), el tiempo medio de germinación (MGT) y el tiempo que se requiere para alcanzar el 50% de la germinación (T50), ya que son tres de los índices más empleados para evaluar la viabilidad de los lotes de las semillas (ISTA, 2017; Azis et al. 2021).

7.1 Experimento 1: Censo de semillas de *C. quitensis*

Las colecciones de semillas deben tener un control del material que se conservan con el objetivo de mantener los recursos en óptima calidad fisiológica (Taylor, 2020; Whitehouse et al. 2020). Existen pocas referencias sobre el proceso germinativo de semillas de *C. quitensis* después de su conservación por diferentes períodos de tiempo (Kellmann-Sopyła y Gielwanowska, 2015); por esta razón se censó la colección del LABEA. La clasificación del material por fecha de colecta es una

práctica estándar en las colecciones vegetales, pues permite estimar cuál lote de semillas tiene mayor probabilidad de presentar deterioro fisiológico (Rao et al. 2007), aunque esto se confirma realizando pruebas de germinación y/o vigor (Sanhueza et al. 2017; Zhou et al. 2019; Raju-Ahmed et al. 2020). El tiempo y condiciones de conservación óptimos de las semillas varían con la especie (De Vitis et al. 2020). La posibilidad de conservar semillas de *C. quitensis* por largos períodos de tiempo, se debe a su capacidad de producir semillas ortodoxas (Kellmann-Sopyla y Gielwanowska, 2015; Real Jardín Botánico de Kew, <https://data.kew.org/sid/>; Ontivero 2023 com. pers. datos no publicados). A pesar de esto, si se garantizan temperaturas óptimas y bajos contenidos de humedad relativa se puede prolongar el período de viabilidad de las semillas (Vertucci et al. 1994; Taylor, 2020).

7.2 Experimento 2: Capacidad de germinación de diferentes poblaciones de *C. quitensis* en relación con el tiempo de conservación.

Al analizar la capacidad de germinación de las diferentes poblaciones, se observó que el tiempo de conservación ejerció una influencia negativa en la germinación, excepto en pPA (Fig. 3). Esto es de esperarse, ya que a medida que se prolonga la conservación, hay mayor probabilidad de que ocurra deterioro de los tejidos, mayor acumulación de especies reactivas del oxígeno y daños en la maquinaria enzimática, lo que genera afectaciones en el PG (Wagner y Oplinger, 2017). También, se observó que no todas las poblaciones tienen la misma capacidad germinativa o se ven afectadas de igual forma por el deterioro ocasionado por la conservación, ya que la población pH presentó los menores PG independientemente del tiempo de almacenamiento (Fig. 3a) y se es necesario seguir investigando con esta población. Estudios anteriores han establecido que las diferentes poblaciones de *C. quitensis* tienen diferente capacidad germinativa, siendo las poblaciones antárticas las que muestran menor porcentaje de germinación (Cuba-Díaz et al. 2019). Además de observarse que en pA, se vio que el proceso de conservación en frío le favorece, pero, no se sabe con seguridad que es lo que sucede posterior a los 24 meses de conservación.

7.2.1 Prueba de germinación *C. quitensis* a nivel especie

Al analizar la germinación sin tener en cuenta el efecto poblacional, se aprecian tres fases en la viabilidad de las semillas: (1) un período de baja germinación hasta los 9 meses, (2) una máxima germinación desde los 10 hasta los 36 meses y (3) después de los 36 meses existe una disminución de la germinación, a partir de los 54 meses (Fig. 4). A pesar de esto, debido a la falta de material conservado entre los 36 y 54 meses se desconoce en qué punto comienza a disminuir la germinación. La primera fase detectada puede estar relacionada con la presencia de dormancia en *C. quitensis* (Cuba-Díaz et al. 2019), cuya presencia disminuye la capacidad de germinación (Klupczyńska y Pawłowski, 2021). Por otro lado, la conservación a bajas temperaturas se considera un proceso de estratificación que puede eliminar la dormancia (Cavieres y Arroyo, 2000; Song et al. 2023) y puede ser una de las razones de que se detecte una mayor germinación luego de que las semillas se conservan en estas condiciones por varios meses. La fase final detectada, se debe al envejecimiento de las semillas que impide que germinen aun cuando se conserven en condiciones que favorecen la germinación (Gokdas et al. 2022).

7.3 Experimento 3: Modificación del medio de germinación de *C. quitensis*

Las plantas que se desarrollan en condiciones extremas, como ambientes áridos, fríos o con escasez de recursos, muestran un mejor desempeño germinativo en medios con baja disponibilidad de nutrientes (Rodríguez et al. 2014). Las especies adaptadas a estas condiciones presentan estrategias de conservación de energía, mayor eficiencia en la germinación y aprovechamiento óptimo de recursos para prosperar en suelos pobres (Urbina et al. 2015). Las semillas analizadas en este estudio provenían de plantas cultivadas en jardín común donde el suelo es fértil, sin embargo, fueron capaces de germinar mejor en un ambiente sin hormonas o reguladores del crecimiento (Fig. Anexo 3). Se sabe que las plantas muestran cierto grado de memoria genética, por lo que una vez que vuelven a ser expuestas a condiciones de estrés para las cuales presentan adaptaciones son capaces de responder favorablemente a dicha condición (Wang et al. 2021). Esto puede haber influido en que las semillas de *C. quitensis* tuvieran mayor PG *in vitro* en el medio compuesto solo por agar y sacarosa, respecto a las diferentes concentraciones del

medio MS. Además, se sabe que las especies expuestas a ambientes extremos tienden a germinar mejor en condiciones sin hormonas o reguladores de crecimiento (Llanes et al. 2016) (Fig. 5).

7.4 Experimento 4: Pruebas de germinación de semillas en medio basal con componentes de quitina

Las alternativas utilizadas para promover la germinación en *C. quitensis* en estudios anteriores han sido la escarificación con ácido sulfúrico y la estratificación en frío, procesos que pueden ser engorrosos o requerir largos períodos de tiempo (Ruhland y Day, 2001; Kellmann- Sopyla y Gielwanowska, 2015; Cuba-Díaz et al. 2019). Como alternativa a estos procedimientos, el empleo de productos derivados de quitina en el medio de cultivo *in vitro* surge como una opción.

