

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



**EXPRESIÓN GÉNICA DE *Colobanthus quitensis* (Kunth) BARTL. FRENTE A
SALINIDAD, BAJAS TEMPERATURAS E IONES HIERRO**

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

Dante Leonardo Vásquez Villa

Los Ángeles – Chile

2019

**EXPRESIÓN GÉNICA DE *Colobanthus quitensis* (Kunth) BARTL. FRENTE A
SALINIDAD, BAJAS TEMPERATURAS E IONES HIERRO**

Alumno

Dante Leonardo Vásquez Villa
Ingeniero en Biotecnología Vegetal

Profesor guía

Dra. Marely Cuba Díaz
Profesor Titular
Biólogo

Jefe de carrera

Ing. Pedro Lindor Quiroz Hernández
Instructor
Ingeniero en Ejecución forestal

Director de departamento

Pablo Andrés Novoa Barra
Profesor Asistente
Ingeniero de Ejecución Forestal



AGRADECIMIENTOS

Antes de presentar esta memoria de título debo expresar mis agradecimientos a todas aquellas personas que me han acompañado durante estos años de formación profesional y personal.

A mi profesora guía Dra. Marely Cuba, por recibirme en su laboratorio durante estos últimos años de formación universitaria, por su apoyo científico, críticas constructivas y comprensión durante el desarrollo de esta memoria de título.

Al Dr. Darío Navarrete Campos, miembro de la comisión evaluadora, por su apoyo, sugerencias, enseñanzas y palabras de aliento durante el desarrollo de esta investigación.

Quiero extender este agradecimiento a todos los profesores que durante estos años de carrera universitaria me han entregado conocimientos y herramientas para el futuro.

También agradecer a los compañeros que han formado parte del Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales, especialmente a Rodrigo Burgos por su trabajo constante en la mantención del material vegetal que permitió el desarrollo de esta investigación y a Estephanie Salamanca por su apoyo continuo en el desarrollo de esta memoria de título.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos y familia por su apoyo incondicional.





INDICE

RESUMEN.....	7
ABREVIACIONES	9
INTRODUCCIÓN.....	10
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
1. <i>Colobanthus quitensis</i> , una planta nativa de la Antártida	12
2. Antecedes respecto a salinidad	12
2.1 Transporte y compartimentación de iones sodio	13
2.2 Ajuste osmótico frente a salinidad.....	14
2.3 Señalización de la respuesta génica a salinidad.....	15
3. Antecedentes frente a bajas temperaturas.....	15
3.1 Carbohidratos solubles frente a bajas temperaturas.....	16
3.2 Factores de transcripción y genes de respuesta a bajas temperaturas	17
3.3 Metabolitos secundarios frente a bajas temperaturas.....	17
4. Antecedentes frente a iones metálicos (hierro).....	18
4.1 Transporte y compartimentación de hierro.....	19
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
1. Material vegetal y Diseño experimental	22
2. Diseño de partidores.....	23
2.1 Búsqueda de secuencias	23
2.2 Diseño de partidores (primer3plus.nl)	24
3. Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario.....	25
4. Validación de partidores y evaluación de la expresión génica.....	25

5. Determinación de prolina	26
6. Análisis estadístico	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
1. Búsqueda e identificación de secuencias en transcriptoma de <i>C. quitensis</i>	28
1.1 Genes de respuesta a salinidad.....	28
1.2 Genes de respuesta a bajas temperaturas	29
1.3 Genes de respuesta a iones metálicos (hierro).....	30
2. Validación de partidores	31
6.1 Genes de respuesta a salinidad.....	31
2.2 Genes de respuesta a bajas temperaturas.....	34
2.3 Genes de respuesta a iones metálicos (hierro).....	37
3. Análisis semi-cuantitativo de la expresión génica.....	40
3.1 Genes de respuesta a salinidad.....	40
3.2 Genes de respuesta a bajas temperaturas	43
3.3 Genes de respuesta a iones metálicos hierro	47
4. Contenido de prolina.....	51
CONCLUSIÓN.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55

RESUMEN

Las plantas, son organismos sésiles que no pueden sobrevivir a condiciones de estrés ambiental a menos que posean capacidad de adaptación. Las respuestas adaptativas involucran respuestas morfológicas, fisiológicas y expresión diferencial de genes. La creación de transcriptomas, bibliotecas de secuencias de ARN total, han facilitado la investigación en la transcripción diferencial de genes frente a factores ambientales como: sequía, salinidad, bajas temperaturas, exceso de iones metálicos, entre otros. En *Colobanthus quitensis*, una planta nativa de la Antártica, se han evidenciado cambios en la arquitectura de la planta y acumulación de osmolitos compatibles en respuesta al estrés. Sin embargo, actualmente existe poca información sobre cambios en la expresión génica frente a factores ambientales desfavorables en esta especie. La presente investigación evaluó la expresión de genes en respuesta a: salinidad, bajas temperaturas y exceso de iones hierro en plantas de *C. quitensis*. A partir de un transcriptoma recientemente ensamblado para *C. quitensis*, se diseñaron partidores específicos para genes que anteriormente se han descrito en respuesta a salinidad (*nhx*, *p5cs*, *rd22*), bajas temperaturas (*ice1*, *sps*, *pal*) e iones de hierro (*vit1*, *nramp3*, *fer3*). La expresión diferencial de genes se apreció mediante RT-PCR de tiempo final a partir de ARN total extraído desde plantas de *C. quitensis* que fueron sometidas por 24 y 120 hr. a salinidad (NaCl 150 mM), bajas temperaturas (4°C) e iones hierro (500 µM FeCl₃) en cultivo hidropónico. Además, se cuantificó el contenido de prolina, en las plantas control y final de los tratamientos. Un aumento significativo en la acumulación de ARNm se observó en el transcrito *p5cs* en plantas expuestas a salinidad, en los transcritos *vit1* y *fer3* en plantas expuestas a iones hierro, en ambos casos a las 120 hrs de tratamiento. En *sps*, el aumento de la expresión génica se detectó a las 24 hrs de exposición a bajas temperaturas. El contenido de prolina y la expresión del transcrito *p5cs* aumentaron significativamente en plantas sometidas a salinidad. La expresión de *p5cs*, también aumentó significativamente frente a bajas temperaturas, pero no así la acumulación del osmolito. En conclusión, *C. quitensis* presenta respuestas a nivel de transcripción frente a factores ambientales. Por otra parte, no es posible relacionar el aumento de la transcripción de *p5cs* con el aumento del contenido de prolina en los tejidos de clavelito antártico. Esta investigación es la primera que informa sobre respuestas a nivel de transcripción en *C. quitensis* frente a factores ambientales en condiciones controladas, marcando precedentes para futuras investigaciones.

ABSTRACT

Plants are sessile organisms that cannot survive environmental stress conditions unless they show adaptive capacity. Adaptive responses involve morphological and physiological responses and differential gene expression. The creation of transcriptomes, libraries with representative RNA sequences present in the plant, has facilitated research on differential gene transcription in response to environmental factors such as drought, salinity, low temperatures, excess of metal ions, among others. In *Colobanthus quitensis*, a plant native of Antarctica, morphological and biochemical responses to adverse environmental factors have been investigated, showing changes in plant architecture and accumulation of compatible osmolytes in response to stress. However, there is currently little information on changes in gene expression in response to unfavorable environmental factors in this species. The present investigation evaluated gene expression in response to salinity, low temperature, and excess iron ions in *C. quitensis* plants. From a newly assembled transcriptome for *C. quitensis*, specific primers were designed for genes that have previously been described in response to salinity (*nhx*, *p5cs*, *rd22*), low temperatures (*ice1*, *sps*, *pal*) and iron ions (*vit1*, *nramp3*, *fer3*). Differential gene expression was assessed by end-time RT-PCR from total RNA extracted from *C. quitensis* plants that were subjected for 24 and 120 h to salinity (NaCl 150 mM), low temperatures (4°C) and iron ions (500 µM FeCl₃) in hydroponic culture. In addition, proline content was quantified in the control plants and at the end of each treatments. A significant increase in mRNA accumulation was observed in the *p5cs* transcript in plants exposed to salinity, in the *vit1* and *fer3* transcripts in plants exposed to iron ions in both cases at 120 hr of treatment. On the other hand, in the *sps* transcript, increased gene expression was detected at 24 hr of exposure to low temperatures. The proline content and expression of the *p5cs* transcript increased significantly in plants subjected to salinity. The expression of *p5cs* also increased significantly at low temperatures, but osmolyte accumulation did not. In conclusion, *C. quitensis* showed transcriptional responses to environmental factors. On the other hand, it was not possible to relate increased *p5cs* transcription to increased proline content in Antarctic carnation tissues. This research is the first to report transcriptional responses in *C. quitensis* to environmental factors under controlled conditions, setting a precedent for future research.

ABREVIACIONES

ADNg	ADN genómico
ADNc	ADN codificante
ARNm	ARN mensajero
CBF	Factor de unión a repeticiones en C (C-repeat binding factor)
ICE1	Inductor de la expresión de CBF1 (Inducer of CBF1 expression)
HKT	Cotransportador Na ⁺ /K ⁺ (Na ⁺ /K ⁺ symporter)
FER3	Ferritina-3 (Ferritin-3)
NHX	Antiportador Na ⁺ /H ⁺ (Na ⁺ /H ⁺ antiporter)
NRAMP	Proteína natural asociada a resistencia de macrófagos (natural resistance-associated macrophage protein)
SPS	Sacarosa fosfato sintasa (sucrose phosphate synthase)
PAL	Fenilalanina amonio liasa (phenylalanine ammonia lyase)
P5CS	Delta-1-pirrolina-5 carboxilato sintasa (delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase)

INTRODUCCIÓN

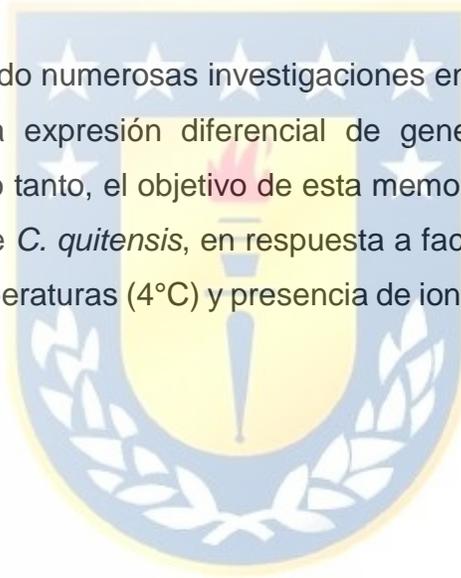
Colobanthus quitensis (Kunth) Bartl. o clavelito antártico es una *Cariophyllaceae* perenne, que se distribuye en la Antártica marítima, desde el sur de la Cordillera de los Andes hasta Ecuador, con un sitio en México, en altitudes que van desde los 0 hasta los 4.200 m.s.n.m (Moore 1970). Junto a *Deschampsia antarctica*, son las únicas plantas vasculares que han logrado colonizar de forma natural la Antártica, superando impedimentos geográficos y ambientales (Smith 2003).

Dada su amplia distribución, se han establecido poblaciones y ecotipos para *C. quitensis*. En un estudio desarrollado por Gianoli et al. (2004), se definieron los ecotipos de la cordillera de Los Andes de Chile central y de la Antártica marítima en términos de su morfología y tolerancia al frío. Sin embargo, este estudio mostró baja diversidad genética de las regiones ITS entre las poblaciones estudiadas. En un estudio realizado por Cuba-Díaz et al. 2017b, también se describieron las diferencias fenotípicas y genéticas entre plantas continentales y de Antártica insular. Al analizar la anatomía foliar del *C. quitensis* antártico y sub-antártico se reveló que las poblaciones más australes tienen: hojas más pequeñas, un mesófilo más grueso, superficies adaxiales más estrechas y mayor contenido de pigmentos, demostrando la plasticidad fenotípica de esta especie (Cavieres et al. 2016).

Las poblaciones de *C. quitensis* se desarrollan en ambientes adversos para el común de las plantas, esta especie presenta un crecimiento de baja altura denominado como cojín, que minimiza la pérdida de calor (Moore 1970). En lugares como la Antártica marítima, esta especie enfrenta condiciones ambientales extremas que incluyen fuertes vientos, temperaturas congelantes, baja disponibilidad de nutrientes, alta radiación UV y aerosol marino (Alberdi et al. 2002; Convey et al. 2014). En Cho et al. (2018) se observó que las estructuras compactas típicas del crecimiento de *C. quitensis* se aflojan cuando las plantas son cultivadas en cámaras de crecimiento a temperaturas mayores (16°C) que en su hábitat natural (2,7°C). Estos autores indicaron, que la expresión de todos los ortólogos del factor de transcripción interactivo del fitocromo, denominados como PIFs por su sigla en inglés Phytochrome Interacting Factors, son inhibidos por las bajas temperaturas. Los factores PIFs actúan como un regulador positivo en el crecimiento, promoviendo la elongación de las hojas (Quint et al. 2016).

Mediante diversas investigaciones se han evidenciado respuestas morfofisiológicas y bioquímicas de *C. quitensis* frente a factores ambientales tales como: salinidad, bajas temperaturas e iones metálicos (Gianoli et al. 2004; Bascuñán-Godoy et al. 2006, 2010; Klagges 2015; Arriagada 2017; Cuba-Díaz et al. 2017a,c). Recientemente, se determinó que el contenido de hierro en los tejidos foliares de *C. quitensis* supera ampliamente los niveles suficientes en las plantas (Contreras y Cuba 2015). Además, en un estudio realizado por Farías (2018), se determinó que la exposición a hierro (500 μM FeCl_3) no afecta la germinación *in vitro* de *C. quitensis*. Sin embargo, en estas condiciones se produjeron cambios en la arquitectura de la raíz de las plántulas germinadas en exceso de hierro respecto al control.

A pesar de que se han desarrollado numerosas investigaciones en *C. quitensis*, se poseen limitados antecedentes sobre la expresión diferencial de genes frente a condiciones abióticas (Cho et al. 2018). Por lo tanto, el objetivo de esta memoria de título es evaluar la expresión diferencial de genes de *C. quitensis*, en respuesta a factores ambientales como: la salinidad (NaCl), las bajas temperaturas (4°C) y presencia de iones hierro (500 μM FeCl_3).



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. *Colobanthus quitensis*, una planta nativa de la Antártida

Colobanthus quitensis (Kunth) Bartl. o clavelito antártico es una *Cariophyllaceae* perenne de amplia distribución (Moore 1970). En el extremo sur de su distribución se encuentra a nivel del mar, pero a lo largo de los Andes se limita a altitudes cada vez mayores hacia el norte, habitualmente sobre los 2500 m.s.n.m (Smith 2003). Esta planta muestra una considerable variabilidad morfológica a lo largo de su distribución, existe una clara diferenciación entre poblaciones continentales e insulares al evaluar parámetros como longitud y ancho de hoja, longitud de la raíz principal y diámetro de la corona (Cuba-Díaz et al. 2017b). Recientemente, en un análisis de la diversidad genética de esta especie, se demostró que, a pesar del bajo nivel de polimorfismo detectado por el método de genotipificación utilizado (9,57%), se encontró una alta diferenciación poblacional ($F_{ST} = 0,6241$), revelando tres agrupamientos de poblaciones denominados como Grupo Norte y Grupo Sur, y un tercer grupo conformado solo por la población del Parque Nacional Conguillío, Chile (Koc et al. 2018).

Hasta el momento se ha estudiado intensamente la adaptación morfofisiológica de *C. quitensis* frente a condiciones adversas como: salinidad (Klagges 2015; Arriagada 2017; Cuba-Díaz et al. 2017a) y bajas temperaturas (Bascañán-Godoy et al. 2006, 2012; Bravo et al. 2007; Arriagada 2017). Algunos estudios han utilizado radiación ultravioleta (Ruhland y Day 2000) y exceso de cobre (Cuba-Díaz et al. 2017c). Otros, han indagado sobre la acumulación de iones hierro, donde se determinó que una población Antártica de *C. quitensis* es capaz de acumular el metal en concentraciones que alcanzan los 6.983,33 mg/kg en tejido foliar (Contreras y Cuba 2015).

