



**UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**Uso de microorganismos antárticos como estrategia para mitigar los efectos  
del estrés salino en *Lactuca sativa* L. bajo un escenario futuro de cambio climático**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**Hermann Christian Hansen Castillo**

**TALCA, CHILE  
2019**



**UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**Uso de microorganismos antárticos como estrategia para mitigar los efectos  
del estrés salino en *Lactuca sativa* L. bajo un escenario futuro de cambio climático**

**Por**

**Hermann Christian Hansen Castillo  
MEMORIA DE TITULO**

**Presentada a la  
Universidad de Talca como  
parte de los requisitos para optar al título de**

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**TALCA, 2018**

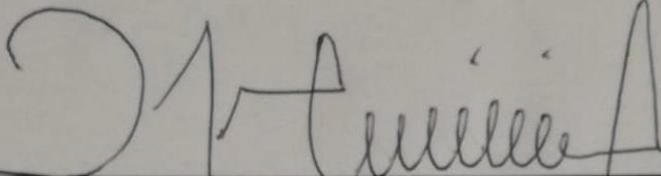
## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



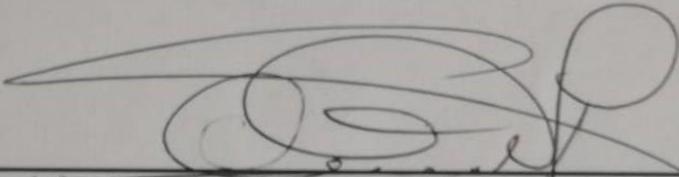
Talca, 2019

Aprobación:



---

Profesor Guía: Biólogo, Dr. Cs. Marco A. Molina Montenegro  
Profesor Asociado  
Instituto de Ciencias Biológicas



---

Profesor informante: Ing. Agrónomo, PhD. Samuel Ortega Farias  
Profesor Titular  
Facultad de Ciencias Agrarias

Fecha de presentación de Memoria de Título 09 de Enero de 2019

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mis padres por contenerme y brindarme su incondicional cariño y apoyo, durante este largo proceso.

A Dios, por protegerme, darme la fuerza y por enseñarme a través de la vida.

A todas las personas, amigos y profesores, que de algún modo me apoyaron o aconsejaron.

A mi profesor guía, Marco Molina, por confiar en mí, por tenerme paciencia y por ayudarme siempre más allá de lo académico.

Al profesor Samuel Ortega por sus clases llenas de motivación e inspiración.

A la profesora Flavia Schiappacasse por su buena disposición, por compartir el gusto por las plantas ornamentales y por su buena atención hacia mi persona.

## RESUMEN

El cambio climático es un fenómeno que se ha vuelto una problemática a nivel mundial, afectando diversos ámbitos, especialmente la agricultura. En Chile, su proyección augura una influencia negativa en algunos factores, en los que destaca, la menor disponibilidad del recurso hídrico (menores precipitaciones), el aumento de la temperatura, la desertificación y la salinización de suelos de uso agrícola. Es por esto que se hace imperativo la búsqueda de herramientas y estrategias para mitigar algunos de estos factores. Un factor potenciado por el cambio climático es la salinidad de los suelos, factor importante en los sistemas agrícolas, dado su efecto negativo en la mayoría de las plantas cultivadas en el país. La salinidad afecta el crecimiento y desarrollo de los cultivos principalmente por toxicidad iónica, desbalance nutricional, disminución del potencial hídrico del suelo y aumento de especies de oxígeno reactivas (ROS) en las plantas. Las medidas para paliar los efectos de la salinidad de suelos resultan la mayoría de las veces poco viables, por los altos costos y por los altos volúmenes de aplicación para mejorar las características de los suelos (sulfato de Ca, zeolita o lavado de suelos). Para la región del Maule se estima un aumento del nivel de salinidad hasta de tres veces en los próximos 50 años, esto, es decir, de 50mM a 150mM. Uno de los cultivos de hoja más afectados sin duda será la lechuga, hortaliza más importante a nivel mundial, la cual es muy sensible a la salinidad. Una estrategia alternativa para combatir el efecto de la salinidad en cultivos agrícolas es el uso de microorganismos antárticos asociados a vegetales (hongos y bacterias) los cuales por condiciones naturales pueden desarrollarse en escenarios de salinidad (zonas costeras de islas del continente antártico). Es por ello que el presente estudio se basa en la inoculación de microorganismos antárticos sobre el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*), en condiciones de salinidad (200mM) con el fin de evaluar el desempeño productivo, fisiológico y el rol osmoprotector que pueden conferir estos microorganismos a los cultivos frente a la proyección del cambio climático para Chile y la región del Maule.