Los compuestos de quitina se han utilizado en sus inicios en concentraciones altas en tratamientos previos al sembrado, ya que potencian la germinación y estimulan el crecimiento de las raíces. (Tsugita et al., 1993; Khan et al., 2002). En función de esto, se esperaba que tuvieran resultados similares utilizando concentraciones altas directamente en los medios de cultivos, además, los experimentos de esta investigación se enfocaron en el empleo de productos a base de quitina en concentraciones de 5% y 10%. En semillas de maíz se utilizó 5% de CHT, el cual tuvo un efecto positivo en el crecimiento de las plantas (raíces, retoños y hojas) (Peña et al. 2016). Debido a estos resultados se estableció la incógnita de si a mayor porcentaje de productos a base de quitina, se pueden ver resultados positivos, tanto en la germinación como el desarrollo de las plántulas. De acuerdo con los resultados entregados dentro del experimento, posterior a los 30 días se pudo observar un crecimiento radicular en medios de MS + productos de quitina (Fig. Anexo 4), lo que concuerda con lo reportado por varios autores (Tang et al. 2014; Mesa et al. 2015; Mehta et al., 2022; Liao et al. 2023). En uno de los ensayos realizados de manera preliminar se observó un mayor desarrollo radicular al añadirle al medio los productos de quitina (Fig. Anexo 5). Debido a los resultados obtenidos es que se sugiere realizar otros ensayos, enfocados principalmente en estimular el crecimiento radicular,

además de sugerir que se realicen ensayos con productos de quitina en concentraciones inferiores a las que ya se utilizaron.

7 5 Experimento 5: Pruebas con tratamientos osmóticos

Los tratamientos osmóticos se establecieron como una alternativa para estimular los indicadores del proceso germinativo. De los tratamientos osmóticos, el empleo de KCl al 5%, constituyó la mejor opción para estimular la germinación y disminuir el tiempo en que se demora en germinar, ya que, si bien no se ven diferencias significativas por cada índice por separado, al momento de analizar todos los índices en conjunto, el que nos entrega un mejor resultado es este (Fig. 9). Estos beneficios se observaron cuando se empleó KCl para estimular el porcentaje de germinación de *Cichorium intybus*, además de disminuir gradualmente el tiempo en que se demoraron las semillas en germinar (Sadeghi y Robati, 2015). Según un estudio realizado por Sadeghi y Robati (2012), el KCl demostró la mayor eficiencia en el proceso de germinación en semillas, esto de acuerdo con la ventaja osmótica que tiene el ion potasio (K^+) para mejorar la saturación de agua en las células de la semilla. Esto significa que el potasio podría facilitar la absorción de agua por parte de las células de la semilla, lo cual es esencial para que comience el proceso de germinación (Elouaer y Hannachi, 2012). Un menor tiempo requerido para la germinación genera ventajas en el establecimiento, crecimiento, y desarrollo de plántulas en condiciones de estrés (Roni et al. 2015; Almas et al. 2013). Por tanto, para *C. quitensis* es beneficioso que sus semillas germinen rápidamente ya que la mayoría de sus hábitats están asociadas a condiciones ambientales extremas (Moore, 1970; Cuba-Díaz et al. 2013).

El empleo de PEG al 10% y KCl al 5% permitió obtener un PG de 73,3% (Fig. 9a), sin embargo, de ambos tratamientos, el KCl al 5% logró disminuir el tiempo requerido para el proceso de germinación (Fig. 9b y c). Por esta razón, se consideró que el KCl al 5% resultó ser el mejor tratamiento osmótico. Además, aumentó el largo radicular respecto al control (Figs. Anexo 6;7).

8. CONCLUSIONES

- El tiempo de conservación influye en el PG de *C. quitensis*, aunque no afecta por igual a todas las poblaciones.
- La viabilidad de las semillas de *C. quitensis* no se ve afectada hasta los 36 meses de conservación y luego disminuye desde los 54 meses de conservación a 4°C.
- El medio de germinación compuesto solo por agar y sacarosa estimula la germinación en mayor porcentaje en *C. quitensis*.
- El empleo de KCl al 5% como tratamiento osmótico mejora el proceso germinativo de *C. quitensis*, mientras que el empleo de productos a base de quitina no favorece este proceso al menos en las concentraciones estudiadas (5 y 10%).

En resumen, se confirma que el tiempo de conservación afecta significativamente la capacidad de germinación de las semillas de *C. quitensis*. Además, se identifica que la modificación en la concentración de nutrientes en el medio de germinación puede influir en el proceso de germinación. Por otro lado, los tratamientos osmóticos muestran un impacto positivo en el porcentaje de germinación, mientras que los compuestos de quitina no demuestran una mejora significativa en la germinación, por lo menos a las concentraciones estudiadas en esta investigación.

Estos resultados proporcionan información relevante para mejorar las metodologías de germinación *in vitro* de semillas de *C. quitensis* y, potencialmente, para su propagación y conservación en bancos de germoplasma. Sin embargo, se sugiere seguir investigando y optimizando los tratamientos y medios de germinación para aumentar la eficiencia del proceso y lograr una mayor viabilidad de las semillas.

Es por esto que se acepta la hipótesis planteada, ya que con el único tratamiento que no se obtuvieron resultados favorables, fue en el caso de los productos de quitina, pero se deja como sugerencia probar concentraciones más bajas. Respecto del resto de las variables estudiadas, se acepta la hipótesis, ya que en general los resultados

obtenidos tanto en la modificación del medio basal de germinación y los tratamientos osmóticos, promueven la germinación de *C. quitensis*.

Además, se dejan futuras sugerencias, como, por ejemplo, hacer mediciones de dormancia y analizar esta desde los tiempos iniciales de la semilla, y además analizar si efectivamente existe un deterioro de las semillas en los tiempos finales, o después de conservar las semilla un tiempo prolongado. Además, se sugiere repetir los ensayos con compuestos de quitina en concentraciones inferiores a los 5%, e incorporando el medio agar + sacarosa, cuyo resultado fue el que dio un mayor PG, teniendo en consideración que según lo observado dejarlo sobre un periodo de tiempo mayor a 3 semanas desde su germinación, puede ser un factor negativo para el crecimiento de la plántula, ya que una vez germinada empieza a necesitar los nutrientes necesarios para su conservación (Fig. Anexo 8).