2. Antecedes respecto a salinidad

Colobanthus quitensis, es una planta que muestra tolerancia moderada a la salinidad (Cuba-Díaz et al. 2017a). Se ha descrito compartiendo ambiente con plantas indicadoras de ambiente salino, como *Puccinellia biflora* en un estuario inundable en las cercanías a Punta Arenas, Chile, donde incluso puede tolerar anegamiento por aguas salobres (Cuba-Díaz et al. 2013); desarrollándose en sitios que se inundan con agua salada en las cercanías de la

Laguna San Rafael, en el Parque Nacional Laguna San Rafael, Región de Aysén (Pisano 1988), o recibiendo aerosol marino en las islas de la Península Antártica (Convey et al. 2014).

En estudios desarrollados por Klagges (2015) y Arriagada (2017) se ha caracterizado la respuesta morfofisiológica y bioquímica de *C. quitensis* frente a salinidad en condiciones de jardín común. En ambas investigaciones se aplicaron tratamientos con cloruro de sodio (50 y 150 mM NaCl) para simular un ambiente salino, donde se observó disminución de número y largo de hojas, reducción del desarrollo radicular, menor contenido hídrico, aumento de clorosis foliar. Klagges (2015) observó un aumento significativo del contenido de prolina, un osmoprotector que frecuentemente se acumula en situaciones de estrés (Ashraf y Foolad 2007).

Los principales factores que afectan negativamente el crecimiento de la planta en condiciones de alta salinidad son el estrés osmótico y el estrés iónico, los que pueden provocar inhibición del crecimiento y graves daños en los tejidos (Maathuis et al. 2014). Se han propuesto diversos mecanismos de tolerancia a salinidad en plantas para mantener la homeostasis iónica celular. Dentro de éstos se encuentran el transporte, compartimentación, exclusión y secreción de iones (Gupta et al. 2014), la acumulación de osmolitos compatibles (Ashraf y Foolad 2007) y la inducción de la transcripción de genes que sintetizan proteínas de respuesta al estrés (Wang et al. 2012).

A continuación, se detallan algunos los mecanismos de tolerancia al estrés por salinidad.

2.1 Transporte y compartimentación de iones sodio

Se han identificado varios transportadores de iones sodio (Na^+) que colaboran con la homeostasis cuando existen altas concentraciones de éstos en células vegetales. Uno de ellos son los transportadores NHX (antiportador Na^+/H^+), los cuales actúan secuestrando iones sodio en la vacuola durante el estrés salino, manteniendo así una alta relación K^+/Na^+ en el citosol, especialmente en hojas y brotes (Hauser y Horie 2010; Hoire et al. 2010). Otros mecanismos de tolerancia a iones sodio involucran los transportadores HKT (cotransportador Na^+/K^+), donde se proponen tres modelos de protección:

sobreacumulación de Na^+ en las partes aéreas, carga de iones sodio al floema y eliminación del ion del xilema (Hauser y Horie 2010).

En el mantenimiento de la homeostasis celular también está involucrado el antiportador de membrana Na^+/H^+ (SOS1) (Ji et al. 2013). Mediante análisis fisiológicos en plantas mutantes *Arabidopsis thaliana*, donde *sos1* esta silenciado, se demostró que SOS1 está involucrado en el flujo de salida de iones sodio desde el citosol al medio circundante en las células epidérmicas, manteniendo bajas concentraciones de Na^+ en las células de la raíz (Ji et al. 2013).

2.2 Ajuste osmótico frente a salinidad

El ajuste osmótico es un mecanismo de adaptación a ambientes adversos, involucra compuestos orgánicos de bajo peso molecular como aminoácidos, azúcares y alcoholes polihídricos, todos ellos denominados “osmolitos compatibles” que mantienen la turgencia en condiciones de déficit hídrico (Slama et al. 2015).

La prolina, es uno de los principales osmolitos orgánicos que se acumulan en plantas en respuesta a tensiones ambientales como: sequía, salinidad, temperaturas extremas, radiación ultravioleta y metales pesados en el sustrato (Ashraf y Foolad 2007; Amini et al. 2015). Se ha descrito que la inducción de biosíntesis de prolina está precedida por un rápido aumento del nivel de transcritos de delta-1-pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS), una de las principales enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de prolina (Amini et al. 2015). Lo que fue evidenciado en *Arabidopsis thaliana*, donde al cultivar plántulas con tratamientos de 100, 150 y 200 mM NaCl se aumenta la expresión de *p5cs* (Strizhov et al. 1997).

En *C. quitensis* se ha detectado que la acumulación de prolina es significativamente mayor en plantas tratadas con 150 mM de NaCl, respecto a plantas cultivadas en condiciones control luego de 7 y 21 días de tratamiento (Klagges 2015). Sin embargo, no se posee información respecto a cambios de los niveles de transcripción de *p5cs* en clavelito antártico.

2.3 Señalización de la respuesta génica a salinidad

En plantas, la transcripción de genes que responden al estrés osmótico depende, principalmente, de dos clases de elementos que actúan en *cis* en las regiones promotoras del gen: elementos que responden a ácido abscísico (ABRE) y elementos que responden a la deshidratación (DRE) (Kim et al. 2011). Los factores de transcripción dependientes e independientes de ácido abscísico (ABA) tienen un papel importante en la expresión génica sensible al estrés osmótico provocado por sequía o salinidad (Sun et al. 2014; Yoshida et al. 2015). La inducción de proteínas de respuesta a desecación como RD22 es provocada en *A. thaliana* por déficit hídrico, estrés por salinidad y aplicación de ABA, por lo tanto el aumento del ARNm de *rd22* se utiliza como indicador de estrés en plantas (Wang et al. 2012).

3. Antecedentes frente a bajas temperaturas

Colobanthus quitensis, es una planta adaptada a climas extremos de bajas temperaturas, en climas de alta montaña en la cordillera de Los Andes cubierta en ocasiones por nieve y en la Península Antártica donde se encuentra a temperaturas congelantes la mayor parte del año (Moore 1970).

Las bajas temperaturas disminuyen la eficiencia de la fotosíntesis en las plantas, mediante el deterioro de pigmentos fotosintéticos y reduciendo enzimas claves en el ciclo de Calvin (Xiong et al. 1999). Un estudio realizado en *C. quitensis* por Edwards y Smith (1988) donde se utilizaron plantas de la Península Antártica e Islas Sub-antárticas, propagadas en invernaderos y parcelas al aire libre cerca de Cambridge, Reino Unido, precisó que la temperatura óptima para la fotosíntesis neta para esta especie es 19°C, con un rango entre 14° y 22°C. Posteriormente, en un estudio *in situ* realizado por Xiong et al. (1999), en la isla más oriental de Stepping Stones en la Antártica, se determinó que la fotosíntesis neta de *C. quitensis* es óptima a 14°C, más tarde, estos autores (2000) estudiaron la aclimatación fotosintética y desarrollo de *C. quitensis* en regímenes de temperaturas diurnas definidas como sub-óptimas (7°C), casi óptimas (12°C) y supra-óptimas (20°C), en donde estas últimas lograron una mayor tasa de crecimiento relativo y mayor biomasa total en relación a las plantas cultivadas a temperaturas diurnas de 7° y 12°C. Adicionalmente, se concluyó que la fotosíntesis neta ($P(n)$), medida en las temperaturas diurnas de crecimiento, fue más

alta en plantas cultivadas a 12°C, por su parte a los 7 y 20°C se registró menor contenido de clorofila, donde la fotosíntesis neta en plantas cultivadas a 20°C es menor y compensada con el aumento del área foliar. Por lo anterior, se define para esta investigación un tratamiento de baja temperatura, a la exposición de plantas de *C. quitensis* a temperaturas menores a 7°C.

En el común de las plantas, las bajas temperaturas producen una serie de alteraciones que debilitan el funcionamiento celular (Livingston 1996). La tolerancia al frío o bajas temperaturas es el resultado de varios mecanismos crio-protectores, los que operan conjuntamente para disminuir el punto de congelamiento del citoplasma, previniendo la plasmólisis durante la deshidratación celular, mecanismos que también aportan a la estabilización de proteínas y lípidos (Livingston 1996).

A continuación, se mencionan algunos de los mecanismos descritos como respuesta de las plantas a las bajas temperaturas, y su relación con la transcripción de genes.

3.1 Carbohidratos solubles frente a bajas temperaturas

Al analizar carbohidratos solubles en plantas de *C. quitensis* recolectadas en la Península Antártica se logró determinar la presencia de glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa, *myo*-inositol, rafinosa, estaquiosa, entre otros (Piotrowicz-Cieślak *et al.* 2005). Entre ellos, destaca la sacarosa, un carbohidrato que puede desempeñar un rol esencial en osmorregulación y crio-protección en los tejidos vegetales en situaciones de bajas temperaturas y déficit hídrico (Huber y Huber 1996).

Una enzima clave en la síntesis de sacarosa es la sacarosa fosfato sintasa (SPS), al investigar el comportamiento de esta enzima en plantas de *C. quitensis* frente a bajas temperaturas (4°C), se observó que la actividad de SPS aumenta al doble, permitiendo incrementar 4 veces la concentración de sacarosa en los tejidos (Bascañán-Godoy *et al.* 2006).

Posteriormente, se determinó un incremento significativo del contenido de azúcares solubles totales en plantas de tres poblaciones de *C. quitensis*, dos continentales y una

antártica, donde la acumulación de sacarosa fue mayor en plantas continentales, al ser tratadas con bajas temperaturas (4°C) (Arriagada 2017).

3.2 Factores de transcripción y genes de respuesta a bajas temperaturas

La familia de factores de transcripción de unión a repeticiones en C (C-repeat binding factors, CBF), son los principales elementos de señalización en respuesta al estrés por frío en las plantas (Stockinger et al. 1997), éstos activan genes de respuesta al frío (cold-response gene, COR) que conforman la respuesta al frío en plantas (Gilmour et al. 1998). En un estudio realizado por Chinnusamy et al. (2003), se evidenció que el factor de transcripción ICE1 (inductor de la expresión 1 de CBF) es capaz de aumentar la transcripción de los genes *cbf* expuesto a bajas temperaturas. Por su parte, en un mutante de *A. thaliana*, con el gen *ice1* silenciado, se obtuvo como consecuencia una disminución en la transcripción de *cbf3*, lo cual disminuyó la expresión de genes regulados por CBF, lo que finalmente condujo a una menor tolerancia a bajas temperaturas (Chinnusamy et al. 2003). Por tanto, es importante investigar los cambios en los niveles de expresión de los factores de transcripción en *C. quitensis*.

3.3 Metabolitos secundarios frente a bajas temperaturas

El estrés térmico dado por la exposición de las plantas a bajas temperaturas, desencadena la biosíntesis de fenilpropanoides, como antocianinas y ácidos fenólicos solubles (Christie et al. 1994). En la ruta de síntesis de estos metabolitos secundarios, encontramos la enzima fenilalanina amoniaco-liasa (PAL), la actividad de esta enzima se intensifica con la exposición a bajas temperaturas, promoviendo la tolerancia a estas en plantas de *A. thaliana*, donde se observó que los niveles de transcritos de *pal* aumentaron después de 10 hrs de exposición a frío (4°C), alcanzando el máximo entre 2 y 7 días de tratamiento (Leyva et al. 1995). En *Triticum aestivum* L. se observó el aumento de L-fenilalanina en hojas y nódulos en plantas tratadas con bajas temperaturas respecto a plantas control (Olenichenko y Zagoskina 2005). En *C. quitensis* no se poseen antecedentes respecto a la actividad o transcripción de PAL.

4. Antecedentes frente a iones metálicos (hierro)

El hierro es un micronutriente esencial para las plantas, juega un rol fundamental en procesos metabólicos como la síntesis del ADN y fotosíntesis, además de formar parte de muchas enzimas (Rout y Sahoo 2015). Al evaluar la disponibilidad de nutrientes como el hierro y otros metales en suelos en donde habita *C. quitensis* en las cercanías de la Estación de Investigación Henryk Arctowski (Isla Rey Jorge, Antártica), se encontró que el hierro es el metal más abundante (4.289,94 mg/Kg) y con baja variación entre los distintos suelos (coeficiente de variación = 7,25%), seguido por manganeso (131,58 mg/Kg), cobre (55,27 mg/Kg), zinc (35,89 mg/Kg) y boro (2,46 mg/Kg) (Lachacz et al. 2018).

Debido a lo anterior, existen diversos estudios en *C. quitensis* donde se evalúa sus respuestas frente a iones metálicos. En Cuba-Díaz et al. (2017c) se evaluó la respuesta de clavelito antártico a iones cobre, en donde la concentración 500 μM Cu^{+2} produjo disminución del desarrollo de nuevos brotes, hojas y raíces, disminución del contenido de clorofila *a*, aumento del estrés oxidativo y acumulación de prolina en los tejidos de la planta, esta última actúa como osmoprotector quelante de iones metálicos (Viehweger 2014).

Asimismo, se determinó el contenido de micronutrientes en tejidos foliares de *C. quitensis* recolectadas en las cercanías de Punta Arenas e Islas Antárticas, en ellas se encontraron concentraciones de hierro superiores a 1.200 mg/Kg, superando ampliamente los niveles considerados suficientes en las plantas (50-200 mg/Kg) (Contreras y Cuba 2015).

Posteriormente, se evaluó la germinación y el crecimiento radicular de *C. quitensis* en presencia de iones hierro, en el cual no se detectaron diferencias en el porcentaje de germinación entre los tratamientos (250 y 500 μM de FeCl_3). Sin embargo, en las primeras etapas de desarrollo radicular, luego de la germinación en presencia de iones hierro (500 μM de FeCl_3), no se observó incremento de la longitud radicular, ni tampoco un aumento en la cantidad de raíces laterales, como se observó en las plántulas cultivadas sin exceso de hierro. Por otra parte, se observó un aumento del número de raíces primarias en plántulas cultivadas en presencia de 500 μM de FeCl_3 (Farías 2018).

4.1 Transporte y compartimentación de hierro

El hierro es capaz de aceptar y donar electrones en la cadena transportadora de electrones durante la fotosíntesis y la respiración celular. Sin embargo, cuando se acumula en altas concentraciones es considerado tóxico, ya que puede generar radicales hidroxilo que causan daños en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Connolly y Guerinot 2002).

Para lograr la homeostasis celular, las plantas deben proceder a la acumulación de metales pesados que permiten tolerancia a la exposición (Oomen et al. 2009). El almacenamiento intracelular es realizado mayoritariamente por la Ferritina, una proteína que se localiza en el estroma, principalmente en cloroplastos y plastos no fotosintéticos (Briat et al. 2010). La Ferritina, está compuesta por 24 subunidades, con una estructura en forma de esfera hueca que logra almacenar hasta 4.500 átomos de hierro en su núcleo (Connolly y Guerinot 2002). En estudios relacionados con la homeostasis del hierro en cultivos de soja y maíz, se ha demostrado que este metal es capaz de regular positivamente la expresión de ferritina de las plantas (Wei y Theil 2000; Petit et al. 2001).

La acumulación de hierro en la vacuola es otra alternativa para la acumulación de hierro en células vegetales, la que actúa como una fuente inicial de metales durante la germinación, antes de que sea posible la captación desde el ambiente externo (Conte y Walker 2011). Sin embargo, la hipótesis del ingreso de hierro hacia la vacuola sólo pudo validarse con el descubrimiento del transportador de hierro en vacuola 1 (VIT1) en *A. thaliana* (Kim et al. 2006). Este transportador mostró un 62% de similitud de aminoácidos con el transportador CCC1 (complementos cruzados Ca(II) fenotipo *csg1*), el cual es responsable del transporte de hierro y manganeso en vacuolas de células de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) (Li et al. 2001; Kim et al. 2006). En levaduras (*S. cerevisiae*) con el gen *ccc1* silenciado que expresaban *vit1*, se observó que las células fueron capaces de acumular hierro y manganeso en vacuolas, por el contrario, cuando se analizaron las mutantes para el gen *ccc1* por sí solo, la acumulación de metales no fue observada (Kim et al. 2006).