**Palabras claves:** Cambio climático, salinidad, microorganismos antárticos.

## **ABSTRACT**

Climate change is a phenomenon that has become a problem worldwide, affecting several areas, especially agriculture. In Chile, its projection predicts a negative influence on some factors, which include a lower availability of water resources (lower rainfall), an increase in temperature, desertification and salinization of agricultural land. Thus, it is imperative to search any tools and/or strategies to mitigate some of these factors. A component enhanced by climate change is soil salinity, an important factor limiting the agricultural systems, given its negative effect on most of the plants grown and yield worldwide. Salinity affects the growth and development of crops mainly due to ionic toxicity, nutritional imbalance, decrease in soil water potential and increase of radioactive oxygen species (ROS) in plants. For the Maule region, an increase in the salinity level is estimated up to three times in the next 50 years, that is, from 50mM to 150Mm. One of the most affected leaf crops will undoubtedly be the lettuce crop, the most important vegetable in the world, which is very sensitive to salinity. An alternative strategy to combat the effect of salinity in agricultural crops is the use of antarctic root-microorganisms associated with plants (fungi and bacteria) which by natural selection can develop under salinity conditions (coastal areas of islands of the Antarctic continent). The present study evaluated, based in the inoculation of Antarctic microorganisms on lettuce (*Lactuca sativa*), the ecophysiological performance and yield of this crop under salinity conditions. Specifically, was assessed the productive, physiological, gene expression and osmoprotective role that can confer these microorganisms in front of the projection of climate change for the Maule region.

**Keywords:** Climate change, salinity, Antarctic microorganisms.

## ÍNDICE

### CAPITULO

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.Hipótesis.....	3
1.2 Objetivo general .....	3
1.3 Objetivos específicos.....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 Cambio climático .....	4
2.1.1 Causas del cambio climático.....	4
2.1.2 Consecuencias del cambio climático .....	4
2.1.3 El cambio climático y sus efectos sobre la agricultura .....	5
2.1.4 Cambio climático en América Latina .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
2.1.5 Situación nacional .....	6
2.2 Importancia del agua para los cultivos .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
2.3 Salinidad.....	7
2.3.1 Origen de la salinidad de los suelos.....	7
2.3.2 La salinidad, un problema para los cultivos .....	8
2.3.4 Efecto de la salinidad en las plantas .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
2.3.5 Mecanismos de tolerancia a salinidad .....	9
2.4 El cultivo de lechuga.....	12
2.4.1. Situación nacional del cultivo .....	12
2.4.2 Variedades cultivadas en Chile .....	13
2.5. Microorganismos antárticos .....	14
2.5.1 Uso de microorganismos antárticos como alternativa para enfrentar el estrés salino .....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1 Aislamiento e identificación de hongos radiculares .....	15
3.2 Aislamiento e identificación de bacterias de radiculares.....	16
3.3 Montaje del experimento .....	17
3.4 Mediciones .....	18
3.4.1 Eficiencia fotoquímica.....	19
3.4.2 Peroxidación Lipídica .....	19
3.4.3 Prolina 20	
3.4.4 Expresión del gen “NHX1”.....	20