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña D (2014) Optimización de protocolos para la propagación *in vitro* en diferentes poblaciones chilenas de *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. Tesis de Pregrado. Ing. Biotecnología Vegetal. Universidad de Concepción, Chile: 1–66.
2. Aklog Y, Egusa M, Kaminaka H, Izawa H, Morimoto M, Saimoto H, Ifuku S (2016) Protein/CaCO₃/chitin nanofiber complex prepared from crab shells by simple mechanical treatment and its effect on plant growth. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 1600.
3. Alberdi M, Bravo L, Gutiérrez A, Gidekel M, Corcuera L (2002) Ecophysiology of Antarctic vascular plants. *Physiologia Plantarum* 115: 479- 486.
4. Álvarez M, Choque D, Condori G (2020) Aplicación de reguladores de crecimiento sobre el rendimiento de cebolla roja llabaya (*Allium cepa*). *Ciencia y Desarrollo* 26: 61-67.
5. Arellano Y, García E, Vázquez-Ramos J (2022) Estimulación de la síntesis de ADN y de proteínas del ciclo celular por auxinas durante la germinación de maíz. *Agrociencia* 24: 637-644.
6. Benadjaoud A, Dadach M, El-Keblawy A, Mehdadi Z (2022) Impacts of osmopriming on mitigation of the negative effects of salinity and water stress in seed germination of the aromatic plant *Lavandula stoechas* L. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants* 31: 100407.
7. Bhatt A, Caron M, Chen X, Yu D, Niu Y (2022) Effect of temperature, light and storage on seed germination of *Salvia plebeia* R.Br., *Leonurus japonicus* Houtt., *Mosla scabra* (Thunb.) C.Y.Wu y H. W. Li and *Perilla frutescens* (L.) Britton. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plant* 31: 100402.
8. Burgos R (2020) Establecimiento de un protocolo para la conservación *in vitro* de *Colobanthus quitensis* en condiciones de crecimiento mínimo. Tesis de Pregrado Ing. en Biotecnología Vegetal. Universidad de Concepción, Los Ángeles, Chile:1-84.

9. Carvalho A, Gaivão I, Lima-Brito J (2020) Seed osmopriming whit PEG solutions in seed of three infraspecific taxa of *Pinus nigra*: Impacts on germination, mitosis and nuclear DNA. *Forest Ecology and Management* 456: 117739.
10. Castel K (2015) Evaluación de tolerancia a la salinidad (NaCl) de tres poblaciones de *Colobanthus quitensis in vitro*. Tesis de Pregrado. Ing. Biotecnología Vegetal. Universidad de Concepción, Chile: 10–70.
11. Cavieres L, Arroyo M (2000) Seed germination response to cold stratification period and thermal regime in *Phacelia secunda* (Hydrophyllaceae)—altitudinal variation in the Mediterranean Andes of central Chile. *Plant Ecology* 149: 1-8.
12. Cavieres L, Sáez P, Sanhueza C, Sierra-Almeida A, Rabert C, Corcuera L, Bravo L (2016) Ecophysiological traits of Antarctic vascular plants: their importance in the reponses to climate change. *Plant Ecology* 21: 343-358.
13. Chwedorzewska K (2009) Terrestrial Antarctic ecosystems in the changing wold: an overwiw. *Polish Polar Research* 30: 263-276.
14. Coelho N y Romano A (2021) Impact of chitosan on plant tissue culture: recent applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 148: 1-13.
15. Côme, D. (1970). Les obstacles a la germination. Masson, París, 162 pp
16. Contreras-Negrete G, Pineda-García F, Nicasio-Arzeta S, De la Barrera E, González-Rodríguez A (2021) Differences in germination response to temperature, salinity, and water potential among *Prosopis laevigata* populations are guided by the tolerance-exploitation trade-off. *Flora* 285: 151963.
17. Cortés J, Pérez M, Mora R (2017) Importancia de los cultivos vegetales *in vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias* 1:78-83.
18. Cuba-Díaz M, Acuña D, Klagges M, Dollenz O, Cordero C (2013) *Colobanthus quitensis* de la Marisma, una nueva población para la colección genética de la especie. In: Leppe M, Molina-Montenegro M, González M, MacDonell S, Lavín P, Oses Gallardo J, Rivadeneira M, Arata J, Canales R (eds) *Avances en Ciencia Antártica Latinoamericana. VII Congreso Latinoamericano de Ciencia Antártica* INACH-CEAZA 436–43.

19. Cuba-Díaz M, Acuña D, Cordero C, Klagges M (2014) Parameters optimization for *in vitro* propagation of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Gayana Bot* 71: 58–67.
20. Cuba-Díaz M, Castel K, Marín C (2015) Efecto en la germinación de *Colobanthus quitensis* en presencia de cloruro de sodio e iones cobre. VIII Congreso Latinoamericano de Ciencia Antártica (CLCA). Libro de resúmenes: 325 - 328.
21. Cuba-Díaz M, Castel K, Acuña D, Machuca A, Cid I (2017a). Sodium chloride effect on *Colobanthus quitensis* seedling survival and *in vitro* propagation. *Antarctic Science*, 29: 45-46.
22. Cuba-Díaz M, Klagges M, Fuentes-Lillo E, Cordero C, Acuña D, Opazo G, Troncoso-Castro J (2017b) Phenotypic variability and genetic differentiation in continental and island populations of *Colobanthus quitensis* (Caryophyllaceae: Antarctic pearlwort). *Polar Biology* 40: 2397–2409.
23. Cuba-Díaz M, Acuña D, Fuentes-Lillo E (2019) Antarctic pearlwort (*Colobanthus quitensis*) populations respond differently to pre-germination treatments. *Polar Biol* 42: 1209–1215.
24. Cuba-Díaz M, Rivera-Mora C, Navarrete E, Klagges M (2020) Advances of native and non-native Antarctic species to *in vitro* conservation: improvement of disinfection protocols. *Sci Rep* 10: 3845.
25. Davies RM, Hudson AR, Dickie JB, Cook C, O'Hara T, Trivedi C (2020) Exploring seed longevity of UK native trees: Implications for *ex situ* conservation. *Seed Sci. Res.* 30, 101–111.
26. De Carvalho Teixeira Vasconcelos P, Loureiro M, Lima Á, Ribeiro P, Bernal D, Moreno M, de Castro (2017) New insights into the mechanism underlying *Ricinus communis* L. tolerance to drought stress during germination. *Industrial Crops and Products* 103: 99- 106.
27. De Vitis M, Hay F, Dickie J, Trivedi C, Choi J, Fiegenger R (2020) Seed storage: maintaining seed viability and vigor for restoration use. *Restoration Ecology* 28: 249-255.