Otra familia de transportadores de metales, son las proteínas asociadas a la resistencia natural en macrófagos (NRAMP). Capaces de transportar múltiples iones metálicos como manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe), cadmio (Cd), níquel (Ni) y cobalto (Co) (Nevo y Nelson 2006).

Los primeros estudios sobre las funciones de NRAMP en plantas, indicaron un papel en la homeostasis del hierro (Curie et al. 2000), donde se complementó el fenotipo de levaduras deficientes en la absorción de metales (*smf1*) con secuencias génicas que codifican NRAMP en *A. thaliana* (*AtNramp3* y *AtNramp4*), observándose un aumento en la adsorción de hierro (Thomine et al. 2000).

A partir de los antecedentes mencionados respecto de la respuesta de *C. quitensis* a diferentes condiciones ambientales, y la búsqueda en la literatura de genes cuya expresión sea regulada en respuesta a estrés ambiental; se seleccionaron los siguientes genes para esta investigación: salinidad (*nhx*, *p5cs*, *rd22*), bajas temperaturas (*ice1*, *sps*, *pal*) e iones hierro (*vit1*, *nramp3*, *fer3*). La acumulación de transcritos de estos genes, junto a la acumulación de prolina fue evaluada en plantas de *C. quitensis* sometidas a tratamientos de salinidad, bajas temperaturas e iones hierro.



HIPÓTESIS

- i. La expresión de genes claves relacionados con respuesta a salinidad, bajas temperaturas e iones metálicos (hierro) incrementa en plantas de *Colobanthus quitensis* cuando son expuestas a estos agentes abióticos.
- ii. La aplicación de tratamientos de salinidad, bajas temperaturas e iones hierro en plantas de *Colobanthus quitensis* provocará un aumento en la acumulación de prolina que podría asociarse a un incremento en la expresión del gen *p5cs*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la acumulación de transcritos de genes de respuesta a salinidad (*nhx*, *p5cs*, *rd22*), bajas temperaturas (*ice1*, *sps*, *pal*) e iones hierro (*vit1*, *nramp3*, *fer3*) en plantas de *Colobanthus quitensis*, y determinar el efecto de estos tratamientos con el contenido de prolina y expresión de *p5cs*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar partidores específicos para secuencias génicas de *Colobanthus quitensis* relacionadas con la respuesta a salinidad, bajas temperaturas e iones hierro seleccionadas desde un transcriptoma de esta especie.
2. Analizar la acumulación de transcritos de estos genes en respuesta a salinidad, bajas temperaturas e iones hierro en *C. quitensis*.
3. Determinar la acumulación de prolina en plantas de *C. quitensis* expuestas a condiciones de salinidad, bajas temperaturas e iones hierro.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal y Diseño experimental

Para el desarrollo de los experimentos se utilizaron 99 individuos de *Colobanthus quitensis*, población Arctowski (Antártica marítima) del Banco de Germoplasma Activo de plantas vasculares antártica del Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales del Campus Los Ángeles de la Universidad de Concepción. A partir de plantas cultivadas *in vitro* (Cuba-Díaz et al 2014), se tomaron al azar individuos, cuyas raíces fueron lavadas cuidadosamente con agua destilada y pasadas a un cultivo hidropónico (Cho et al. 2018), donde fueron sometidas a los diferentes tratamientos.

Las plantas fueron individualizadas utilizando una esponja de poliuretano como soporte sobre una malla cuadrículada de polietileno, en bandejas con capacidad de 1 L de solución nutritiva (MS al 50%). Las plantas fueron aclimatadas durante 24 hrs al cultivo hidropónico a una temperatura de 13°C, con un fotoperiodo de 16/8 hrs. luz/oscuridad, a una intensidad lumínica de $100 \pm 20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, con un sistema de aireación constante para garantizar el intercambio gaseoso a nivel radicular (Fig. 1).

Los tratamientos se realizaron por separado. Para el tratamiento salino (NaCl) se reemplazó la solución nutritiva por otra que contenía MS al 50% más 150 mM de NaCl. Para el tratamiento a baja temperatura, se traspasó una bandeja a una cámara de crecimiento con temperatura de 4°C, en iguales condiciones de intensidad lumínica, y se reemplazó la solución con MS al 50% previamente enfriada a 4°C. Para el tratamiento con iones hierro se reemplazó la solución nutritiva por una con MS al 50% con una concentración de 500 μM FeCl_3 . Los tratamientos de NaCl 150 mM e iones hierro 500 μM se mantuvieron a 13°C.

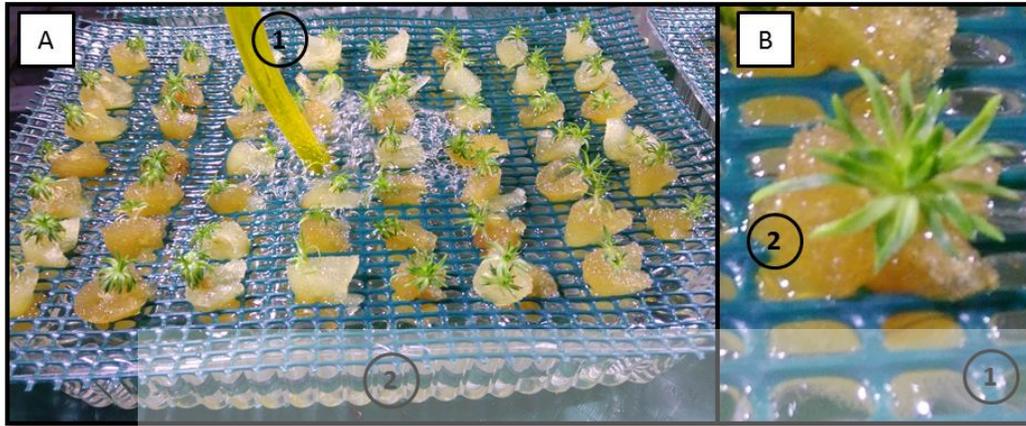


Fig. 1: Cultivo hidropónico de *Colobanthus quitensis*, población Arctowski. En A se muestra 1: Conexión a sistema de aireación. 2: Bandeja con capacidad 1 L. En B se muestra: 1 malla cuadriculada de polietileno. 2: esponja de poliuretano.

Para el análisis de expresión génica se tomaron **muestras** de plantas a las 24 hrs y 120 hrs de iniciado cada tratamiento y se consideraron como control plantas cultivadas *in vitro* (*C. in vitro*) y plantas aclimatadas 24 hrs en cultivo hidropónico (*C. hidroponía*). Para la determinación del contenido de prolina solo se consideraron muestras de 120 hrs de iniciado cada tratamiento. En cada muestreo se tomaron tres réplicas (individuos separados) para la determinación de la expresión génica. Mientras que, para la determinación de prolina, se combinaron individuos hasta alcanzar 250 mg de tejido vegetal (de 3 a 5 individuos) y se consideraron tres réplicas para cada muestra. Las muestras recolectadas fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas a -80°C hasta el momento en que fueron procesadas.

2. Diseño de partidores

2.1 Búsqueda de secuencias

Se procedió a la búsqueda de secuencias de genes relacionados con la respuesta a la salinidad, bajas temperaturas e iones metálicos (hierro) (Tabla 1) a partir de un transcriptoma ensamblado por el grupo de investigadores del Instituto de Biotecnología Vegetal de la Universidad Andrés Bello, facilitado para esta memoria de título en el marco de la validación de este nuevo transcriptoma de *C. quitensis*.

Una vez encontradas las secuencias génicas en el transcriptoma de *C. quitensis* que codifican para los genes indicados en la Tabla 1, se procedió a la verificación del porcentaje de identidad de las secuencias con otras secuencias anteriormente descritas en la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para ello se utilizó la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) utilizando la función BlastX (nucleótidos → aminoácidos). Como criterio de selección se consideraron las secuencias con identidad superior al 80%.

Tabla 1: Genes relacionados con salinidad, bajas temperaturas e iones hierro.

Condición ambiental	Genes	Referencia
Salinidad	<i>Nhx</i>	Hauser y Horie 2010
	<i>Hkt</i>	
	<i>sos 1</i>	Ji et al. 2013
	<i>p5cs</i>	Strizhov et al. 1997
	<i>rd22</i>	Wang et al. 2012
Bajas temperaturas	<i>ice1</i>	Chinnusamy et al. 2003
	<i>Sps</i>	Solís-Guzmán et al. 2017
	<i>cbf5</i>	Gilmour et al. 1998
	<i>Pal</i>	Leyva et al. 1995
Iones metálicos (hierro)	<i>Ferritina</i>	Briat et al. 2010
	<i>vit1</i>	Kim et al. 2006
	<i>nramp3</i>	Thomine et al. 2000

2.2 Diseño de partidores (primer3plus.nl)

Desde zonas de empalme entra las secuencias de *C. quitensis* con otras anteriormente descritas en otras especies, se diseñaron juegos de partidores utilizando la plataforma online Primers3plus.nl (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) con las siguientes especificaciones: tamaño del partidor de 22±2 pares de bases (pb), temperatura melting de 60±3°C con una máxima diferencia de 5°C entre forward y reverse, un porcentaje GC 50±10%, restringiendo la repetición consecutiva de nucleótidos a no mayor a tres pares de bases (pb).

Adicionalmente, los partidores fueron analizados termodinámicamente con la herramienta OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Se seleccionaron

uno o dos juegos de partidores para cada uno y fueron sintetizados por MacroGen, Inc. (Seúl, Corea del Sur).

3. Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario

Para el análisis de expresión génica, se extrajo el ARN total de plantas de *C. quitensis* (50-70 mg) mediante el kit Quick-RNA™ Plant Miniprep (Zymo Research). El ARN se cuantificó en un espectrofotómetro (GENESYS 10s UV-VIS). La integridad del ARN total se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Posteriormente se procedió a la síntesis de ADN complementario (ADNc).

Se trataron 2 µg de ARN con DNasa RQ1 RNase-Free DNase (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, se realizó la síntesis de ADNc mediante la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega) utilizando random primers (Promega) según las indicaciones del fabricante. Finalmente, se obtuvieron de 25 µL ADNc de cada muestra, las que fueron diluidas a una concentración de trabajo de 1:20.

4. Validación de partidores y evaluación de la expresión génica

La validación de partidores se realizó mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador (BIOER-LifeEco Touch). Cada par de partidores se probó en muestras de ADNc, ADN genómico (ADNg) y agua libre de nucleasas. Las reacciones se prepararon con el master mix SapphireAmp® Fast PCR (TAKARA), siguiendo las instrucciones del fabricante modificando la concentración de trabajo de los partidores a 0,4 µM. Los resultados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X.

La evaluación semi-cuantitativa de la expresión génica se realizó mediante análisis densitométrico de los productos de PCR visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa, utilizando el software ImageJ (NIH). En el cual, se compararon muestras *in vitro*, control hidropónico luego de 24 h del traspaso a cultivo hidropónico, y la exposición de las plantas a 24 y 120 h de los tratamientos: salino (150 mM NaCl), a bajas temperaturas (4°C) e iones hierro (Fe⁺³) (500 µM FeCl₃). Como control de expresión se amplificó el gen

constitutivo 18S (F= 5' ATTCGGTCCTATTCTGTTGGC 3', R= 5'GCTTTCGCAGTTGTTTCGTCTTT'3) validado anteriormente en el laboratorio.

5. Determinación de prolina

El contenido de prolina fue determinado a partir de la metodología establecida por Bates et al. (1973), para lo cual, se utilizaron 250 mg de peso fresco de plantas completas de *C. quitensis*, según se explicó previamente. El tejido fue pulverizado en nitrógeno líquido, para luego agregar 4 mL de ácido sulfosalicílico al 3%. Posteriormente, el macerado fue filtrado en papel Whatman 1 (poros de 11 µm). Al filtrado se agregaron 2 mL de ácido acético glacial y 2 mL de reactivo ninhidrina. La mezcla, fue agitada por 15 segundos para luego ser incubada a 100°C por 1 hora. Luego, se detuvo la reacción con hielo por 10 min. Seguidamente, se adicionaron 4 mL de tolueno y se mezcló por 30 s. Finalmente, se extrajo el sobrenadante y se determinó su absorbancia a 520 nm.

Se construyó una curva de calibración con diferentes concentraciones de L-prolina (0; 2,4; 4,8; 7,2; 9,6; 12; 14,4; 16,8; 19,2; 21,6; 24 mg/L), la absorbancia obtenida en las muestras fue transformada a miligramos de prolina por gramos de tejido fresco (mg/gTF) mediante las fórmulas (Flores-Hernández et al. 2001).

$$X = \left[\frac{(y - a)}{B} * (fd) \right]$$

Dónde: X = Contenido de prolina (mg/g de peso fresco)
 a = Intercepto
 B = Pendiente
 y = Absorbancia a 520 nm
 fd = Factor de dilución

A su vez: $\text{Factor de dilucion} = \frac{\text{Vol. de ácido sulfosalicílico en L}}{\text{Peso fresco de la muestra en grs}}$

6. Análisis estadístico

Para testear el efecto de los tratamientos sobre la expresión génica y el contenido de prolina, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía mediante el software Statistica.v 10.0.0 (Enterprise), para evidenciar las diferencias significativas entre los diferentes tiempos de medición, y se utilizó la prueba de Duncan con un $p < 0,05$. La distribución normal de los

datos de la variable fue testeada mediante la prueba de Shapiro-Wilk. En algunos casos, fue necesaria la transformación de la variable mediante raíz cuadrada o coseno. Cuando los valores no presentaron una distribución normal, se utilizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. Se determinaron diferencias significativas mediante la prueba de t-student. Los resultados fueron graficados mediante el software SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc.).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Búsqueda e identificación de secuencias en transcriptoma de *C. quitensis*

1.1 Genes de respuesta a salinidad

Respecto a los genes relacionados con salinidad, se encontraron tres lecturas que codifican para un antiportador de cationes Na^+/H^+ NHX, entre los cuales se escogió uno con 92% de identidad con una zona de empalme de 139 aa (417 pb) con una secuencia anteriormente descrita para NHX en *Kalidium foliatum* (*Amaranthaceae*) (Tabla 2). Desde esta lectura se diseñaron partidores específicos para *nhx* de *C. quitensis*.

A su vez, para el cotransportador Na^+/K^+ (HKT) se encontraron tres lecturas, de las cuales sólo una tuvo una identidad superior al 87% (Tabla 2), la zona de empalme de esta secuencia con otra anteriormente descrita para *Citrus sinensis* (*Rutaceae*) alcanzó solo 39 aa (117 pb), desde esta zona no fue posible diseñar partidores debido a su corta longitud.

Para el antiportador de membrana Na^+/H^+ SOS1 se encontró una lectura que codifica para este transportador, con un 48% de identidad con una lectura descrita para *Beta vulgaris*, dado el bajo porcentaje de identidad se desestimó la posibilidad de diseñar partidores a partir de esta secuencia (Tabla 2).

En la búsqueda de secuencias para la proteína de respuesta a deshidratación RD22 no se encontraron lecturas con identidad superior al 80%. No obstante, una de las secuencias encontradas presentó una zona de empalme de 241 aa (723 pb) con una identidad del 68% con una secuencia que codifica para RD22 en *Beta vulgaris*, y se consideró el diseño de partidores utilizando esta secuencia excepcionalmente por su extensa longitud.

El diseño de partidores para delta-1-pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS) en *C. quitensis*, enzima clave en la síntesis de prolina, se encontraron tres secuencias descritas anteriormente en otras especies, de las cuales se seleccionó una con un 81% de identidad (Tabla 2) con una secuencia de *p5cs* descrita en *Theobroma cacao* (*Malvaceae*) con una zona de empalme de 160 aa (480 pb).