3.4.5 Biomasa Fresca.....	21
3.5 Mecanismos de protección.....	21
3.6 Diseño experimental y análisis estadístico.....	22
4. RESULTADOS.....	22
4.1 Efectos fisiológicos del estrés salino.....	22
4.2 Mecanismos de tolerancia al estrés salino.....	24
4.3 Impacto en la productividad.....	25
5. DISCUSIÓN.....	27
6. CONCLUSIONES.....	29
7. BIBLIOGRAFÍA.....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura.3.1** Cuadro de bacterias que se utilizaron en el ensayo, extraídos desde genbank.com.....16
- Figura 3.3** Ubicación del ensayo, Universidad de Talca, Chile.....17
- Figura 3.4** Inoculación de lechuga con microorganismos endófitos.....18
- Figura 4.1a.** Desempeño fisiológico de los individuos de lechuga medidos como eficiencia fotoquímica individual ( $F_v / F_m$ ) del fotosistema II (PSII) a 30; 45 y 60 días después de la exposición al estrés salino (NaCl 200 mM para individuos "estresados") e inoculados con la asociación de microorganismos antárticos (plantas M+). Los grupos de control para ambas condiciones (no estresado y no inoculado (M-)) también se muestran. El diagrama de caja representa la distribución intercuartílica de los datos para cada grupo experimental. Diferentes letras indican diferencias significativas a posteriori (prueba de Tukey,  $\alpha < 0.05$ ).....23
- Figura 4.1b.** Nivel de peroxidación lipídica a 0; 45 y 60 días después de la exposición al estrés salino (NaCl 200 mM para individuos "estresados") e inoculados con la asociación de microorganismos antárticos (plantas M+). Los grupos de control para ambas condiciones (no estresado y no inoculado (M-)) también se muestran. El diagrama de caja representa la distribución intercuartílica de los datos para cada grupo experimental. Diferentes letras indican diferencias significativas a posteriori (prueba de Tukey,  $\alpha < 0.05$ ) (TBARS).....23
- Figura 4.2a.** Concentración de prolina (mmol / g FW) en tejido de hojas de plantas de lechuga medido a los 30, 45 y 60 días después de exposición al estrés salino (NaCl 200 mM para individuos "estresados") e inoculados con microorganismos antárticos (plantas M+). Los grupos de control para ambas condiciones (no estresado y no inoculado (M-)) también se muestran. El diagrama de caja representa la distribución intercuartílica de los datos para cada grupo experimental. Diferentes letras indican diferencias significativas a posteriori (prueba de Tukey,  $\alpha < 0.05$ ).....24
- Figura 4.2.b** expresión relativa del gen de NHX1 en tejido de hojas de plantas de lechuga medido a los 30, 45 y 60 días después de exposición al estrés salino (NaCl 200 mM para individuos "estresados") e inoculados con microorganismos antárticos (plantas M+). Los grupos de control para ambas condiciones (no estresado y no inoculado (M-)) también se muestran. El diagrama de caja

representa la distribución intercuartílica de los datos para cada grupo experimental. Diferentes letras indican diferencias significativas a posteriori (prueba de Tukey,  $\alpha < 0.05$ ).....25

**Figura 4.3** Peso final medio de biomasa fresca para raíces, hojas e individuos enteros de plantas de lechuga después de ser sometido durante 60 días a estrés salino (NaCl 200 mM para individuos "estresados") e inoculado con microorganismos antárticos (plantas M+). Los grupos de control para ambas condiciones (no estresado y no inoculado (M-)) también se muestran. El diagrama de caja representa la distribución intercuartílica de los datos para cada grupo experimental. Diferentes letras indican diferencias significativas a posteriori (prueba de Tukey,  $\alpha < 0.05$ ).....26

**Figura 5** Se muestran la morfología de las plantas de lechuga después de 60 días en cada tratamiento. Plantas de control (A); plantas de control inoculadas con una mezcla de microorganismos antárticos (B); plantas bajo tratamiento con sal (NaCl 200 mM) no inoculadas con una mezcla de microorganismos antárticos (C); planta bajo tratamiento con sal (NaCl 200 mM) inoculada con una mezcla de microorganismos antárticos.....26

## 1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el sector agrícola presenta un alto grado de vulnerabilidad frente al cambio climático, principalmente a los cambios en la temperatura y la modificación del régimen pluviométrico, lo cual genera un impacto directo en la productividad del sector (Kurukularuriya y Rosenthal, 2003). Se cree que los cambios de lenta aparición, como el aumento gradual de la temperatura y las variaciones en los patrones de precipitación, se intensificarán en las próximas décadas, reduciendo aún más los rendimientos de los cultivos. No obstante, estos impactos pueden ser percibidos en la actualidad. Por ejemplo, algunos estudios indican que el rendimiento mundial del maíz y el trigo en las tres últimas décadas ha disminuido en un 3,8% y un 5,5%, respectivamente, por efecto del cambio climático (Adger et al., 2003).