28. Dulska J, Wasilewski J, Androsiuk P, Kellmann-Sopyla W, Glowacka K, Górecki R, Gielwanowska I (2019) The effect of sodium fluoride on seeds germination and morphophysiological changes in the seedlings of the Antarctic species *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. And Subantarctic species *Colobanthus apetalus* (Labill) Druce. Polish Polar Research 40: 255-272.
29. Egusa M, Matsukawa S, Miura C, Nakatani S, Yamada J, Endo T, Kaminaka H (2020) Improving nitrogen uptake efficiency by chitin nanofiber promotes growth in tomato. International Journal of Biological Macromolecules 151:1322–1331.
30. Elouaer M, Hannachi C (2012). Seed priming to improve germination and seedling growth of safflower (*Carthamus tinctorius*) under salt stress. *EurAsian Journal of BioSciences*, 6(1), 76-84.
31. Espinosa-Cavazos K, Sáenz-Galindo A, Castañeda-Facio A (2020) Películas de quitosano propiedades y aplicaciones. *Afinidad, Revista de química teórica y aplicada* 77: 203-208.
32. FAO (2014) Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Roma: Edición revisada 16-124. <https://www.fao.org/3/i3704s/i3704s.pdf>
33. Farías D (2018). Efectos de los iones Fe^{3+} en la germinación *in vitro* de *Colobanthus quitensis*. Tesis de Pregrado. Ing. Biotecnología Vegetal. Universidad de Concepción, Chile.
34. Gammoudi N, Nagaz K, Ferchichi A (2021) Hydrotime analysis to explore the effect of H_2O_2 -priming in the relationship between water potential (Ψ) and germination rate of *Capsicum annuum* L. seed under NaCl^- and PEG-induced stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 167: 990–998.
35. Gielwanowska I, Bochenek A, Gojlo E, Górecki R, Kellmann 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 139-155.
36. Gokdas Z, Yildirim E, Gupta S, Demir I (2022) Karrikinolide stimulated seed germination of artificially aged marrow, cabbage and pepper seeds through repair

- of cell structure and enzyme activity. *South African Journal of Botany* 151: 208-213.
37. Haigh A, Barlow W (1987) Germination and priming of tomato, carrot, onion and sorghum seeds in a range of osmotica. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 112: 202–208.
 38. Hussain S, Shaukat M, Ashraf M, Zhu C, Jin Q, Zhang J (2019). Salinity stress in arid and semi-arid climates: Effects and management in field crops. *Climate change and agriculture*, 13: 201-226.
 39. ISTA (International Seed Testing Association) (2017) *International Rules for Seed Testing*. ISTA, Zurich, Switzerland.
 40. Jorge G, Kisiala A, Morrison E, Aoki M, Nogueira A, Emery R (2019) Endosymbiotic *Methylobacterium oryzae* mitigates the impact of limited water availability in lentil (*Lens culinaris Medik.*) by increasing plant cytokinin levels. *Environmental and Experimental Botany* 162: 525–540.
 41. Kananont N, Pichyangkura R, Chanprame S, Chadchawan S, Limpanavech P (2010) Chitosan specificity for the *in vitro* seed germination of two *Dendrobium orchids* (Asparagales: Orchidaceae). *Scientia Horticulturae* 124: 239-247.
 42. Khan T, Peh K.; y Ch'ng H. 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal Pharmaceutical*. 3: 205-212.
 43. Kellmann-Sopyła W, Giełwanowska I (2015). Germination capacity of five polar Caryophyllaceae and Poaceae species under different temperature conditions. *Polar Biology*, 38: 1753-1765.
 44. Klagges M (2015) Evaluación de tolerancia al estrés salino en diferentes poblaciones de *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Cariophyllaceae). Tesis de Pregrado. Ing. Biotecnología Vegetal. Universidad de Concepción, Chile: 6–64.
 45. Klupczyńska E, Pawłowski T (2021) Regulation of seed dormancy and germination mechanisms in a changing environment. *International journal of molecular sciences* 22: 1357.
 46. Koc J, Androsiuk P, Chwedorzewska K, Cuba-Díaz M, Górecki R, Giełwanowska I (2018) Range-wide pattern of genetic variation in *Colobanthus quitensis*. *Polar Biology* 41: 2467–2479.

47. Kosakivska I, Voytenko L, Vasyuk V, Vedenichova N, Babenko L, Shcherbatyuk M (2019). Phytohormonal regulation of seed germination. *Fiziologia rastenij i genetika* 51: 187-206.
48. Llanes A, Andrade A, Masciarelli O, Alemanno S, Luna V (2016). Drought and salinity alter endogenous hormonal profiles at the seed germination phase. *Seed Science Research*, 26: 1-13.
49. Liao J, Wang Y, Hou B, Zhang J, Huang H (2023) Nano-chitin reinforced agarose hydrogels: Effects of nano-chitin addition and acidic gas-phase coagulation. *Carbohydrate Polymers* 313: 120902.
50. Lopiz Y, Arvinus C, García-Fernández C, Rodríguez-Bobada M, González-López P, Civantos A, Marco F (2017) Repair of rotator cuff injuries using different composites. *Revista Española de Cirugía Ortopédica Y Traumatología* 61: 51–62.
51. Mangena P (2021) Analysis of correlation between seed vigour, germination and multiple shoot induction in soybean (*Glycine max L. Merr.*). *Heliyon* 7: 7913.
52. Marín C (2015) Efecto de los iones cobre (II) sobre los mecanismos bioquímicos y morfo-fisiológicos de tolerancia en cuatro poblaciones de *Colobanthus quitensis*. Tesis de Pregrado. Ing. Biotecnología Vegetal. Universidad de Concepción, Chile: 8–65.
53. Marín Sánchez J, Mejía Contreras J, Hernández Livera A, Carballo Carballo A, Peña-Lomelí A (2007) Acondicionamiento osmótico de semillas de cebolla (*Allium cepa L.*). *Agricultura Técnica en México* 33: 63-71.
54. Mármol Z, Páez G, Rincón M, Araujo K, Aiello C, Chandler C, Gutiérrez E (2011) Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU* 1: 53-58.
55. Mehta M, Biradar S, Mahajan H, Bankhele R, Hivrale A (2022) Chitosan and chitosan-based nanoparticles in horticulture: past, present and future prospects. *Role of chitosan and chitosan-based nanomaterials in plant sciences* 453-474.
56. Miransari M, Smith D (2014) Plant hormones and seed germination. *Environmental and experimental botany* 99: 110-121.
57. Moore D (1970) Studies in *Colobanthus quitensis* (kunth) Bartl. and *Deschampsia antarctica* Desv. *Br Antarct Surb Bull* 23: 63-80.