Tabla 2: Lecturas de genes relacionados con la salinidad. (**Seleccionadas y utilizadas para el diseño de partidores)

Gen	Lectura	Especie de referencia	ID secuencia de referencia	Identidad (%)	Empalme (aa)
nhx	TRINITY_DN27946_c0_g1_i18*	<i>Kalidium foliatum</i>	AAV73803.1	92**	139
	TRINITY_DN33550_c0_g1_i17	<i>Kalidium foliatum</i>	AAV73803.1	92	242
	TRINITY_DN35744_c3_g2_i8	<i>Sesuvium portulacastrum</i>	ASM90207.1	89	209
hkt1	TRINITY_DN32148_c1_g1_i1	<i>Carica papaya</i>	XP_021892734.1	57	89
	TRINITY_DN27625_c5_g3_i4	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006483548.1	87	39
	TRINITY_DN35263_c1_g2_i8	<i>Chenopodium quinoa</i>	XP_021774589.1	42	265
sos1	TRINITY_DN35712_c1_g1_i4	<i>Beta vulgaris</i>	XP_010680103.1	48	204
rd22	TRINITY_DN27973_c4_g1_i2	<i>Gossypium hirsutum</i>	XP_016728276.1	65	62
	TRINITY_DN34199_c0_g2_i1*	<i>Beta vulgaris</i>	XP_019102655.1	68**	241
	TRINITY_DN25625_c2_g1_i2	<i>Coffea eugenioides</i>	XP_027182726.1	60	78
p5cs	TRINITY_DN29941_c0_g2_i1*	<i>Theobroma cacao</i>	EOY07415.1	81**	160
	TRINITY_DN36617_c1_g2_i1	<i>Haloxylon ammodendron</i>	QNH91005.1	91	56
	TRINITY_DN36491_c0_g2_i1	<i>Salicornia bigelovii</i>	AGW51410.1	60	145

1.2 Genes de respuesta a bajas temperaturas

Se encontraron cuatro secuencias para el factor de transcripción CFB5 (Tabla 3). Estas lecturas presentaron identidades superiores o cercanas al 80% con secuencias de *cbf5* anteriormente descritas en hongos como *Aspergillus niger*, *A. lacticoffeatus* y *Trypanosoma gray*, entre otros. Al revisar la información de estas secuencias, se observó que codifican para una proteína de unión a centrómero/microtúbulo (centromere/microtubule-binding protein). Por lo que no se obtuvieron secuencias que codificaran para el factor de transcripción CBF5. Por esta razón, no se diseñaron partidores para este gen.

Se obtuvieron dos lecturas que codifican para sacarosa fosfato sintasa (SPS), una de ellas presentó un 79% de identidad con una zona de empalme de 1070 aa (3210 pb) (Tabla 3)

con una secuencia *SPS* descrita para *Chenopodium quinoa* (*Amaranthaceae*), desde esta lectura se diseñaron partidores, por su gran extensión y estar muy cercana al 80% de identidad.

Al realizar la búsqueda de secuencias para fenilalanina amino liasa (*PAL*), se encontró una secuencia con un 91% de identidad y una zona de empalme de 478 aa (1434 pb) con una secuencia anteriormente descrita para *Dianthus caryophyllus* (*Caryophyllaceae*), la cual fue utilizada para el diseño de partidores. Para el factor de transcripción *ICE1* se escogió una lectura que posee un 93% de identidad y con una zona de empalme de 198 aa (594 pb) con una secuencia *ice1* descrita para *B. vulgaris* (*Amaranthaceae*).

Tabla 3: Secuencias genes relacionados con bajas temperaturas. (**Seleccionadas y utilizadas para el diseño de partidores)

Gen	Lectura	Especie de referencia	ID secuencia de referencia	Identidad (%)	Empalme (aa)
<i>sps</i>	TRINITY_DN31776_c0_g1_i1*	<i>Chenopodium quinoa</i>	XP_021769370.1	79**	1070
	TRINITY_DN34634_c0_g1_i4	<i>Manihot esculenta</i>	ADD92152.1	78	162
<i>pal</i>	TRINITY_DN33655_c0_g1_i1*	<i>Dianthus caryophyllus</i>	BBD75318.1	91**	478
	TRINITY_DN35691_c1_g1_i7	<i>Stellaria littorea</i>	AAR19393.1	93	260
	TRINITY_DN26126_c0_g1_i3	<i>Stellaria longipes</i>	AAR19393.1	95	188
<i>ice1</i>	TRINITY_DN26181_c1_g1_i1*	<i>Beta vulgaris</i>	XP_010678348.1	93**	198
	TRINITY_DN29478_c4_g1_i4	<i>Spinacia oleracea</i>	XP_021844769.1	48	216

1.3 Genes de respuesta a iones metálicos (hierro)

Al realizar la búsqueda de secuencias que codifican para el transportador vacuolar de iones hierro (*VIT1*), se encontraron 11 secuencias. Sólo cinco de ellas presentaron identidades con otras plantas, se diseñaron partidores a partir de la lectura que presentó 84% de identidad y una zona de empalme de 145 aa (435 pb), con una secuencia *VIT1* anteriormente descrita para *Nicotiana sylvestris* (*Solanaceae*).

Sólo se encontró una lectura para el transportador de metales *NRAMP3*, la cual posee una identidad del 84% con *Spinacia oleracea* (*Amaranthaceae*) y una zona de empalme de 505 aa (1515 pb). Para Ferritina se encontraron seis lecturas que codifican para esta proteína acumuladora y transportadora de hierro, sin embargo, sólo dos presentaron identidades con plantas, la secuencia utilizada para el diseño de partidores presentó un 86% de identidad con un Ferritina 3 (*FER3*) del cloroplasto en *B. vulgaris* (*Amaranthaceae*) con una zona de empalme de 209 aa (627 pb) (Tabla 4).

Tabla 4: Secuencias genes relacionados con hierro. (*Seleccionadas para el diseño de partidores)

Gen	Lectura	Especie de referencia	ID secuencia de referencia	Identidad (%)	Empalme (aa)
<i>vit1</i>	TRINITY_DN27563_c0_g2_i1*	<i>Beta vulgaris</i>	XP_010686785.1	88**	145
	TRINITY_DN27763_c1_g1_i3	<i>Lupinus angustifolius</i>	XP_019420817.1	100	26
	TRINITY_DN31184_c1_g3_i4	<i>Beta vulgaris</i>	XP_010680575.1	74	123
	TRINITY_DN18327_c0_g1_i1	<i>Brassica oleracea</i>	XP_013584686.1	67	200
	TRINITY_DN22696_c0_g1_i1	<i>Cephalotus follicularis</i>	GAV81148.1	59	101
<i>nramp3</i>	TRINITY_DN27229_c0_g1_i1*	<i>Chenopodium quinoa</i>	XP_021714395.1	81**	505
<i>fer3</i>	TRINITY_DN35724_c0_g2_i1*	<i>Beta vulgaris</i>	XP_010692937.1	86**	209
	TRINITY_DN28751_c3_g2_i6	<i>Beta vulgaris</i>	XP_010676813.1	69	68

2. Validación de partidores

Una vez seleccionadas las lecturas desde el transcriptoma de *C. quitensis*, se procedió al diseño de partidores utilizando la plataforma online Primer3Plus. Durante la etapa de diseño de partidores se seleccionaron uno o dos pares de partidores para ser sintetizados y validados.

6.1 Genes de respuesta a salinidad.

Los partidores diseñados a partir del transcriptoma de *C. quitensis* que amplifican secuencias de genes relacionados con la respuesta a salinidad se encuentran en la tabla 5. En este caso se sintetizaron dos pares de partidores para cada gen, los cuales fueron

validados mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR) utilizando como plantilla de amplificación ADN codificante, obtenido a través de la transcripción reversa del ARN total y ADN genómico.

Tabla 5: Partidores diseñados para genes relacionados con salinidad.

Gen	Primer	Secuencia 5' → 3'	T. melting (°C)	Producto (pb)
<i>nhx</i>	F_NHX1_1	TGTTGGTATGGATGCGTTAGAT	55	103
	R_NHX1_1	AACCATGAGTAGACCCAGCAAT	56.8	103
	F_NHX1_2	TTGGCATAATGTGACTGAGAGC	60.3	112
	R_NHX1_2	ATCTAACGCATCCATACCAACA	59.4	112
<i>p5cs</i>	F_P5CS_1	GAAACCCATAAGTGAGCGTCTTTG	58.3	86
	R_P5CS_1	GGCAAGGCGACCGACAAC	58.2	86
	F_P5CS_2	AAGAGCCTGAAGTCTCCTAGAGC	59.8	100
	R_P5CS_2	GTTCCACAAAGACGCTCACTTAT	59.7	100
<i>rd22</i>	F_RD22_1	AGGTTGCACAATACTTGTCTTCG	60.6	146
	R_RD22_1	CATTACCCTTCACATCGAACAA	59.9	146
	F_RD22_2	GCAATCGTTTACGGTTTCTTTC	54.4	172
	R_RD22_2	CCAATTAACCACGCAATTCACC	56.3	172

- *nhx*

Se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado para el par de partidores NHX_1 en ADNc el cual mide 103 pb (Tabla 5, Fig. 2). Este mismo par de partidores presentó un producto de aproximadamente 200 pb (Fig.2), lo que indica que este par de partidores abarca un intrón en el ADNg (Álvarez-Fernández 2013). Por otra parte, en el par de partidores NHX_2 se obtuvieron bandas inespecíficas en la reacción con ADNc y ADNg. Se seleccionó el par de partidores NHX_1 para etapas posteriores del análisis, debido a que no presentó bandas inespecíficas y además abarca un intrón, lo que permite detectar la contaminación de ADNg en muestras de ADNc.

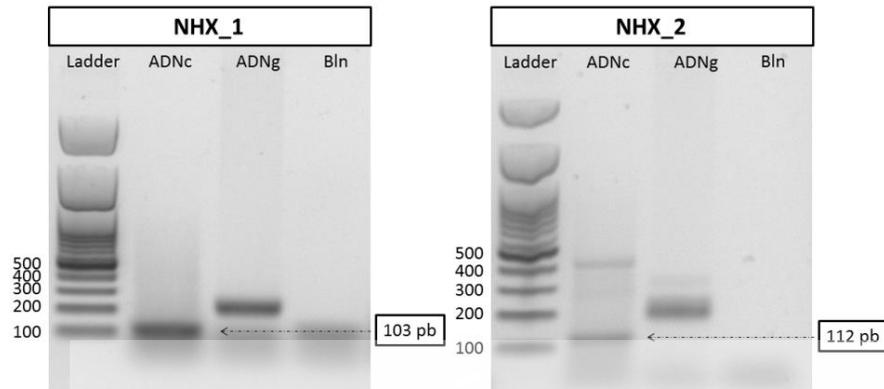


Fig. 2: Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR obtenidos a partir de partidores específicos para gen *nhx* de *Colobanthus quitensis*. Ladder: marcador de peso 100pb, ADNc: ADN complementario, ADNg: ADN genómico, Bln: blanco.

- *p5cs*

Los partidores diseñados para *p5cs* presentaron productos de PCR del tamaño esperado en ambos pares de partidores P5CS_1 (86 pb) y P5CS_2 (100 pb) (Tabla 5, Fig. 3). Se observó el mismo tamaño del producto de PCR en ADNc y ADNg en ambos pares de partidores, lo que implica que estos partidores no abarcan intrones. Se decidió arbitrariamente por el par de partidores P5CS_2 para análisis posteriores, debido a que no hay diferencias entre ambos pares de partidores.

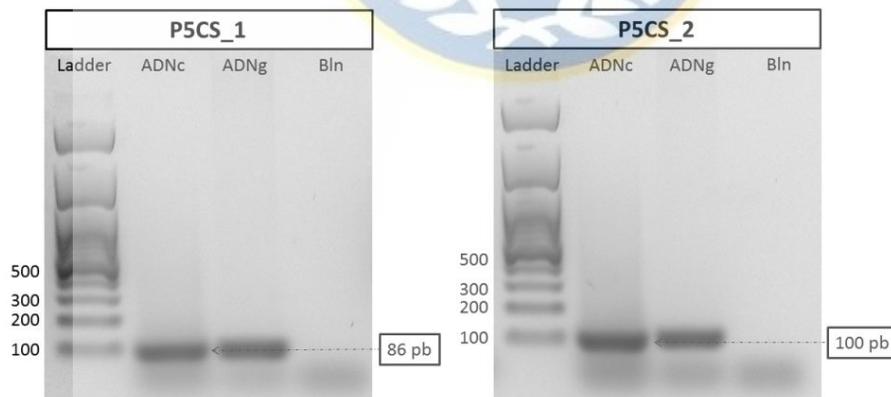


Fig. 3: Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR obtenidos a partir de partidores específicos para gen *p5cs* de *Colobanthus quitensis*. Ladder: marcador de peso 100pb, ADNc: ADN complementario, ADNg: ADN genómico, Bln: blanco.

- *rd22*

Se obtuvo el producto de PCR del tamaño esperado para ambos pares de partidores RD22_1 (146 pb) y RD22_2 (172 pb) (Tabla 5, Fig. 4). En RD22_1 no se observó producto de PCR en ADNg (Fig. 4), situación favorable al análisis de PCR transcripción reversa, debido a que el ADNg no amplifica, por lo que no contamina la reacción con ADNc, esto puede ocurrir porque este par de partidores abarca un intrón demasiado grande para la capacidad de amplificación de la polimerasa o porque el intrón interfiere en la zona de empalme del partidor (Álvarez-Fernández 2013). Para el par de partidores RD22_2, se observó el mismo tamaño del producto de PCR en ADNc y ADNg.

Se seleccionó el par de partidores RD22_1 para las etapas posteriores del análisis, debido a que no amplifica en ADNg.

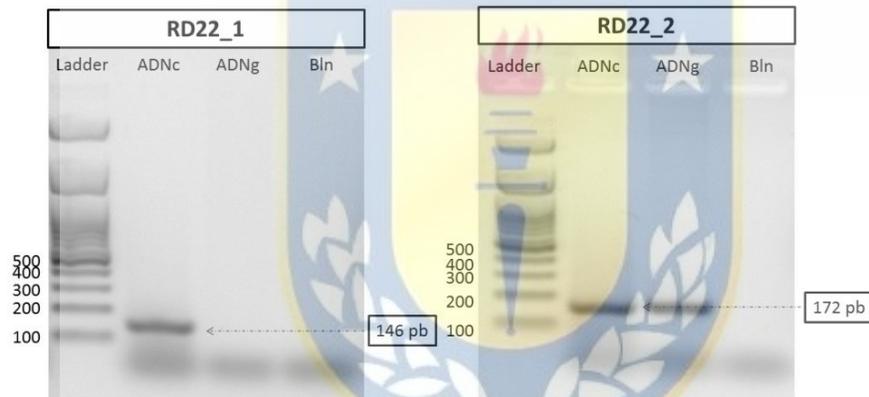


Fig. 4: Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR obtenidos a partir de partidores específicos para gen *rd22* de *Colobanthus quitensis*. Ladder: marcador de peso 100pb, ADNc: ADN complementario, ADNg: ADN genómico, Bln: blanco.

2.2 Genes de respuesta a bajas temperaturas.

Los partidores diseñados para amplificar secuencias de genes relacionados con la respuesta a bajas temperaturas (Tabla 6), presentaron temperaturas melting cercanas a los 60°C y sus productos tienen tamaños entre los 107 y 150 pb. Los partidores fueron validados mediante PCR.

Tabla 6: Partidores diseñados para amplificar secuencias de genes relacionados con bajas temperaturas.