En 2012, la región centro-occidental de EEUU sufrió la peor sequía en 50 años, esto provocó una caída del 25% en la producción de maíz prevista (OCD-FAO, 2013), determinando un alza cercana al 40% en el precio mundial del maíz. De manera similar, las extremas sequías de ese mismo año contribuyeron a generar aumentos sin precedentes, cercanos al 22% en el precio del trigo en otros importantes países productores como Kazajistán (Ibid, 2013). Estos aumentos afectaron de manera significativa principalmente a países de bajos ingresos que dependen de las importaciones como en el caso de Yemen, que importa el 95% de los cereales que consume (FAO, 2012).

En cuanto a impactos del cambio climático sobre la producción de alimentos, se observan pérdidas inevitables en cultivos, pesca y ganado, así como una menor capacidad de producción (en ocasiones permanente), por la intrusión salina en zonas costeras, la desertificación y el aumento de la aridez y los fenómenos meteorológicos extremos (OXFAM, 2013). Las pérdidas y los daños en la agricultura no se cuentan únicamente en términos económicos, sino que afectan también a la seguridad alimentaria y ponen en peligro el derecho a la alimentación (Banco Mundial, 2013)

En Chile, según la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), bajo un nuevo escenario climático los bordes del desierto se extenderán un promedio de 50 km, lo que prácticamente desplazará hacia el sur climas que hoy son propios de la zona central. Por ejemplo, la Región de Coquimbo con su clima semi-árido y típica vegetación arbustiva, y adecuado para cultivos como la vid, comenzará a mostrar un paisaje cada vez más desértico, donde será imposible sostener la agricultura tradicional (ODEPA, 2013). La Región Metropolitana, en tanto, transitará de un clima Mediterráneo a

uno semi-árido, exhibiendo un paisaje mucho más cercano al que conocemos hoy en la IV Región (ODEPA, 2013).

Las zonas de clima árido y semiárido suelen presentar suelos salinos, principalmente por la concentración de sales como consecuencia del desequilibrio en el balance hídrico del perfil del suelo, ya que la evapotranspiración es mayor a la precipitación en estas zonas climáticas. El agua del suelo es absorbida y transpirada por las plantas y a la vez se evapora directamente desde el suelo (evapotranspiración), además, las sales solubles que contiene el agua no se evaporan y se van concentrando en la superficie, llegando a formarse una película blanquecina en la capa externa del suelo formada por costras de diferentes sales. Así, en las tierras áridas y semiáridas, donde la evapotranspiración es mayor que la precipitación, se generan suelos salinos de forma natural (Paniza-Cabrera, 2002).

El continente antártico está considerado como una de las zonas ambientales más duras del mundo (bajas temperaturas, salinidad, dado que es una zona costera) y no se parece a ningún otro sitio en la tierra (Alberdi et al., 2002). En los últimos años, los ecosistemas antárticos han sido investigados por la presencia de microorganismos, entre ellos, bacterias, arqueas, microalgas y ocasionalmente hongos (Ruisi *et al.*, 2007). El aislamiento geográfico y las condiciones inhóspitas de la Antártida hacen de esta región un escenario interesante para los estudios sobre taxonomía, ecología, adaptación y evolución de las comunidades de microorganismos. Varios son los estudios que señalan a estos microorganismos (e.g., hongos y bacterias) como una estrategia alternativa para enfrentar el déficit hídrico y estrés salino, condiciones agravadas por el cambio climático (Thom et al., 2012; Coleman-Derr y Tringe 2014).

El uso de hongos de zonas extremas en cultivos ha evidenciado una mejora en términos productivos, relacionados a la eficiencia fotosintética, mecanismos osmoreguladores, acumulación de prolina, entre otros (Molina-Montenegro et al., 2016; Cheplick y Faeth, 2009), por lo tanto, desde una mirada ecosustentable el uso de estos, presenta una gran ventaja frente a métodos de carácter convencional.