58. Moyo M, Amoo S, Van Staden J (2022) Aqueous smoke and karrikin influence seed germination of *Amaranthus dubius* in varying light, temperature and osmotic stress conditions. *South African Journal of Botany* 148: 704–709.
59. Nge K, Nwe N, Chandkrachang S, Stevens W (2006). Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Science*, 170: 1185-1190.
60. Ontivero Y. 2023. Comunicación personal, Datos no publicados.
61. Ostojić J, Ljubojević M, Narandžić T, Pušić M (2022) *In vitro* culture conditions for asymbiotic germination and seedling development of *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich. and *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. *South African Journal of Botany* 150: 829–839.
62. Parada R, Egusa M, Aklog Y, Miura C, Ifuku S, Kaminaka H (2018) Optimization of nanofibrillation degree of chitin for induction of plant disease resistance: Elicitor activity and systemic resistance induced by chitin nanofiber in cabbage and strawberry. *International Journal of Biological Macromolecules* 118: 2185-2192.
63. Park M, Kim C, Yang J, Lee H, Shin W, Kim S, Sa T (2005) Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research* 160: 127-133.
64. Peña-Datoli M, Hidalgo-Moreno C, González-Hernández V, Alcántar-González E, Etchevers-Barra J (2016). Recubrimiento de semillas de maíz (*Zea mays* L.) con quitosano y alginato de sodio y su efecto en el desarrollo radical. *Agrociencia*, 50: 1091-1106.
65. Pipinis E, Milios E, Aslanidou M, Mavrokordopoulou O, Efthymiou E, Smiris P (2017) Effects of sulphuric acid scarification, cold stratification and plant growth regulators on the germination of *Rhus coriaria* L. seeds. *Journal of Environmental Protection and Ecology* 18: 544-552.
66. Ramírez M, Rodríguez A, Alfonso L, Peniche C (2010) La quitina y sus derivados, biopolímeros con potencialidades de aplicación agrícola. *Biotecnología aplicada* 27: 270-276.
67. Rao N, Hanson J, Dulloo M, Ghosh K (2007) Manual for seed management in germplasm banks (Manuals for Germplasm Banks No. 8). Bioversity International.

68. Rodríguez M, Chacón M, Carrillo R (2014) Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de *Ugni molinae*. *Bosque (valdivia)* 35: 119-122.
69. Roni M, Mahjuba A, Oue H, Liton M, Sadia S, Uddin AJ (2015) Influences of water stress on seed germination and early growth stage of five wheat genotypes. *Bangladesh Res* 10: 351-7.
70. Ruhland C, Day T (2001) Size and longevity of seed banks in Antarctica and the influence of ultraviolet-B radiation on survivorship, growth and pigment concentrations of *Colobanthus quitensis* seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 45: 143–154.
71. Sadeghi H, Robati Z (2015) Response of *Cichorium intybus* L. to eight seed priming methods under osmotic stress conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4: 443-448.
72. Sanhueza C, Vallejos V, Caviere L, Saez P, Bravo L, Corcuera L (2017) Growing temperature affects seed germination of the antarctic plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl (Caryophyllaceae). *Polar Biology* 40: 449-455.
73. Sastoque-Cala L, Mercado Reyes M, Martínez-Salgado M, Quevedo-Hidalgo B, Pedroza-Rodríguez A (2007) Producción de quitinasas extracelulares con una cepa alcalófila halotolerante de *Streptomyces* sp. aislada de residuos de camarón. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6: 137-146.
74. Semba R, Ramsing R, Rahman N, Kraemer K, Bloem M (2021) Legumes as a sustainable source of protein in human diets. *Global Food Security* 28: 100-520.
75. Seal C, Flowers T, Esnaud C, Yeo M, Muscolo A (2021) Is chloride toxic to seed germination in mixed-salt environments? A case study with the coastal halophyte *Suaeda maritima* in the presence of seawater. *Plant Stress* 2: 100030.
76. Smith R (2003) The enigma of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* in Antarctica 234- 239.
77. Solberg S, Yndgaard F, Andreassen C, Von Bothmer R, Loskutov I, Asdal Å (2020) Long-term storage and longevity of orthodox seeds: a systematic review. *Frontiers in Plant Science* 11: 1007.

78. Song Y, Li X, Zhang M, Xia G, Xiong C (2023) Effect of cold stratification on the temperature range for germination of *Pinus koraiensis*. Journal of Forestry Research 34: 221-231.
79. Świeca M, Gawlik-Dziki U, Kowalczyk D, Złotek U (2012) Impact of germination time and type of illumination on the antioxidant compounds and antioxidant capacity of *Lens culinaris sprouts*. Scientia Horticulturae 140: 87–95.
80. Taylor, AG (2020) Seed storage, germination, quality, and enhancements. En: Wien HC y Stützel H (Eds) Physiology of vegetable crops. Second Edition. CAB International. 30 pp.
81. Tang H, Zhang L, Hu L, Zhang L (2014) Application of chitin hydrogels for seed germination, seedling growth of rapeseed. Journal of plant growth regulation 33: 195-201.
82. Urbina I, Sardans J, Beierkuhnlein C, Jentsch A, Backhaus S, Grant K, Kreyling, J, Peñuelas J (2015) Shifts in the elemental composition of plants during a very severe drought. Environmental and experimental botany 111: 63-73.
83. van Treuren R, Bas N, Kodde J, Groot SPC, Kik C (2018) Rapid loss of seed viability in *ex situ* conserved wheat and barley at 4°C as compared to –20°C storage. Conservation Physiology 6: coy033.
84. Varela S, Arana V (2011) Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. Retrieved from https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_latencia.pdf
85. Vásquez D (2019) Expresión génica de *Colobantus quitensis* (Kunth) BARTL. Frente a salinidad, bajas temperaturas e iones hierro. Tesis Pregrado en Ingeniería en Biotecnología Vegetal. Universidad de Concepción, Chile 63 pp.
86. Velásquez C (2008) Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. Revista UDO Agrícola 8: 1-22.
- Ventury K, Rodrigues S, de Moura M, do Amaral G, Teixeira da Silva A, Perales J, Amâncio A (2022) Performance of cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) infesting seeds of different *Vigna unguiculata* (L.) Walpers genotypes: The association between bruchid resistance and chitin binding proteins. Journal of Stored Products Research 95: 101925.