Gen	Primer	Secuencia 5' →3'	T. melting (°C)	Producto (pb)
<i>ice1</i>	F_ICE1_1	CTACTCTTCCGAATTTGCCATC	60.1	107
	R_ICE1_1	TCCTTCCCTCAACCTTACTTCA	60.1	107
	F_ICE1_2	GAACTGGAATCATCTCCTCCTG	60.1	136
	R_ICE1_2	GACCATTTGGGCTAGGTAATGA	60.2	136
<i>sps</i>	F_SPS_1	AACTTGAGGTTGCCAGAATCAT	60.0	137
	R_SPS_1	GGAAAGTCTGAAGGATCAAACG	60.1	137
	F_SPS_2	TGTTTGTGGTGCTTAGGATACG	60.1	129
	R_SPS_2	GATAATGGGAAACCGTGATGAT	59.9	129
<i>pal</i>	F_PAL	CTCTCGCTCAATTGACTTTGTG	60.1	150
	R_PAL	AGTTCGTATATGAAGGCGGCTA	60.1	150

- *ice1*

Para el par de partidores ICE1_1 se obtuvo el producto de PCR esperado de 107 pb en ADNc (Tabla 6, Fig. 5), mientras que, para ADNg presentó un producto de mayor tamaño, de aproximadamente 300 pb. Este par de partidores abarca un intrón en el ADNg (Álvarez-Fernández 2013), lo que permite evidenciar contaminación de ADNg en ADNc durante el análisis de RT-PCR. Para el segundo par de partidores ICE1_2 se obtuvo el producto de PCR del tamaño esperado 136 pb en el ADNc, el cual fue del mismo tamaño en ADNg (Tabla 6, Fig. 5). Se seleccionó el par de partidores ICE_1 para etapas posteriores del análisis.

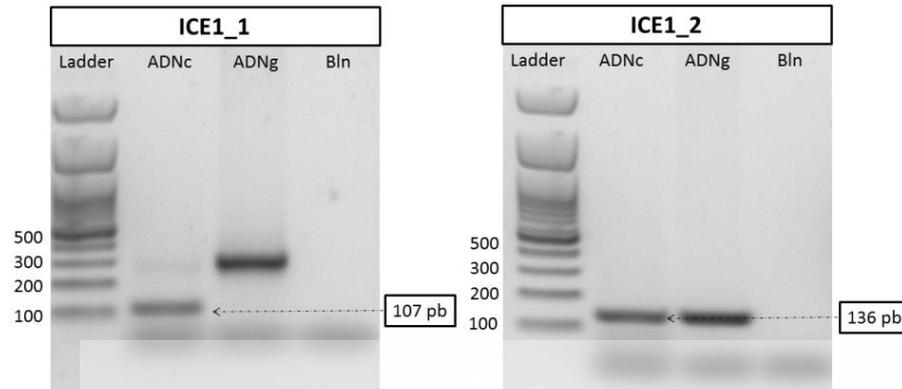


Fig. 5: Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR obtenidos a partir de partidores específicos para gen *ice1* de *Colobanthus quitensis*. Ladder: marcador de peso 100pb, ADNc: ADN complementario, ADNg: ADN genómico, Bln: blanco.

- *sps*

Se obtuvo el producto de PCR del tamaño esperado para ambos pares de partidores SPS_1 (137 pb) y SPS_2 (129 pb) (Tabla 6, Fig. 6), se observó el mismo tamaño del producto de PCR en ADNc y ADNg en ambos casos. Se seleccionó arbitrariamente el par de partidores SPS_2 para análisis posteriores.

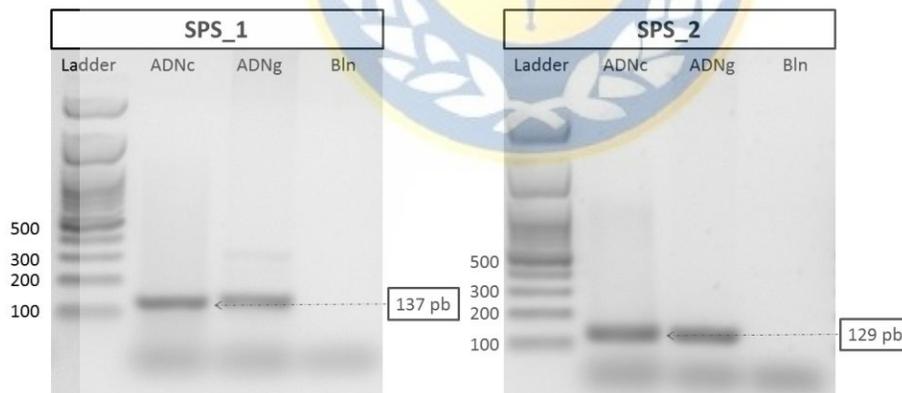


Fig. 6: Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR obtenidos a partir de partidores específicos para gen *sps* de *Colobanthus quitensis*. Ladder: marcador de peso 100pb, ADNc: ADN complementario, ADNg: ADN genómico, Bln: blanco.

- *pal*

Se obtuvo el producto de PCR del tamaño esperado para el par de partidores PAL, el que fue de 150 pb en el ADNc (Tabla 6, Fig. 7). Éstos presentaron un producto de mayor tamaño

en el ADNg de aproximadamente 250 pb (Fig. 7). Por lo tanto, este par de partidores abarca un intrón en el ADNg (Álvarez-Fernández 2013). Al obtener un resultado exitoso en el tamaño esperado del producto de PCR en el ADNc se utilizó este par de partidores para análisis posteriores.

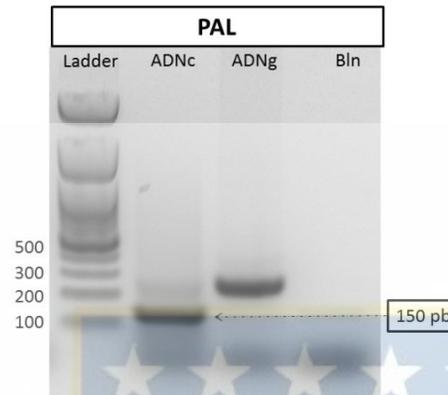


Fig. 7: Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR obtenidos a partir de partidores específicos para gen *pal* de *Colobanthus quitensis*. Ladder: marcador de peso 100pb, ADNc: ADN complementario, ADNg: ADN genómico, Bln: blanco.

2.3 Genes de respuesta a iones metálicos (hierro)

Los partidores diseñados para amplificar secuencias de genes relacionados con la respuesta a iones metálicos (hierro) (Tabla 7), presentaron temperaturas melting cercanas a los 60°C, y sus productos tienen tamaños entre los 102 y 142 pb. De los partidores diseñados, solo se sintetizó un par de partidores para los genes *vit1* y *fer3*, mientras que para *nramp3* se sintetizaron dos pares de partidores.

Tabla 7: Partidores diseñados para genes relacionados con hierro.

Gen	Primer	Secuencia 5' → 3'	T. melting (°C)	Producto
<i>vit1</i>	F_VIT1	AGAAGCAACAGCTCCGATTAAG	60.0	129
	R_VIT1	GCAGTCTTAGCATCAGTCGTTG	60.1	
<i>nramp3</i>	F_NRAMP3_1	TTTATAGCAACAATGGCCCTCT	60.0	142
	R_NRAMP3_1	TTATGCAACCCACAACACCTAC	59.8	
	F_NRAMP3_2	TGGTGTTAGGAACTTGAAGCA	59.8	102
	R_NRAMP3_2	AGCTCTGAACCACTAGGCTTTG	60.1	
<i>fer3</i>	F_FER3	CAACAAATTCTTGCAAGTTGGAC	59.7	138
	R_FER3	TTGATCATGCTGAGAAAGGAGA	60.0	

- *vit1*

Se obtuvo el producto de PCR del tamaño esperado para el par de partidores VIT1 en ADNc de 129 pb (Tabla 7, Fig. 8), el mismo tamaño de producto se observó utilizando ADNg como plantilla. Se utilizó este par de partidores para análisis posteriores, dado que presentó el producto esperado y no se observan amplificaciones inespecíficas.

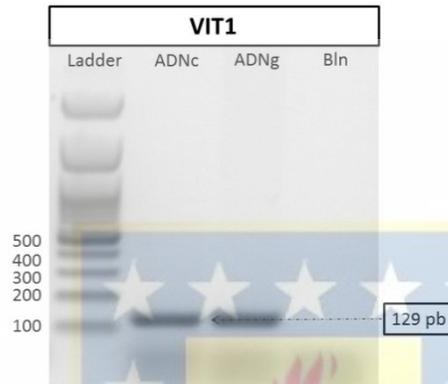


Fig. 8: Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR obtenidos a partir de partidores específicos para gen *vit1* de *Colobanthus quitensis*. Ladder: marcador de peso 100pb, ADNc: ADN complementario, ADNg: ADN genómico, Bln: blanco.

- *nramp3*

Se obtuvo el producto de PCR del tamaño esperado para el par de partidores NRAMP3_1 en ADNc, el cual tiene un tamaño de 139 pb (Tabla 7, Fig. 9), no se observó producto de PCR en ADNg, ésto puede ocurrir porque este par de partidores abarca un intrón demasiado grande para la capacidad de amplificación de la polimerasa o porque el intrón interfiere en la zona de empalme del partidador (Álvarez-Fernández 2013).

Por otra parte, no se observó producto de PCR en ADNc y ADNg para el par de partidores NRAMP3_2. Se seleccionó el par de partidores NRAMP3_1 para las etapas posteriores del análisis.

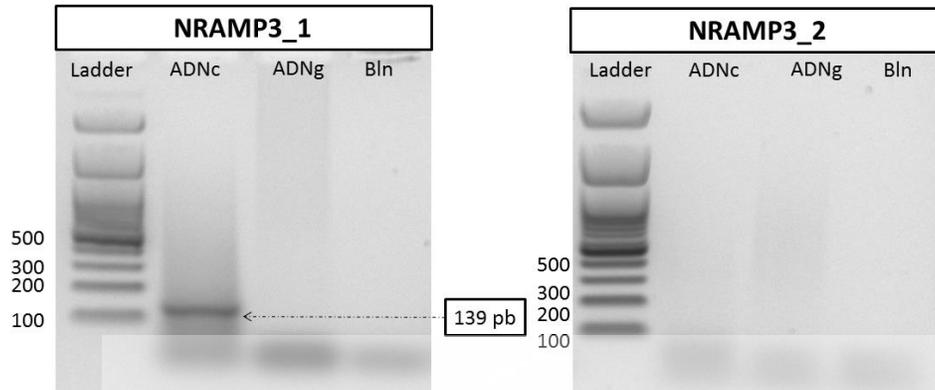


Fig. 9: Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR obtenidos a partir de partidores específicos para gen *nramp3* de *Colobanthus quitensis*. Ladder: marcador de peso 100pb, ADNc: ADN complementario, ADNg: ADN genómico, Bln: blanco.

- *fer3*

Se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado para el par de partidores para *fer3* en ADNc, el que tiene un tamaño de 139 pb (Tabla 7, Fig. 10). Este par de partidores presentó un producto de PCR de mayor tamaño en ADNg de aproximadamente 700 pb. Este par de partidores abarca un intrón que no sobrepasa la capacidad de amplificación de la polimerasa (Álvarez-Fernández 2013). Se utilizó este par de partidores para etapas posteriores del análisis.

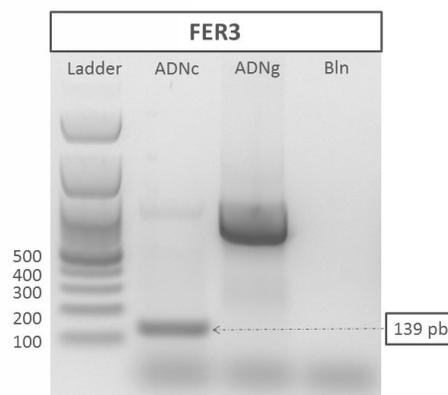


Fig. 10: Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR obtenidos a partir de partidores específicos para gen *fer3* de *Colobanthus quitensis*. Ladder: marcador de peso 100pb, ADNc: ADN complementario, ADNg: ADN genómico, Bln: blanco.

Mediante la prueba de validación de partidores se observó que, algunos pares de partidores no amplifican en ADNg, mientras que otros presentan el mismo tamaño de producto en ADNc y ADNg. Además, otros que presentaron productos de PCR de tamaños diferente entre ADNc y ADNg, permitiendo evidenciar trazas de ADNg en muestras de ADNc. Por lo tanto, se realizó un tratamiento con ADNasa previo a la transcripción reversa en etapas posteriores, como se describió en el apartado “materiales y métodos”.

3. Análisis semi-cuantitativo de la expresión génica

3.1 Genes de respuesta a salinidad

- *nhx*

Los datos obtenidos mediante el análisis de la acumulación de transcritos del gen *nhx* mostraron que la expresión de este gen disminuyó cuando fue traspasado desde el cultivo *in vitro* al cultivo hidropónico, esta tendencia a la disminución se mantuvo incluso hasta después de 24 hrs de tratamiento salino, con diferencias significativas respecto al *C. in vitro* (Fig. 11). Posteriormente, la transcripción del antiportador de iones sodio aumentó a las 120 hrs de tratamiento, sin superar los niveles observados en las plantas *C. in vitro*, *C. hidropónico* y sin diferencias significativas con las muestras tomadas a las 24 hrs de exposición a salinidad.

El antiportador NHX tiene la función de reducir la concentración de Na⁺ en el citosol bombeando iones sodio hacia la vacuola, este gen es parte de una familia de antiportadores que desempeñan un rol importante en la homeostasis iónica en plantas (Hoire et al. 2010). El aumento de la expresión de *nhx* se ha reportado en plantas como *Aeluropus littoralis*, donde se evaluaron los niveles de expresión de este transportador en tratamientos con concentraciones de 150 y 300 mM NaCl obteniendo un aumento de 2 veces en este último, luego de 48 hrs de tratamiento (Moshaei et al. 2014). Mientras que en *Kochia scoparia* al utilizar tratamientos de 200 y 400 mM de NaCl, se provocó el incremento de la expresión del gen en 1.8 y 2.7 veces, respectivamente (Fahmideh y Fooladvand 2018). En *Chenopodium quinoa*, mediante la evaluación de una cinética de expresión génica en respuesta a 300 mM de NaCl, se detectó el máximo de expresión de *nhx* a las 24 hrs de exposición al tratamiento (Ruiz et al. 2017).

A pesar de que en *C. quitensis* se han observado respuestas morfofisiológicas luego de 21 días de tratamiento salino (150 mM de NaCl) (Klagges 2015, Arriagada 2017), mediante la concentración de NaCl aplicada y tiempo de análisis en este estudio no se observó un aumento significativo en la expresión de *nhx*.

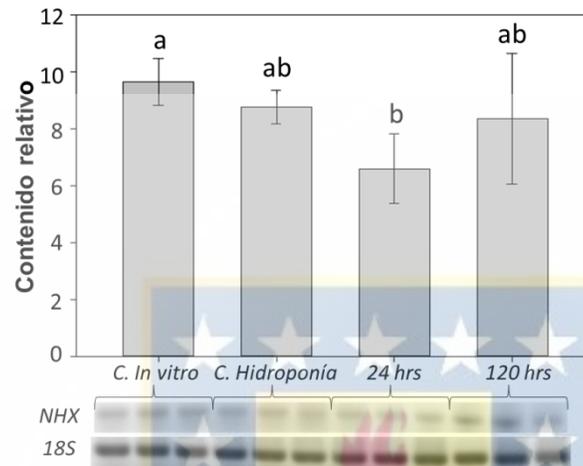


Fig. 11: Acumulación de transcritos *nhx* en plantas de *Colobanthus quitensis*. Control *in vitro*, Control Hidroponía, 24 hrs y 120 hrs de tratamiento salino a 150 mM NaCl. 18s control de expresión. Columnas indican el promedio (n=3); barras de error estándar. Letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas evaluado con el test de Duncan ($p < 0.05$). Electroforesis en agarosa 1%.