### 1.1. Hipótesis

Para el futuro escenario de cambio climático en la región del Maule, se proyecta un aumento de las temperaturas y una disminución de las precipitaciones, lo cual aumentaría la evapotranspiración del suelo y por consiguiente los niveles de salinidad en la región, por lo tanto, se propone que:

El uso de microorganismos antárticos aumentaría la tolerancia al estrés salino en *Lactuca sativa*, mejorando algunas respuestas fisiológicas del cultivo, potenciando la osmoprotección de los tejidos vegetales e induciendo la modulación del gen “NHX1” responsable de la compartimentalización del sodio en las células.

### 1.2 Objetivo general

Evaluar el rol de los microorganismos antárticos respecto a los mecanismos de tolerancia al estrés salino, efectos fisiológicos e impacto productivo sobre plantas de *Lactuca sativa* bajo estrés salino.

### 1.3 Objetivos específicos

- Determinar la eficiencia de la aplicación de microorganismos antárticos respecto a efectos fisiológicos (eficiencia fotoquímica y peroxidación lipídica) sobre el cultivo de *L. sativa*.
- Evaluar los mecanismos de tolerancia al estrés salino (concentración de prolina y expresión del gen “NHX1”) promovidos por la presencia de microorganismos antárticos.
- Evaluar el impacto productivo (biomasa fresca) de los microorganismos antárticos sobre *Lactuca sativa*, bajo condiciones de salinidad.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Cambio climático**

El cambio climático hace mención a las modificaciones planetarias a gran escala, lo que puede afectar al sistema tierra en su conjunto. Estos cambios integran desde la modificación en la circulación atmosférica, circulación oceánica, cambios en el clima, ciclos biogeoquímicos, ciclo del agua, biodiversidad, pesca y cambios en el nivel del mar, cambio en el uso de la tierra, sociedad humana, entre otros (Steffen et al., 2004).

Uno de los procesos de mayor relevancia, producto del cambio climático, es la desertificación, la que común, y erradamente, es considerada la extensión de las zonas desérticas, sin embargo, hace referencia a la degradación de ecosistemas naturales o destrucción del potencial biológico de tierras anteriormente fértiles producto de las modificaciones climáticas y actividades humanas, aumentadas por los procesos naturales, siendo los sectores mayormente vulnerables a la desertificación las tierras denominadas secas, las cuales corresponden a áreas áridas, semiáridas y subhúmedas (Whitford 2002, UNCCD 2014).

#### **2.1.1 Causas del cambio climático**

Entre las principales causales del cambio climático se pueden identificar las de origen natural y antrópicas. Los impulsores naturales del cambio climático se asocian: variaciones solares, cambios en la inclinación del eje de la tierra, volcanismo y biodiversidad, mientras que dentro de los impulsores de origen antrópico se pueden considerar: el crecimiento poblacional, la contaminación, energía y uso de recursos, agricultura, urbanización, transporte y actividad industrial (Steffen et al., 2004).

#### **2.1.2 Consecuencias del cambio climático**

Variadas son las problemáticas derivadas del cambio climático, siendo algunas de ellas la disminución de la superficie terrestre cubierta por nieve o hielo, reduciendo el tiempo en que algunos lagos y ríos permanecen congelados durante el año, el aumento en el nivel medio del mar, cambios en los patrones de precipitación, velocidad de los vientos, nubosidad y en la frecuencia e intensidad de eventos climáticos extremos, siendo un ejemplo de esto último el aumento de frecuencia e intensidad tanto del fenómeno I como “El Niño” y su complemento “La Niña” durante el siglo XX (Fedorov y Philander, 2000; IPCC, 2001; Jones et al., 2001).

En términos de calidad de aire, se ha registrado un aumento en la concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico – principal gas de invernadero después del vapor de agua – en los últimos 250 años, aumento que se atribuye principalmente a las diversas actividades humanas, aumentando de 280 ppm en 1750 a 353 ppm en 1990, y sigue en aumento a una tasa de 1.8 ppm por año, estimándose que se alcanzará entre 550 y 700 ppm para el año 2050 (Bazzas et al., 1990).