87. Vertucci C, Roos E, Crane J (1994) Theoretical basis of protocols for seed storage III. Optimum moisture contents for pea seeds stored at different temperatures. *Annals of Botany* 7: 531-540.
88. Wagner E, Oplinger R (2017) Effect of overwinter hydration, seed storage time, temperature, and photoperiod on germination of some *Carex*, *Juncus*, and *Alopecurus* species. *Aquatic Botany* 137, 39- 49.
89. Wang Z, Baskin J, Baskin C, Yang X, Liu G, Ye X, Huang Z, Cornelissen J (2022) Great granny still ruling from the grave: Phenotypical response of plant performance and seed functional traits to salt stress affects multiple generations of a halophyte. *Journal of Ecology* 110:117–128.
90. Whitehouse K, Hay F, Lusty C (2020) Why seed physiology is important for genebanking. *Plants* 9: 584.
91. Wiszniewska A, Hanus-Fajerska E, Grabski K, Tukaj Z (2013). Promoting effects of organic medium supplements on the micropropagation of promising ornamental *Daphne* species (Thymelaeaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49: 51-59.
92. Wódkiewicz M, Ziemiański M, Kwiecień K, Chwedorzewska K, Galera H (2014) Spatial structure of the soil seed bank of *Poa annua* L.—alien species in Antarctica. *Biodiversity and Conservation* 23: 1339-1346.
93. Yang J, Zhang L, Jiang L, Zhan Y, Fan G (2021). Quercetin alleviates seed germination and growth inhibition in *Apocynum venetum* and *Apocynum pictum* under mannitol-induced osmotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 159: 268–276.
94. Zhang K, Zhang Y, Sun J, Meng J, Tao J (2021) Deterioration of orthodox seeds during ageing: Influencing factors, physiological alterations and the role of reactive oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry* 158: 475-485.
95. Zúñiga G, Zamora P, Ortega O (2009) Micropropagation of Antarctic *Colobanthus quitensis*. *Antarctic Science* 21: 149-150.

10. ANEXOS

Período	Tiempo de almacenamiento (meses)	Cantidad de réplicas	Total de semillas analizadas por período
S1-22	1-3	6	72
S4-21	4-6	12	144
S3-21	7-9	6	72
S2-21	10-12	9	108
S1-21	13-15	6	72
S4-20	16-18	9	108
S3-20	19-21	9	108
S2-20	22-24	6	72
S1-20	25-27	6	72
S2-19	34-36	3	36
S4-17	52-54	3	36
S2-17	58-60	3	36
S2-16	70-72	3	36
S3-15	82-84	3	36

Tabla Anexo 1: Tabla de datos del n muestral utilizado para el experimento 2.



Figura Anexo 1: Plantas de *Colobanthus quitensis* cultivadas en Jardín Común en el Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales, de las cuales se colectan las semillas usadas en los estudios de germinación *in vitro*. Las plantas crecen en cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad a una temperatura de $13 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

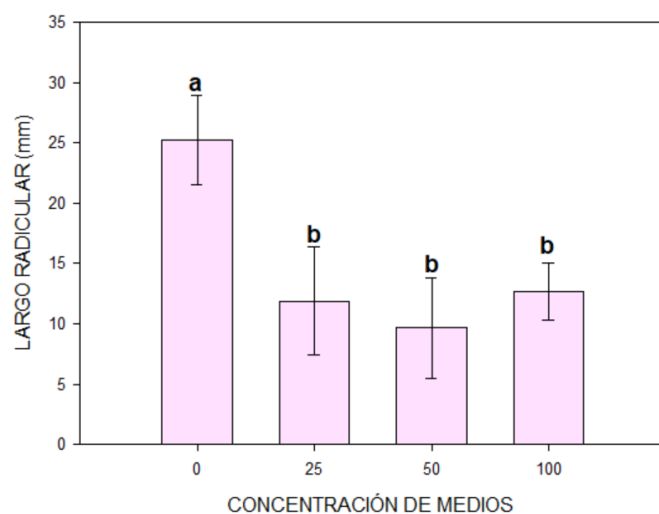


Figura Anexo 2: Largo radicular de plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en medio con distintos porcentajes (%) de concentración de Murashige y Skoog (MS). La medición se realizó al finalizar el ensayo (día 30). Se realizó test de una vía Tuckey HSD. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

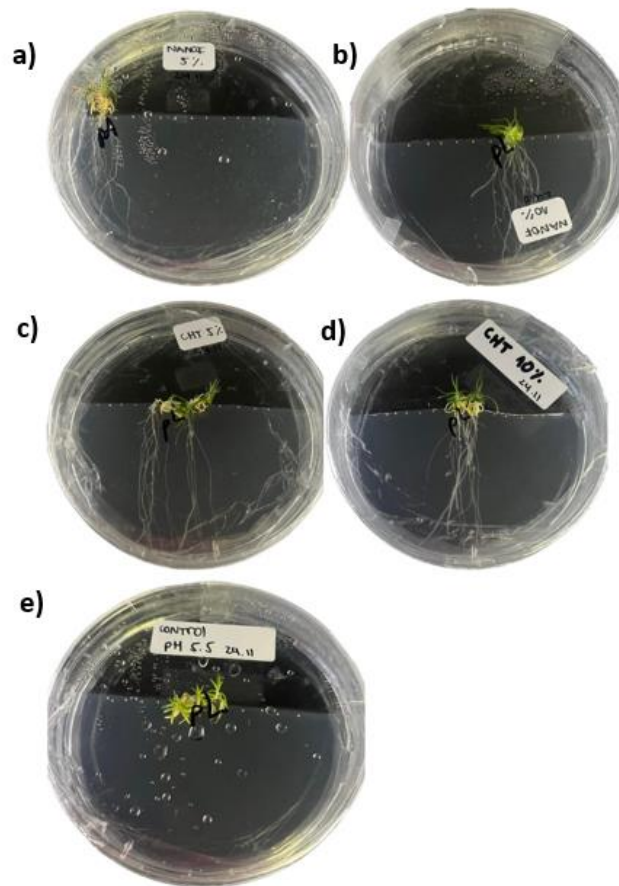


Figura Anexo 3: Plántulas de *Colobanthus quitensis* al finalizar el ensayo preliminar de productos de quitina (Quitosano y Nanofibras de quitina), para hacer comparación en la diferencia del largo radicular. En medio basal de 100% de MS y ajustado a pH 5.5 para evitar grumos. Las fotos fueron tomadas a los 60 días desde el experimento. a) Medio MS 100% + Nanofibras de quitina (NANOF) 5%, PH 5.5; b) Medio MS 100% + Nanofibras de quitina (NANOF) 10%, PH 5.5; c) Medio MS 100% + quitosano (CHT) 5%, PH 5.5; d) Medio MS 100% + quitosano (CHT) 10%, PH 5.5; e) Medio MS 100%, PH 5.5.