- *p5cs*

El gen *p5cs* mostró niveles de expresión similares en el *C. in vitro*, *C. hidropónico* y a las 24 hrs de exposición al tratamiento. A las 120 hrs de tratamiento, la acumulación de transcrito aumentó significativamente respecto a las muestras control y las evaluadas a las 24 hrs de tratamiento (Fig. 12).

El gen *p5cs* codifica para una enzima clave en la síntesis de prolina, un osmolito compatible que se acumula en situaciones de estrés hídrico (Amini *et al.* 2015). Al someter a tratamiento salino plantas de *C. quitensis* procedentes de diferentes poblaciones, entre ellas Arctowski, se ha observado la acumulación de prolina (Klagges 2015). Klagges (2015) observó un aumento significativo del contenido de prolina en los tejidos de *C. quitensis* luego de 7 días de tratamientos de 50 y 150 mM de NaCl, el cual se mantuvo hasta los 21 días de tratamiento.

La acumulación de prolina también se ha observado en plántulas de *Solanum tuberosum* bajo tratamiento salino (50-150 mM), y junto al aumento de este osmolito en los tejidos, se observó un aumento en la actividad de la enzima P5CS (Rahnama y Ebrahimzadeh 2004). El aumento de la acumulación de prolina se ha descrito en *A. thaliana* luego de 7 días de tratamiento con 50 mM de NaCl, la que fue mayor en individuos hipersensibles a salinidad (*Atsos1*) respecto al tipo silvestre. La transcripción de *p5cs* fue mayor en individuos *Atsos1* bajo tratamientos que van desde los 50 hasta los 200 mM luego de 12 hrs de tratamiento (Liu y Zhu 1997). Un aumento en la transcripción de *p5cs* frente a un exceso de salinidad se ha reportado en *Opuntia streptacantha*, el que fue inducido a los 9 y 11 días de tratamiento salino (75 y 150 mM NaCl) junto con un aumento del contenido de prolina en sus tejidos (Silva-Ortega *et al.* 2008).

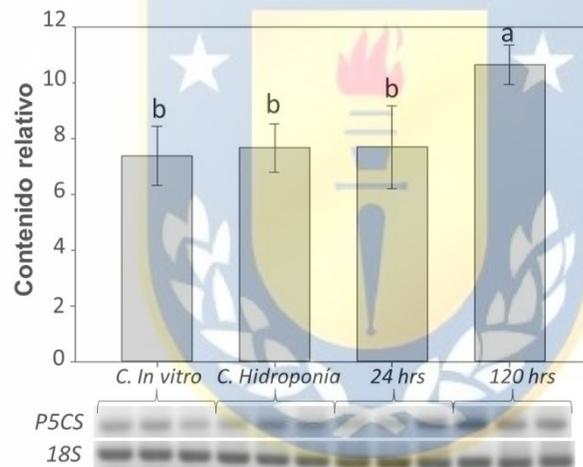


Fig. 12: Acumulación de transcritos *p5cs* en plantas de *Colobanthus quitensis*. Control *in vitro*, Control Hidroponía, 24 hrs y 120 hrs de tratamiento salino a 150 mM NaCl. 18s control de expresión. Columnas indican el promedio (n=3); barras de error estándar. Letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas evaluado con el test de Duncan ($p < 0.05$). Electroforesis en agarosa 1%.

- rd22

Los datos obtenidos mediante el análisis de expresión de *rd22* mostraron que este gen mantuvo estable su transcripción cuando las plantas fueron traspasadas desde el cultivo *in vitro* al cultivo hidropónico. Se observó una tendencia a la disminución en la acumulación de transcritos luego de 24 hrs del tratamiento (150 mM. NaCl). A las 120 hrs de exposición

al tratamiento, se observó un aumento en el contenido relativo de transcritos de *rd22* superando levemente el contenido relativo observado en las plantas control, y con diferencias significativas respecto al contenido relativo de ARNm observados después de 24 hrs de tratamiento salino (Fig. 13). En *Glycine max* se describió la inducción de la expresión de *rd22* frente a salinidad, donde el mayor nivel de acumulación de ARNm se detectó luego de 6 días de tratamiento con 125 mM de NaCl (Wang et al. 2012).

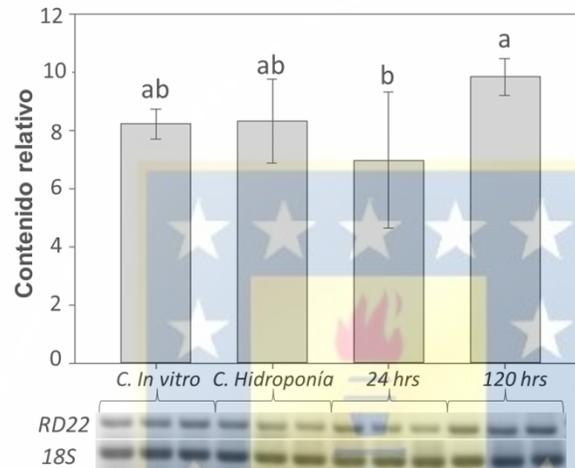


Fig. 13: Acumulación de transcritos *rd22* en plantas de *Colobanthus quitensis*. Control *in vitro*, Control Hidroponía, 24 hrs y 120 hrs de tratamiento salino a 150 mM NaCl. 18s control de expresión. Columnas indican el promedio (n=3); barras de error estándar. Letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas evaluado con el test de Duncan ($p < 0.05$). Electroforesis en agarosa 1%.

3.2 Genes de respuesta a bajas temperaturas

- *ice1*

En el análisis de expresión génica de *ice1* no se encontraron diferencias en la acumulación relativa de expresión en ninguno de los momentos del tratamiento evaluados, tampoco se pudo identificar una tendencia en la expresión de este gen (Fig. 14). Por el contrario, en un estudio realizado en plantas de *Pyrus ussuriensis* por Huang et al. (2015) se evaluó la inducción de la expresión de *ICE1* frente a bajas temperaturas, donde se observaron dos peak de expresión, uno a las 24 hrs y otro a las 72 hrs de tratamiento, este último peak fue el punto máximo de acumulación de ARNm para este gen.

Por su parte, *ice1* en *A. thaliana* es capaz de inducir genes de respuesta a bajas temperaturas desde la primera hora de tratamiento de baja temperatura y se mantiene hasta las 48 hrs (Chinnusamy et al. 2003). Lo que indica que el aumento o inhibición de la transcripción de *ice1* podría ocurrir en los primeros minutos de la exposición al tratamiento, en *C. quitensis* el mayor promedio de expresión se observó a las 24 hrs de tratamiento, no ostante, no hubo diferencias significativas con ningún otro tiempo evaluado.

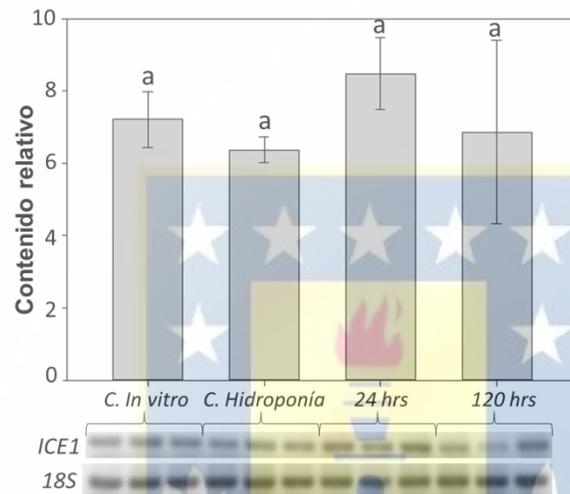


Fig. 14: Acumulación de transcritos *ice1* en plantas de *Colobanthus quitensis*. Control *in vitro*, Control Hidroponía, 24 hrs y 120 hrs de tratamiento a 4°C. 18s control de expresión. Columnas indican el promedio (n=3); barras de error estándar. Letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas evaluado con el test de Duncan ($p < 0.05$). Electroforesis en agarosa 1%.

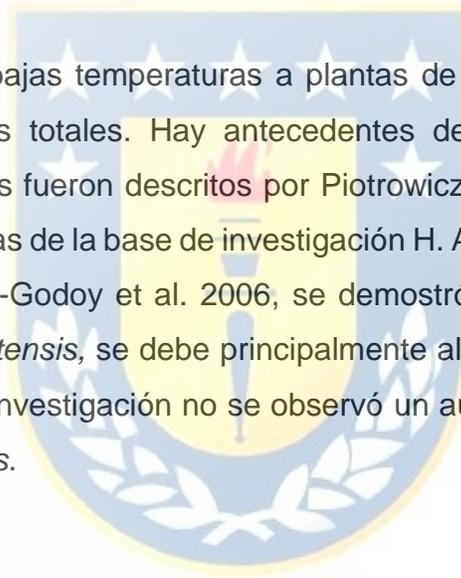
- *sps*

Para *sps* se observó una disminución significativa en el contenido relativo de transcrito cuando las plantas fueron aclimatadas al cultivo hidropónico. La expresión de este gen aumentó con diferencias significativas a las 24 hrs de tratamiento a bajas temperaturas, para luego volver a disminuir a las 120 hrs de exposición al tratamiento (Fig. 15).

Distintas investigaciones describen la acumulación de osmolitos en *C. quitensis* frente a bajas temperaturas. La sacarosa es el carbohidrato soluble más abundante en los tejidos de *C. quitensis* recolectados en cercanías de la estación Polaca H. Arctowski (Piotrowicz-Cieślak et al. 2005) y se acumula cuando la planta es expuesta a bajas temperaturas (4°C)

(Bascuñán-Godoy et al. 2006). Este compuesto puede desempeñar un papel esencial en la osmorregulación y la crioprotección en muchos tejidos vegetales, principalmente en situaciones de bajas temperaturas y/o déficit hídrico (Huber y Huber 1996). En Bascuñán-Godoy et al. (2006), se caracterizó la respuesta de sacarosa fosfato sintasa (SPS) en *C. quitensis* frente a la aclimatación a bajas temperaturas, se observó un aumento del 100% en la actividad de esta enzima, cuadruplicando la concentración de sacarosa en los tejidos. Sin embargo, la síntesis de la enzima SPS sólo fue incrementada en un 18% luego de 7 días de tratamiento. En los resultados obtenidos durante esta investigación, sólo se observó transcripción de *SPS* durante el cultivo *in vitro* y a las 24 hrs de tratamiento a bajas temperaturas.

En Arriagada (2017), al aplicar bajas temperaturas a plantas de *C. quitensis* se observó mayor acumulación de azúcares totales. Hay antecedentes de que clavelito antártico acumula diversos azúcares, éstos fueron descritos por Piotrowicz-Cieślak et al. (2005) en plantas colectadas en las cercanías de la base de investigación H. Arctowski, Isla Rey Jorge, Shetlands del Sur. En Bascuñán-Godoy et al. 2006, se demostró que la acumulación de sacarosa en los tejidos de *C. quitensis*, se debe principalmente al aumento de la actividad enzimática. Durante la presente investigación no se observó un aumento prolongado en la acumulación de transcritos de *sps*.



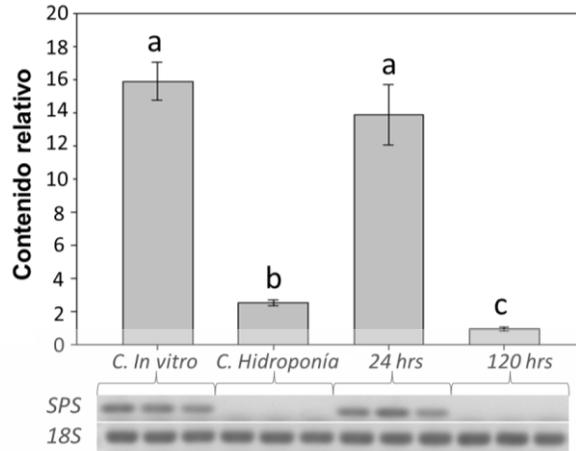


Fig. 15: Acumulación de transcritos *sps* en plantas de *Colobanthus quitensis*. Control *in vitro*, Control Hidroponía, 24 hrs y 120 hrs de tratamiento a 4°C. 18s control de expresión. Columnas indican el promedio (n=3); barras de error estándar. Letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas evaluado con el test de Duncan ($p < 0.05$). Electroforesis en agarosa 1%.

- *pal*

Los resultados obtenidos para la expresión de *PAL* mostraron un aumento leve en el contenido relativo de transcritos cuando las plantas fueron traspasadas al cultivo hidropónico, esto puede tener explicación, ya que, durante el cultivo *in vitro*, la temperatura en la cámara de crecimiento era de 20°C y durante la aclimatación fue de 13°C, por lo que se activó la transcripción de este gen. Posteriormente, con la aplicación del tratamiento de baja temperatura se observó el aumento de la expresión de *PAL* a las 24 y 120 hrs, ambos con diferencias significativas respecto al control *in vitro*, pero no respecto al control hidropónico. (Fig. 16).

Las antocianinas, se acumulan en los tejidos de las plantas en respuesta a la baja temperatura y los cambios en la intensidad de la luz, éstos se sintetizan a través de la vía fenilpropanoides, que está controlada por enzimas que incluyen la fenilalanina amoniaco liasa (*PAL*) y la chalcona sintasa (*CHS*) (Leyva et al. 1995).

Durante este estudio se demostró la acumulación de ARNm de *PAL* en plantas de *C. quitensis* cuando las plantas fueron traspasadas al cultivo hidropónico y al ser expuestas a bajas temperaturas (4°C). En estudios realizados anteriormente se ha informado el aumento

de transcritos de *PAL*, en plantas *A. thaliana*, donde la mayor acumulación de transcritos se observó al segundo y cuarto día de exposición a 4°C, con una disminución de la transcripción a los 7 días de tratamiento (Leyva et al. 1995). La actividad de *PAL* también puede ser inducida en plantas de *Solanum lycopersicum* con tratamientos térmicos de altas temperaturas (35°C) (Rivero et al. 2002), por lo tanto en *C. quitensis* también se podría evaluar la respuesta de este gen al aumento de temperatura.

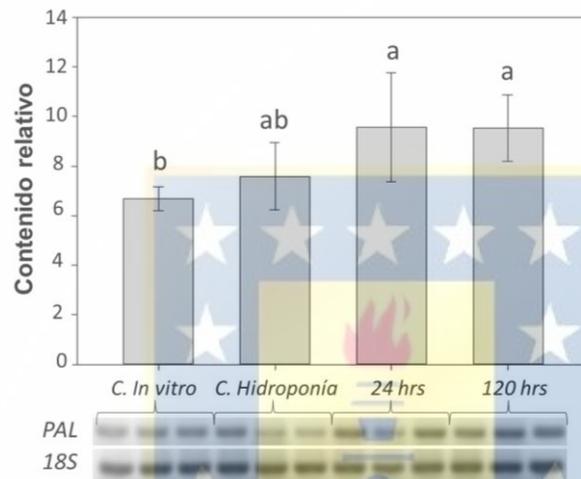


Fig. 16: Acumulación de transcritos *pal* en plantas de *Colobanthus quitensis*. Control *in vitro*, Control Hidroponía, 24 hrs y 120 hrs de tratamiento a 4°C. 18s control de expresión. Columnas indican el promedio (n=3); barras de error estándar. Letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas evaluado con el test de Duncan ($p < 0.05$). Electroforesis en agarosa 1%.

3.3 Genes de respuesta a iones metálicos hierro

- *vit1*

Para el gen *vit1* se observó en primer lugar, una disminución de la expresión relativa del gen cuando las plantas fueron aclimatadas al cultivo hidropónico, posteriormente se observó un aumento en la transcripción cuando las plantas fueron expuestas a iones hierro, luego de 120 hrs de tratamiento se observaron diferencias significativas respecto a las plantas del control testeado luego de la aclimatación al cultivo hidropónico (Fig. 17).