Las zonas de clima árido y semiárido suelen presentar suelos salinos, principalmente debido al aumento en la concentración de sales producto de la generación del desequilibrio en el balance hídrico del perfil del suelo. Éste desbalance hídrico es generado por la alta pérdida de agua en el suelo debido a la evapotranspiración en comparación a su entrada, proveniente de la precipitación en estas zonas climáticas. En otras palabras, el agua disponible en el suelo es absorbida y transpirada por las plantas y, a la vez, se evapora directamente desde el suelo – proceso de evapotranspiración –, sin embargo, las sales solubles de la solución de suelo no son evaporadas, por lo que se van concentrando en la superficie, llegando a formar una película de aspecto blanquecina en la capa externa del suelo formada por costras de diferentes sales, generándose así la salinización de forma natural (Paniza-Cabrera, 2002).

### 2.1.3 El cambio climático y sus efectos sobre la agricultura

Entre los años 1850 y 2010, la temperatura de la Tierra aumentó a una razón de 0,5 °C por siglo, sin embargo, dicha razón aumentó a partir del año 1900 de 0,7 °C, a 1,3 °C a partir de 1950 y a 1,8 °C durante los últimos 35 años. Los últimos 20 años se encuentran entre los más calurosos desde que se comenzó a llevar registro de las temperaturas. Desde 1981, se han perdido 40 millones de toneladas anuales de cebada, maíz y trigo debido al calentamiento global -lo que al año 2002 equivale a USD 5 mil millones- (Lobell y Field, 2007), aunque estas fueron compensadas con los mayores rendimientos logrados a partir de mejoras genéticas desarrolladas en materia de cultivos y de otros avances agrotecnológicos. Parecería que, más allá de lo que se ha advertido en los últimos 50 años, las altas temperaturas estacionales pueden generalizarse aún más en diversas zonas de Mesoamérica y América del Sur en lo que resta de este siglo (Battisti y Naylor, 2009).

Se estima que las temperaturas podrían aumentar entre 0,4 °C y 1,8 °C para el año 2020, y este incremento se acentuaría aún más en las zonas tropicales. Las altas temperaturas (en especial cuando los aumentos superan los 3 °C) afectarán considerablemente la productividad agrícola, los ingresos de los productores y la seguridad alimentaria. Diversos cultivos que representan fuentes esenciales de alimentación para grandes poblaciones que padecen inseguridad alimentaria verán seriamente afectados sus rendimientos, aunque parecería que los escenarios son más inciertos para algunos cultivos que para otros (Lobell et al., 2008). Por ejemplo, el rendimiento del grano de arroz disminuye un 10 por ciento por cada incremento de 1 °C en la temperatura al aproximarse la estación

seca (Peng et al., 2004), en tanto que se espera una pérdida del 10 por ciento en la producción de maíz para el año 2055 (Jones y Thornton, 2003).

Por otro lado, el calentamiento global podría resultar beneficioso para el trigo en algunas regiones, aunque este cultivo podría ver reducida su productividad en forma considerable en aquellas zonas donde actualmente ya se registran temperaturas óptimas o bien podría extenderse a ámbitos más fríos o templados en donde aún no se desarrolla (Ortiz et al., 2008). Asimismo, la presencia de numerosos insectos y ácaros perjudiciales para los cultivos podría ir en aumento, con motivo de las crecientes temperaturas y las mayores concentraciones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en la atmósfera.

#### 2.1.5 Contexto nacional

En Chile, el cambio climático se traduce en un incremento de las temperaturas, lo que puede afectar negativamente a especies que presenten requerimientos de vernalización para inducir cambios en sus estados de desarrollo (Abdón y Meza, 2008). Además, se espera que ocurra una aceleración del desarrollo de los cultivos, lo que puede afectar el rendimiento, ya que se reduce el periodo de intercepción de radiación solar. Asimismo, se espera que incrementos de la temperatura impliquen una mayor evaporación lo que se traduce en un aumento de los niveles de salinidad en los suelos. (Abdón y Meza, 2008)