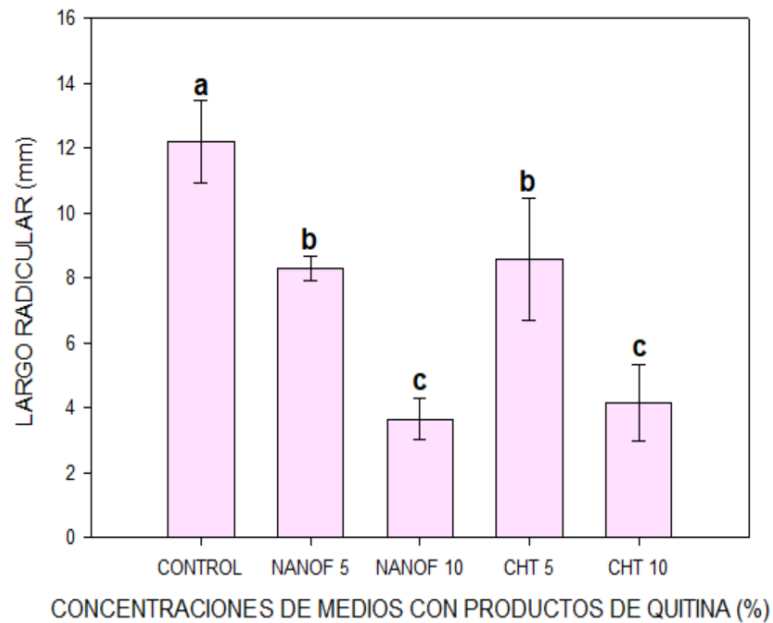


Figura Anexo 4: Largo radicular de plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en medio modificado (Agar + Sacarosa) más concentraciones de productos de quitina (Nanofibras de quitina (NANOF) y quitosano (CHT)), la medición se realizó al finalizar el ensayo (día 30). Se realizó test de una vía Tuckey HSD. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

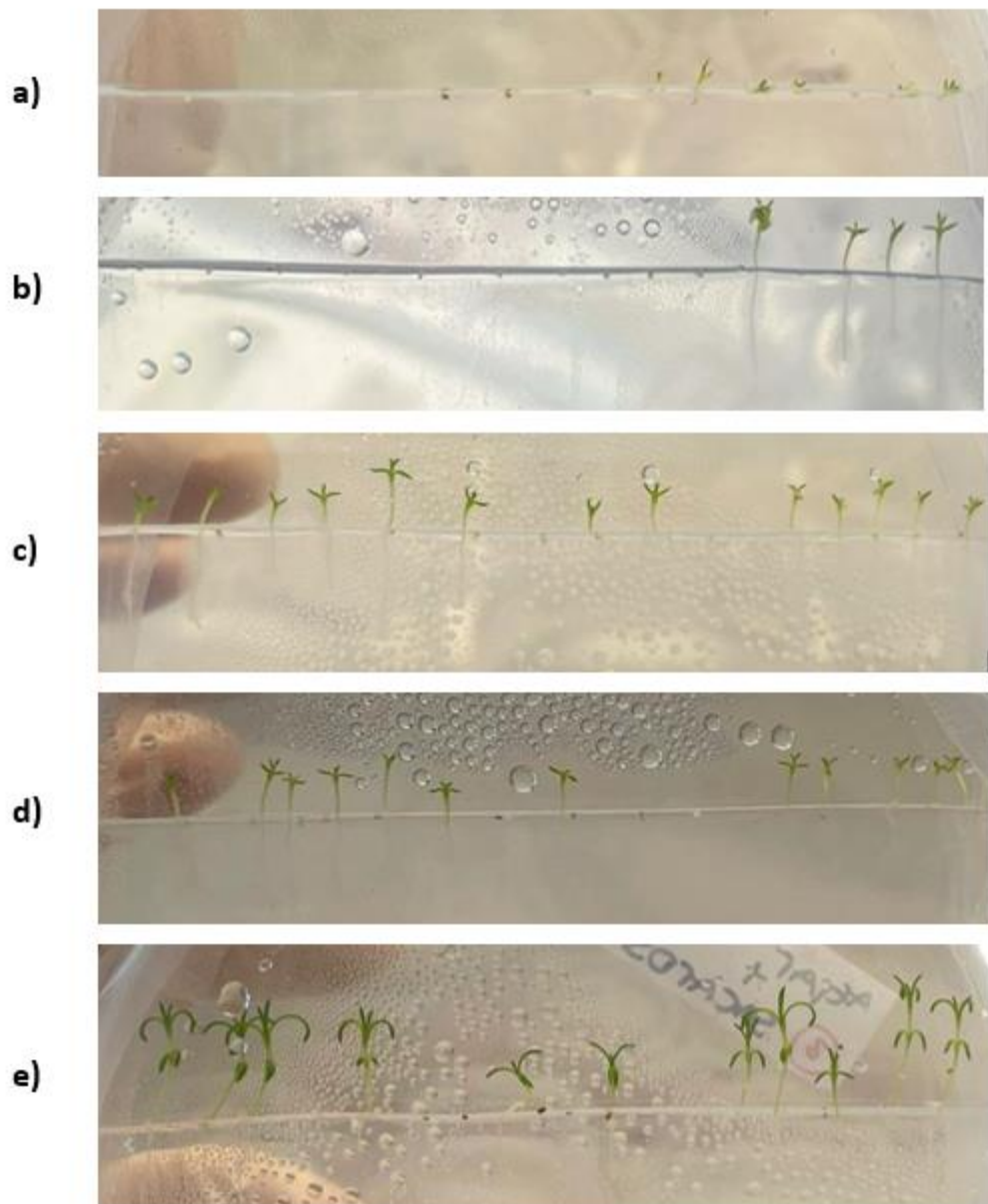


Figura Anexo 5: Plántulas de *Colobanthus quitensis* a los 30 días post ensayo de germinación, en medios Agar + Sacarosa pH 5.7, Con tratamiento osmótico aplicado a las semillas de *Colobanthus quitensis* 24 horas previas al sembrado. a) control, se aplica agua destilada a las semillas; b) Polietilenglicol (PEG) al 5%; c) Polietilenglicol (PEG) al 10%; d) Cloruro de potasio (KCl) al 5% y e) Cloruro de potasio (KCl) al 10%.