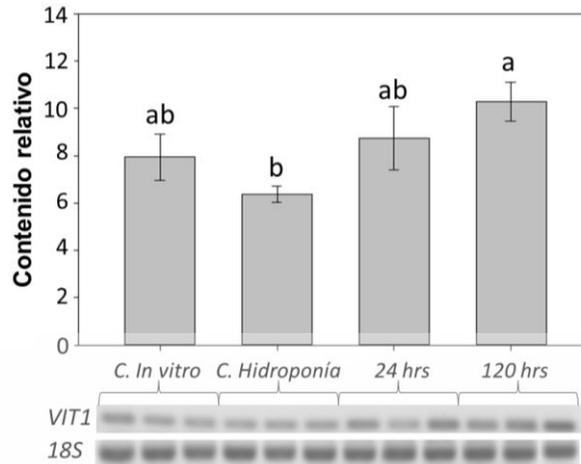


Fig. 17: Acumulación de transcritos *vit1* en plantas de *Colobanthus quitensis*. Control *in vitro*, Control Hidroponía, 24 hrs y 120 hrs de tratamiento de iones hierro (III) 500 μ M de $FeCl_3$. 18s control de expresión. Columnas indican el promedio (n=3); barras de error estándar. Letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas evaluado con el test de Duncan ($p < 0.05$). Electroforesis en agarosa 1%.

El secuestro vacuolar de hierro es una estrategia utilizada por las plantas en situaciones de exceso de hierro, los transportadores VIT desempeñan un papel importante en este proceso (Slavic et al. 2016). En ambientes con alto contenido de hierro estos transportadores pueden mantener las concentraciones de hierro en el citosol dentro de un rango fisiológico que permite el crecimiento celular (Zhang et al. 2012; Narayanan et al. 2015). En *A. thaliana*, *AtVIT1* es uno de los principales transportadores que permite la compartimentación de hierro en vacuolas, cuando existe un exceso de hierro (Kim et al. 2006).

Por otra parte, se ha demostrado que los ortólogos de *AtVIT1*, *OsVIT1* y *OsVIT2* en arroz (*Oryza sativa*) modulan la translocación de hierro, esto fue evaluado en plantas cultivadas en hidroponía con un tratamiento 4,5 mM de $FeSO_4$, donde se indujo la expresión de *OsVIT2* en raíces de plántulas de arroz, con un aumento sustancial a las 3 hrs de tratamiento, el que se mantuvo hasta las 24 hrs y en brotes a las 24 hrs de tratamiento, mientras que la expresión de *OsVIT1* se indujo en condiciones de deficiencia de hierro tanto en raíces como brotes (Zhang et al. 2012). Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran un aumento significativo después de 5 días (120 hrs) de tratamiento con 500 μ M de $FeCl_3$. El retraso en el aumento de la expresión de *vit1* respecto al ortólogo *OsVIT2* informado en

Zhang et al. (2012) puede tener origen en la concentración de hierro aplicada en plantas de arroz fue nueve veces mayor que la utilizada en *C. quitensis*.

- *nramp3*

El contenido relativo del ARNm de *nramp3*, mostró estabilidad entre el traspaso del cultivo *in vitro* al cultivo hidropónico, lo que se mantuvo luego de 24 hrs de tratamiento. Posteriormente, se observó un aumento no significativo a las 120 hrs de tratamiento (Fig. 18).

Las plantas necesitan transportadores de iones metálicos para cumplir con funciones esenciales, las que van desde la absorción, secuestro y almacenamiento de metales en sus tejidos (Guerinot 2001). Se ha demostrado que los genes *nramp* en plantas, son capaces de complementar los mutantes de levadura deficientes en la absorción de varios metales (Curie et al. 2000; Thomine et al. 2000). La caracterización de NRAMP3 se ha enfocado en su localización y función, y no en su patrón de expresión, dentro de las indagaciones sobre este transportador, se puede encontrar que es un transportador que responde a la presencia de hierro, y se expresa fuertemente en raíces (Thomine et al. 2000). Los transportadores NRAMP3 y NRAMP4, entre otras funciones, cumplen con la exportación del hierro desde la vacuola durante la germinación de las semillas, un mutante de *A. thaliana* deficiente de los transportadores NRAMP3 y NRAMP4 no puede movilizar las reservas de hierro impidiendo su germinación (Bastow et al. 2018). A su vez, *AtNramp3* se expresa en los haces vasculares de raíces, tallos y hojas en condiciones de suficiente hierro, lo que sugiere una función en el transporte de metales a larga distancia dentro de la plantas (Thomine et al. 2003). Por lo tanto, los transportadores NRAMP juegan un papel importante en el transporte de metales, durante el exceso y deficiencia de hierro.

En *C. quitensis* se observa un aumento de la expresión de *nramp3* luego de 120 hrs de exposición a hierro, este aumento podría ser más evidente si se utilizara una mayor concentración de hierro en el tratamiento, como las utilizadas en Zhang et al. (2012), lo que podría activar la expresión del transportador, otro aspecto que se puede evaluar en clavelito antártico es la función de NRAMP3 durante la deficiencia de hierro.

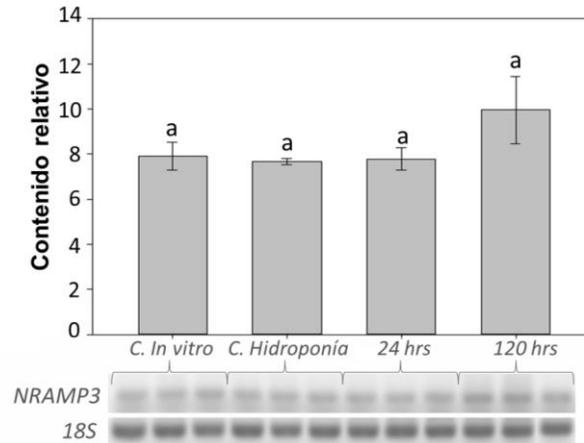


Fig. 18: Acumulación de transcritos *vit1* en plantas de *Colobanthus quitensis*. *Control in vitro*, *Control Hidroponía*, 24 hrs y 120 hrs de tratamiento de iones hierro (III) 500 μ M de FeCl_3 . 18s control de expresión. Columnas indican el promedio (n=3); barras de error estándar. Letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas evaluado con el test de Duncan ($p < 0.05$). Electroforesis en agarosa 1%.

- *fer3*

En primer lugar, se observó que el contenido relativo de transcritos *fer3* se mantuvieron cuando las plantas fueron traspasadas desde el cultivo *in vitro* al cultivo hidropónico. Posteriormente, al ser expuestas a la presencia de hierro, se observó un aumento de la transcripción; luego de 120 hrs de tratamiento se observaron diferencias significativas en la acumulación de transcritos respecto a las plantas control (Fig. 19).

La deficiencia de hierro en las plantas conduce a síntomas de clorosis, resultado de la falta de clorofila, por lo tanto en las plantas, durante la escasez de hierro se inducen sistemas de absorción de hierro en raíces (Briat 2008). Al experimentar en plantas de maíz, con adiciones de exceso de hierro sobre los medios de cultivo, luego de un periodo de déficit de este micronutriente, se observa una gran afluencia de iones hierro hacia el interior de la planta, obteniendo un punto máximo en la expresión de *ferritina* en raíces a las 48 hrs de la aplicación de hierro, mientras que, en las hojas, el punto máximo se observó a las 72 hrs (Lobréaux et al. 1992). Por otra parte, el ARNm de ferritina es detectable en hojas de plántulas de maíz a las 3 hrs de la aplicación de hierro en el medio de cultivo, alcanzando un máximo en la acumulación de transcritos a las 6 hrs (Lobréaux et al. 1993).

En *C. quitensis* se obtuvo mayor acumulación de transcritos de ferritina (*fer3*) luego de 120 hrs de tratamiento con 500 μM de FeCl_3 . Las diferencias con los resultados obtenidos por Lobléaux et al. (1993) en plantas de maíz, se puede deber a que en la cinética aplicada en *C. quitensis* no se consideró la utilización de un cultivo previo en deficiencia de hierro. Sin embargo, se logró comprobar que el clavelito antártico tiene una respuesta a nivel de transcripción a altas concentraciones de hierro mediante mayor transcripción de ferritina.

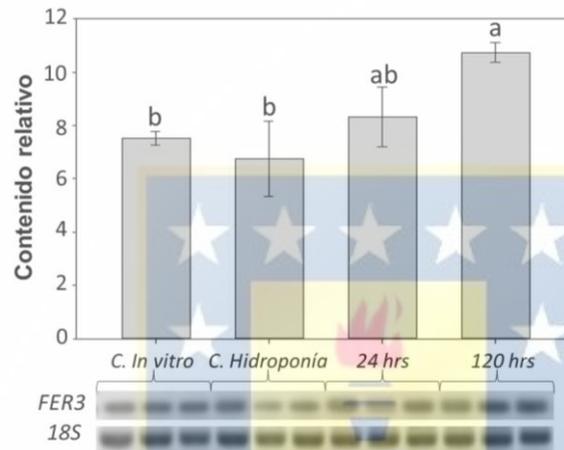


Fig. 19: Acumulación de transcritos *vit1* en plantas de *Colobanthus quitensis*. Control *in vitro*, Control Hidroponía, 24 hrs y 120 hrs de tratamiento de iones hierro (III) 500 μM de FeCl_3 . 18s control de expresión. Columnas indican el promedio (n=3); barras de error estándar. Letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas evaluado con el test de Duncan ($p < 0.05$). Electroforesis en agarosa 1%.

4. Contenido de prolina

Se determinó el contenido de prolina en tejidos de *C. quitensis* en plantas tratadas con salinidad, bajas temperaturas e iones hierro. Se observó un aumento en la acumulación de prolina en plantas tratadas con salinidad e iones hierro, con diferencias significativas respecto a plantas del control hidropónico, mientras que en las plantas tratadas de baja temperatura (4°C) se mantuvo a niveles similares a los de las plantas control (Fig. 20 A). Además, la expresión relativa del gen *p5cs* en plantas de clavelito antártico sólo mostró un aumento significativo en las plantas expuestas a salinidad, mientras que en los otros tratamientos los contenidos relativos de transcritos se mantuvieron constantes en todos los momentos del tiempo evaluado (Fig. 20 B).

La acumulación de prolina en *C. quitensis* se ha descrito anteriormente en respuesta a salinidad, demostrando que la prolina se acumula a los 7 días de aplicación de tratamiento salino (150 mM NaCl) en plantas cultivadas en condiciones de jardín común y se mantiene luego de 21 días de tratamiento (Klagges 2015), durante la presente investigación se observó la acumulación de prolina a los 5 días en tratamiento salino en condiciones de cultivo hidropónico, con diferencias significativas respecto a las muestras control, alcanzando un contenido de prolina de $1.211,6 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($R^2=0,9986$) en el tejido de la planta.

En cuanto a la acumulación de prolina frente a metales pesados, se ha descrito que *C. quitensis* acumula este osmolito en respuesta al exceso de cobre ($500 \mu\text{M}$ de CuSO_4) cultivadas *in vitro* en medio sólido, estas plantas de clavelito antártico llegaron a acumular $48,23 \mu\text{g}/\text{mg}$ de prolina en sus tejidos, con diferencias significativas respecto al control (Cuba-Díaz et al. 2017c). En este estudio, la acumulación de prolina frente a exceso de hierro ($500 \mu\text{M}$ de FeCl_3) en cultivo hidropónico alcanzó $32,55 \mu\text{g}/\text{mg}$ en los tejidos de la planta, con diferencias significativas respecto a plantas del control en cultivo hidropónico. En relación a la acumulación de prolina frente a condiciones de bajas temperaturas (4°C) no se observaron diferencias significativas respecto a las plantas control.

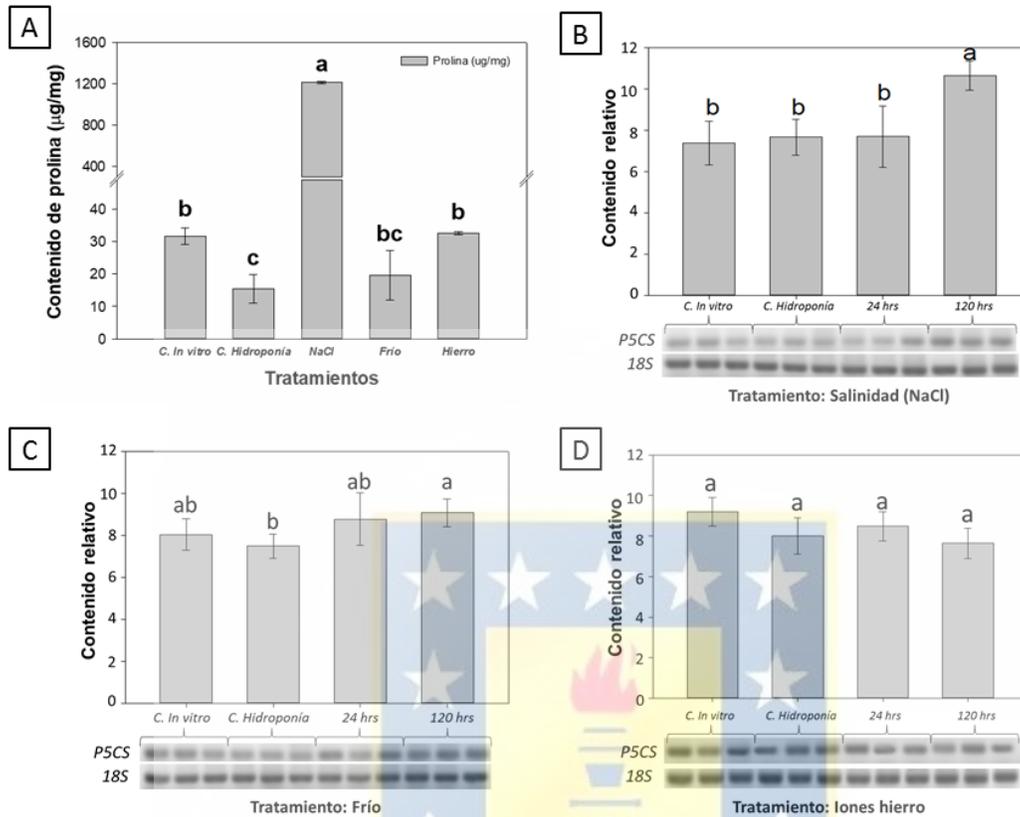
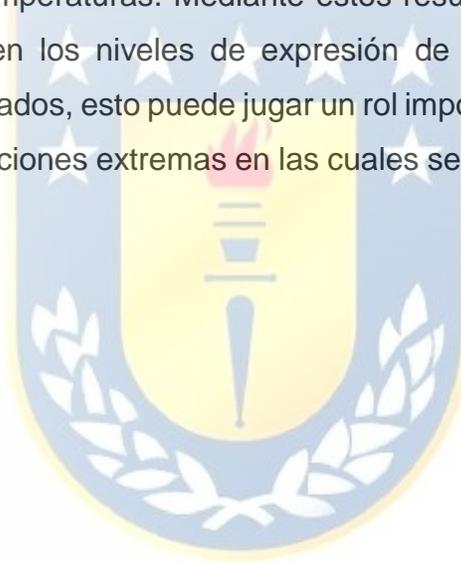


Fig. 20: Contenido de prolina y acumulación de transcritos de *p5cs* en *Colobanthus quitensis* en tratamientos de salinidad, frío e iones hierro. En **A**: Contenido de prolina, en µg de prolina por mg de tejido fresco (µg/mg). En **B**, **C** y **D**: Análisis de la acumulación de transcritos de *p5cs* para muestras *C. in vitro*, *C. hidroponía*, 24 y 120 hrs de tratamiento, en salinidad (**B**), frío (**C**) e iones hierro (**D**). Columnas indican el promedio (n=3); barras de error estándar. Letras sobre las barras indican diferencias significativas: en **A** mediante un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) y en **B**, **C** y **D** por medio de la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

CONCLUSIÓN

Al evaluar la expresión de los genes seleccionados en esta investigación frente a los tratamientos de salinidad, bajas temperaturas e iones hierro, se observó que, en la mayoría de los casos, los niveles de transcripción tendieron al aumento. La acumulación de transcritos mostró aumentos significativos solo en: *p5cs* en plantas expuestas a exceso salinidad (150 mM), *sps* en plantas expuestas a bajas temperaturas (4°C), *vit1* y *fer3* en plantas expuestas a exceso de iones hierro (500 μ M de FeCl_3). Por otra parte, el contenido de prolina solo mostró un aumento significativo en los tratamientos de salinidad e iones hierro, mientras que un aumento significativo en la expresión de *p5cs* se observó en plantas tratadas con salinidad y bajas temperaturas. Mediante estos resultados se comprobó que *C. quitensis* presenta cambios en los niveles de expresión de genes frente a factores ambientales en ambientes controlados, esto puede jugar un rol importante en la aclimatación de esta especie frente a las condiciones extremas en las cuales se desarrolla naturalmente.