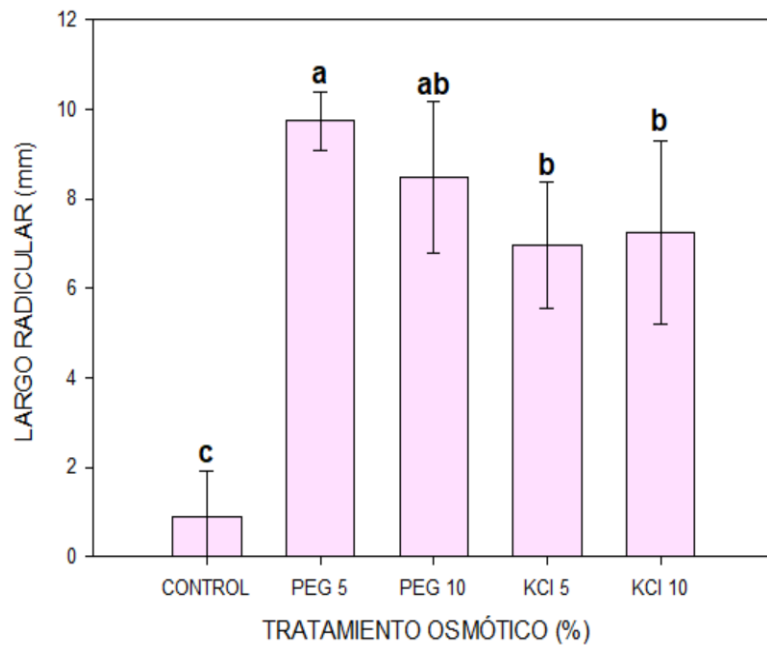


Figura Anexo 6: Largo radicular de plántulas de *Colobanthus quitensis* germinadas en medio modificado (Agar + Sacarosa) sometidas a tratamiento osmótico previo a la siembra. La medición se realizó al finalizar el ensayo (día 30). Se realizó test de una vía Tuckey HSD. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

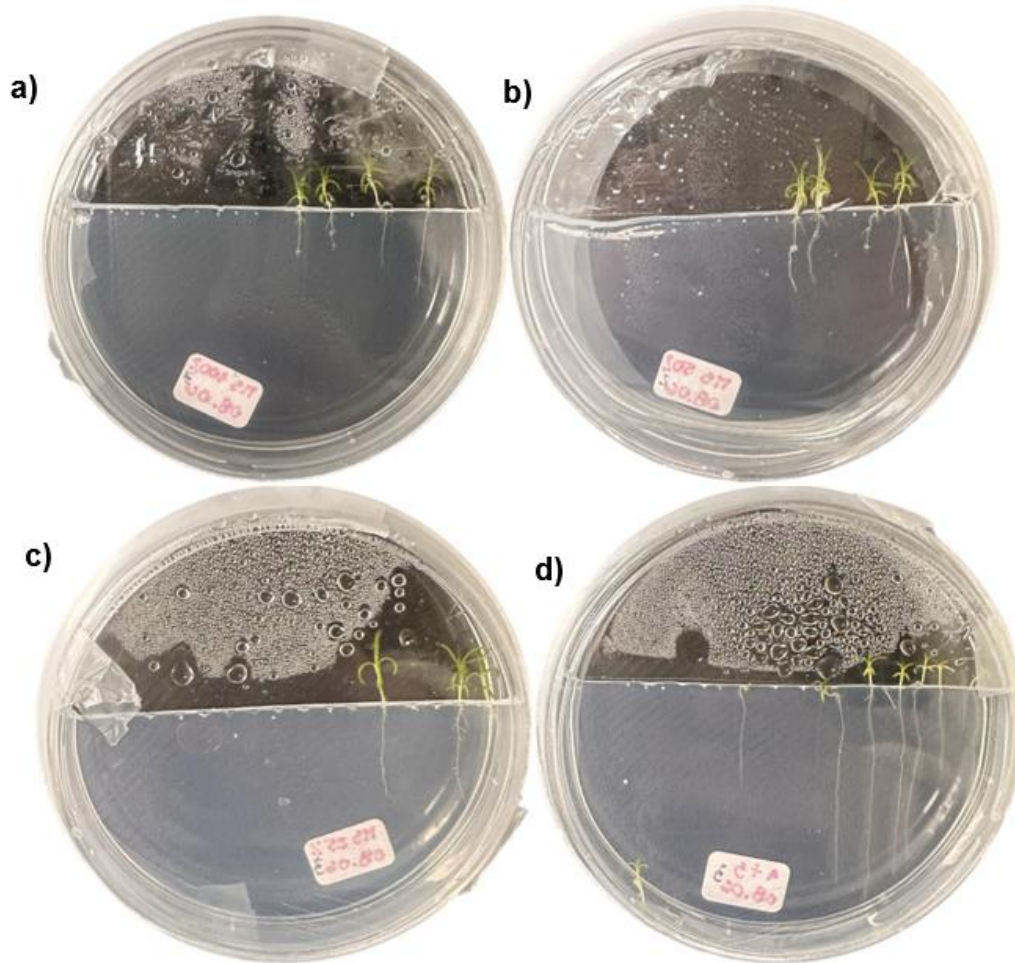


Figura Anexo 7: Plántulas de *Colobanthus quitensis* a los 30 días post ensayo de germinación, en medios con diferentes porcentajes del medio basal Murashige y Skoog (MS) (a)100%, b)50%, c)25% y d)0%). Se empieza a apreciar el amarillamiento de las plantas y las diferencias en el desarrollo radicular. En condiciones de cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

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

En caso de que aplique, marque con una "X" un único Objetivo de Desarrollo Sostenible como aporte principal y otro objetivo como aporte secundario.

Bloques	Objetivos	1°	2°
Personas	1. Poner fin a la pobreza en todas sus formas y en el mundo.		
	2. Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible		
	3. Garantizar una vida sana y promover el bienestar de todos y todas las edades.		
	4. Garantizar una educación inclusiva y equitativa de calidad y promover oportunidades de aprendizaje permanente para todos.		
	5. Lograr la igualdad de género y empoderar a todas las mujeres y las niñas.		
Planeta	6. Garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y el saneamiento para todos.		
	12. Garantizar modalidades de consumo y producción sostenible.		X
	13. Adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos.		
	14. Conservar y utilizar sosteniblemente los océanos, los mares y los recursos marinos para el desarrollo sostenible.		
	15. Proteger, restablecer y promover el uso sostenible de los ecosistemas terrestres, gestionar sosteniblemente los bosques, luchar contra la desertificación, detener e invertir la degradación de las tierras y detener la pérdida de biodiversidad.	X	
Prosperidad	7. Garantizar el acceso a una energía asequible, fiable, sostenible y moderna para todos.		
	8. Promover el crecimiento económico sostenido, inclusivo y sostenible, el empleo pleno y productivo y el trabajo decente para todos.		
	9. Construir infraestructuras resilientes, promover la industrialización inclusiva y sostenible y fomentar la innovación.		
	10. Reducir la desigualdad en los países y entre ellos.		
	11. Lograr que las ciudades y los asentamientos humanos sean inclusivos, seguros, resilientes y sostenibles.		
Paz	16. Promover sociedades pacíficas e inclusivas para el desarrollo sostenible, facilitar el acceso a la justicia para todos y construir a todos los niveles institucionales eficaces e inclusivas que rindan cuentas.		
Asociaciones	17. Fortalecer los medios de implementación y revitalizar la Alianza Mundial para el Desarrollo Sostenible		