BIBLIOGRAFÍA

Alberdi M, Bravo L, Gutiérrez A, Gidekel M, Corcuera LJ (2002). Ecophysiology of Antarctic vascular plants. *Physiol Plant* 115:479–486

Álvarez-Fernández R (2013) Chapter One - Explanatory Chapter: PCR Primer Design, *Methods in Enzymology*. Academic Press 529: 1-21

Amini S, Ghobadi C, Yamchi A (2015). Proline accumulation and osmotic stress: an overview of *P5CS* gene in plants. *Genet Agric Biotechnol Inst Tabarestan* 3:44–55

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

Ashraf M, Foolad MR (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot* 59:206–216

Bascuñán-Godoy L, Uribe E, Zúñiga-Feest A, Corcuera LJ, Bravo LA (2006). Low temperature regulates sucrose-phosphate synthase activity in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. by decreasing its sensitivity to Pi and increased activation by glucose-6-phosphate. *Polar Biol* 29:1011–1017

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

Bascuñán-Godoy L, Sanhueza C, Cuba M, Zuñiga GE, Corcuera LJ, Bravo LA (2012). Cold-acclimation limits low temperature induced photoinhibition by promoting a higher photochemical quantum yield and a more effective PSII restoration in darkness in the Antarctic rather than the Andean ecotype of *Colobanthus quitensis* Kunt Bartl (Cariop. *BMC Plant Biol* 12:

Bastow EL, Garcia de la Torre VS, Maclean AE, Green RT, Merlot S, Thomine S, Balk J (2018). Vacuolar Iron Stores Gated by NRAMP3 and NRAMP4 Are the Primary Source of Iron in Germinating Seeds. *Plant Physiol* 177:1267–1276.

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39:205–207

Bravo LA, Saavedra-Mella FA, Vera F, Guerra A, Cavieres LA, Ivanov AG, Huner NPA, Corcuera LJ (2007). Effect of cold acclimation on the photosynthetic performance of two ecotypes of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *J Exp Bot* 58:3581–3590

Briat JF (2008) Iron Dynamics in Plants. *Adv Bot Res* 46:137–180.

Briat JF, Duc C, Ravet K, Gaymard F (2010). Ferritins and iron storage in plants. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1800:806–814.

Cavieres LA, Sáez P, Sanhueza C, Sierra-Almeida A, Rabert C, Corcuera LJ, Alberdi M, Bravo LA (2016). Ecophysiological traits of Antarctic vascular plants: their importance in the responses to climate change. *Plant Ecol* 217:343–358.

Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee B, Hong X (2003). ICE1 : A regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 17:1043–1054

Christie PJ, Alfenito MR, Walbot V (1994). Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194:541–549.

Cho MS, Lee H, Jo H, Lee H, Kang Y, Park H, Lee J (2018). Comparative transcriptome analysis of field- and chamber-grown samples of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl, an Antarctic flowering plant. *Sci Rep* 8:1–14

Connolly EL, Guerinot M Lou (2002). Minireview Iron stress in plants. *Genome Biol* 3:1–4

Conte SS, Walker EL (2011). Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Mol Plant* 4:464–476

Contreras P, Cuba M (2015). Morpho-physiological differentiation in four populations of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) from the southern Patagonia and Antarctic. En: X Plant Biology Meeting. Valdivia, Chile. Abstract Book Pag. 187

Convey P, Chown SL, Clarke A, Barnes DKA, Bokhorst S, Cummings V, Ducklow HW, Frati F, Allan-Green TG, Gordon S (2014). The spatial structure of antarctic biodiversity. *Ecol Monogr* 84:203–244

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. En: Leppe M, Molina-Montenegro M, González M, MacDonell S, Lavín P, Oses R, Gallardo J, Rivadeneira M, Arata J, Canales R eds. *Avances en Ciencia Antártica Latinoamericana. VII Congreso Latinoamericano de Ciencia Antártica*. Eds, INACH-CEAZA, 436-439.

Cuba-Díaz M, Acuña D, Cordero C, Klagges M (2014). Optimización de parámetros para la propagación *in vitro* de *Colobanthus quitensis* (Kunt) Bartl. *Gayana Bot.* 71: 58-67

Cuba-Díaz M, Castel K, Acuña D, Machuca Á, Cid I (2017a). Sodium chloride effect on *Colobanthus quitensis* seedling survival and *in vitro* propagation. *Antarct Sci* 29:45–46

Cuba-Díaz M, Klagges M, Fuentes-Lillo E, Cordero C, Acuña D, Opazo G, Troncoso-Castro JM (2017b). Phenotypic variability and genetic differentiation in continental and island populations of *Colobanthus quitensis* (*Caryophyllaceae*: Antarctic pearlwort). *Polar Biology* 40, 12: 2397-2409

Cuba-Díaz M, Marín C, Castel K, Machuca Á, Rifo S (2017c). Effect of copper (II) ions on morpho-physiological and biochemical variables in *Colobanthus quitensis*. *J Soil Sci Plant Nut.* 17:429-440

Curie C, Alonso JM, Jean MLE, Ecker JR, Briat J, Biochimie L De, Inra C, Universite E, Place M, Cedex FM (2000). Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *755:749–755*

Edwards JA, Lewis Smith RI (1988). Photosynthesis and respiration of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* from the maritime Antarctic. *Br. Antarct. Surv. Bull.* 81:41–63

Fahmideh L, Fooladvand Z (2018). Isolation and Semi Quantitative PCR of Na⁺/H⁺ Antiporter (SOS1 and NHX) Genes under Salinity Stress in *Kochia scoparia*. *Biol Proced Online* 20:1–9.

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 46pp.

Flores-Hernández A, Murillo-Amador B, García-Hernández JL, Fraga-Palomino HC (2001). Proline concentration in young cladodes from nopal cultivars (*Opuntia megacantha*) exposed to heat stress. *Phyton-International J Exp Bot* 15–24

Gianoli E, Inostroza P, Zúñiga-Feest A, Reyes-Días M, Cavieres L, Bravo LA, Corcuera LJ (2004). Ecotypic differentiation in morphology and cold resistance in populations of *Colobanthus quitensis* (*Caryophyllaceae*) from the Andes of central Chile and Maritime Antarctic. *Arctic, Antarct Alp Res* 36:615–623

Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM, Thomashow MF (1998). Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J* 16:433–442.

Guerinot ML (2001). Fortified foods and phytoremediation. Two sides of the same coin. *Plant Physiol* 125:164–167.

Gupta B, Huang B, Gupta B, Huang B (2014). Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *Int J Genomics* 2014:1–18

Hauser F, Horie T (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: A mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K^+/Na^+ ratio in leaves during salinity stress. *Plant, Cell Environ* 33:552–565

Hoire T, Hauser F, Schroeder J (2010). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. *Plant, Cell Environ* 14:660–668

Huang X, Li K, Jin C, Zhang S (2015). ICE1 of *Pyrus ussuriensis* functions in cold tolerance by enhancing *PuDREBa* transcriptional levels through interacting with PuHHP1. *Sci Rep* 5:1–16.

Huber SC, Huber JL (1996). Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:431–444

Ji H, Pardo JM, Batelli G, Van Oosten MJ, Bressan RA, Li X (2013). The salt overly sensitive (SOS) pathway: Established and emerging roles. *Mol Plant* 6:275–286

Kim J-S, Mizoi J, Yoshida T, Fujita Y, Nakajima J, Ohori T, Todaka D, Nakashima K, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011). An *ABRE* promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the *DREB2A* gene, which encodes a transcription factor regulating drought-Inducible genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 52:2136–2146

Kim SA, Punshon T, Lanzirotti A, Li A, Alonso JM, Ecker JR, Kaplan J, Guerinot M Lou (2006). Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science* (80) 314:1295–1298

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 51 pp.

Koc J, Androsiuk P, Chwedorzewska KJ, Cuba-Díaz M, Górecki R, Gielwanowska I (2018). Range-wide pattern of genetic variation in *Colobanthus quitensis*. *Polar Biol* 41:2467–2479

Lachacz A, Kalisz B, Gielwanowska I, Olech M, Chwedorzewska KJ, Kellmann-Sopyta W (2018). Nutrient abundance and variability from soils in the coast of king George Island. *J soil Sci plant Nutr* 18:294-311.

Leyva A, Jarillo JA, Salinas J, Martinez-Zapater JM (1995). Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol* 108:39–46.

Li L, Chen OS, Ward DMV, Kaplan J (2001). CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J Biol Chem* 276:29515–29519

Liu J, Zhu JK (1997). Proline Accumulation and Salt-Stress-Induced Gene Expression in a Salt-Hypersensitive Mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 114:591–596

Livingston DP (1996). The second phase of cold hardening: Freezing tolerance and fructan isomer changes in winter cereal crowns. *Crop Sci* 36:1568–1573

Lobréaux S, Massenet O, Briat JF (1992). Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Mol Biol* 19:563–575.

Lobréaux S, Hardy T, Briat JF (1993). Abscisic acid is involved in the iron-induced synthesis of maize ferritin. *EMBO J* 12:651–657.

Maathuis FJM, Ahmad I, Patishtan J (2014). Regulation of Na⁺ fluxes in plants. *Front Plant Sci* 5:1–9

Moore D (1970). Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. and *Deschampsia antarctica* Desv. *Br Antarct Surv Bull* 23:63–80

Moshaei R, Nematzadeh GA, Askari H, Mozaffari Nejad AS, Pakdin A (2014). Quantitative gene expression analysis of some sodium ion transporters under salinity stress in *Aeluropus littoralis*. *Saudi J Biol Sci* 21:394–399.

Narayanan N, Beyene G, Chauhan RD, Gaitán-Solis E, Grusak MA, Taylor N, Anderson P (2015). Overexpression of *Arabidopsis* VIT1 increases accumulation of iron in cassava roots and stems. *Plant Sci* 240:170–181.

Nevo Y, Nelson N (2006). The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1763:609–620

Olenichenko NA, Zagoskina N V. (2005). Response of winter wheat to cold: Production of phenolic compounds and L-phenylalanine ammonia lyase activity. *Appl Biochem Microbiol* 41:600–603.

Oomen RJFJ, Wu J, Lelièvre F, Blanchet S, Richaud P, Barbier-Brygoo H, Aarts MGM, Thomine S (2009). Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol* 181:637–650

Petit JM, Van Wuytswinkel O, Briat JF, Lobréaux S (2001). Characterization of an Iron-dependent Regulatory Sequence Involved in the Transcriptional Control of AtFer1 and ZmFer1 Plant Ferritin Genes by Iron. *J Biol Chem* 276:5584–5590

Piotrowicz-Cieślak AI, Gielwanowska I, Bochenek A, Loro P, Górecki RJ (2005). Carbohydrates in *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica*. *Acta Soc Bot Pol* 74:209–217

Pisano E (1988). Sectorización fitogeográfica del archipiélago sud patagónico-fueguino: II. Vegetación y flora vascular del área del Parque Nacional Laguna San Rafael, Aysen (Chile). *Ans. Ins. Pat.* 18:5-34.

Quint M, Delker C, Franklin KA, Wigge PA, Halliday KJ, Van Zanten M (2016). Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nat Plants* DOI: 10.1038/NPLANTS.2015.190.

Rahnama H, Ebrahimzadeh H (2004). The effect of NaCl on proline accumulation in potato seedlings and calli. *Plant Physiology*. 26:263–270

Rivero RM, Ruiz J, Garcia P, López-Lefebvre L, Sánchez E, Romero L (2002). Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci* 160:315–321.

Rout GR, Sahoo S (2015). Role of iron in plant growth and metabolism. *Rev Agric Sci* 3:1–24

Ruhland CT, Day TA (2000). Effects of ultraviolet-B radiation on leaf elongation, production and phenylpropanoid concentrations of *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis* in Antarctica. *Physiol Plant* 109:244–251.

Ruiz KB, Rapparini F, Bertazza G, Silva H, Torrigiani P, Biondi S (2017). Comparing salt-induced responses at the transcript level in a salares and coastal-lowlands landrace of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Environ Exp Bot* 139:127-142.

Silva-Ortega CO, Ochoa-Alfaro AE, Reyes-Agüero JA, Aguado-Santacruz GA, Jiménez-Bremont JF (2008). Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiol Biochem* 46:82–92

Slama I, Abdelly C, Bouchereau A, Flowers T, Sauré A (2015). Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Ann Bot* 115:433–447

Slavic K, Krishna S, Lahree A, Bouyer G, Hanson KK, Vera I, Pittman JK, Staines HM, Mota MM (2016). A vacuolar iron-transporter homologue acts as a detoxifier in *Plasmodium*. *Nat Commun* 7:1–10.

Smith RI (2003). The enigma of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* in Antarctica. En: Huiskes AHL, Gieskes WWC, Rozema J, Schoro RML, van der Vies SM, Wolff WJ, eds. *Antarctic Biology in a Global Context*. Leiden: Backhuys Publishers, 34-239.

Solís-Guzmán MG, Argüello-Astorga G, López-Bucio J, Ruiz-Herrera LF, López-Meza JE, Sánchez-Calderón L, Carreón-Abud Y, Martínez-Trujillo M (2017). *Arabidopsis thaliana* sucrose phosphate synthase (sps) genes are expressed differentially in organs and tissues, and their transcription is regulated by osmotic stress. *Gene Expr Patterns* 25–26:92–101

Stockinger E, Gilmour S, Thomashow M (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *94:1035–1040*

Strizhov N, Abrahám E, Okrész L, Blickling S, Zilberstein A, Schell J, Koncz C, Szabados L (1997). Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant J* 12:557–69

Sun XB, Ma HX, Jia XP, Chen Y, Ye XQ (2014). Molecular cloning and characterization of two novel DREB genes encoding dehydration-responsive element binding proteins in halophyte *Suaeda salsa*. *Genes and Genomics* 37:199–212

Thomine S, Wang R, Ward J, Crawford N, Schroeder J (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Plant Biol* 24:9–14

Thomine S, Lelièvre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H (2003). *AtNRAMP3*, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* 34:685–695.

Viehweger K (2014). How plants cope with heavy metals. *Bot Stud* 55:35.

Wang H, Zhou L, Fu Y, Cheung MY, Wong FL, Phang TH, Sun Z, Lam HM (2012). Expression of an apoplast-localized BURP-domain protein from soybean (*GmRD22*) enhances tolerance towards abiotic stress. *Plant, Cell Environ* 35:1932–1947

Wei J, Theil EC (2000). Identification and characterization of the iron regulatory element in the ferritin gene of a plant (soybean). *J Biol Chem* 275:17488–17493

Xiong FS, Ruhland CT, Day TA (1999). Photosynthetic temperature response of the Antarctic vascular plants *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica*. *Physiol Plantarum* 106: 276-286.

Xiong FS, Mueller EC, Day TA (2000). Photosynthetic and respiratory acclimation and growth response of Antarctic vascular plants to contrasting temperature regimes. *Am J Bot* 87:700–710.

Yoshida T, Fujita Y, Maruyama K, Mogami J, Todaka D, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2015). Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of *SnRK2* kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell Environ* 38:35–49

Zhang Y, Xu YH, Yi HY, Gong JM (2012). Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice. *Plant J* 72:400–410.