No obstante, debido a que en el proceso de evaporación intervienen muchos factores meteorológicos (por ejemplo, radiación neta, velocidad del viento, déficit de presión de vapor, etc.), existe incertidumbre sobre la magnitud final de los impactos del cambio climático. Más aún, puede darse la paradoja que, si bien la intensidad de la evaporación aumente, la reducción del período de desarrollo sea tal que la demanda acumulada de agua no sufra modificaciones o incluso disminuya (Abdón y Meza, 2008). La precipitación es probablemente el principal recurso para la productividad de los cultivos y el elemento climático que va a condicionar en último término la respuesta de las especies vegetales. Es poco probable el desarrollo vegetal sin acceso oportuno y en las cantidades apropiadas al recurso hídrico. De esta forma, aun cuando se visualicen potenciales beneficios en las nuevas condiciones climáticas, si la oferta de agua (precipitaciones y riego) es restringida, el resultado será invariablemente negativo para los cultivos y por ende para la seguridad alimentaria (Abdón y Meza, 2008).

En Chile, la degradación de la tierra, la desertificación y la sequía son factores substantivos y que inciden directamente en la vulnerabilidad del país ante los impactos del cambio climático. Con respecto al grado de afectación de la desertificación en el país, se estima que un 64,2% de la superficie nacional se encuentra afectada en algún nivel, lo que representa 48.334.300 hectáreas del

territorio continental, con 8,3 millones de personas viviendo en áreas afectadas y 1,7 millones de personas que se encuentran afectadas directamente en algún grado de desertificación, degradación de la tierra y sequía (Emanuelli et al., 2015). Desde 1997-99 hasta la actualidad ha habido notorios avances en el estudio de la desertificación. El más reciente diagnóstico sobre desertificación en Chile fue realizado para la publicación del Programa de Acción Nacional de Lucha contra la Desertificación, la Degradación de las Tierras y la Sequía (PANCD Chile 2016-2030). En éste se examinó la amenaza de desertificación de los suelos del país. Respecto a la situación de desertificación en Chile, se considera que afecta a un 21,7% del territorio continental en alguna de sus categorías, ya sea leve, moderado o grave, lo cual corresponde a 16.379.342 hectáreas, con una población bajo riesgo de desertificación de 6.816.661 habitantes; es decir, un 37,9% de la población, distribuidas en 156 de las comunas del país. El riesgo de desertificación se estima considerando la aridez, la erosividad de la lluvia, la erodabilidad del suelo, la cubierta vegetal, más los incendios forestales y el factor socioeconómico.

### 2.3 Salinidad

La salinidad hace referencia a una elevada concentración de sales en el suelo, lo que perjudica el desarrollo y crecimiento de las plantas, principalmente debido a la toxicidad y disminución en el potencial osmótico del suelo. Frecuentemente se encuentran condiciones de salinidad originadas por NaCl, sin embargo, los suelos salinos suelen presentar distintas combinaciones de sales, siendo las más comunes las combinaciones de cloruros y sulfatos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (Jenks y Hasegawa, 2005).

Las altas concentraciones de sodio en los suelos no sólo perjudican las plantas directamente, sino también degradan la estructura del suelo, disminuyendo la porosidad y la permeabilidad del agua (Jenks y Hasegawa, 2005). Estos suelos, que se caracterizan por presentar propiedades físicas y químicas desfavorables para el crecimiento y desarrollo de los cultivos que en ellos se desarrollan, necesitan prácticas especiales para su mejoramiento y manejo (Mashali, 1999).

#### 2.3.1 Origen de la salinidad de los suelos

El origen de la salinidad en los suelos puede estar determinado por dos motivos, debido a procesos naturales, a la cercanía y la altura sobre el nivel del mar, la intemperización y la existencia de sales, las cuales son consideradas causas primarias, agudizándose en condiciones heterogéneas de topografía y las propiedades físico-químicas del perfil del suelo correspondientes a textura, estructura, porosidad, permeabilidad, capacidad de retención de humedad y al intercambio catiónico.

Debido a lo anterior es que, tanto en regiones áridas como semiáridas, esta situación es predominante, inclusive, en los climas trópicos seco y templado seco con mayores promedios de

precipitación anuales, pero con periodos secos prolongados, es posible la ocurrencia de procesos de salinización (Álvarez et al., 2008).

Adicional a los procesos naturales de salinización, la conversión a suelos salinos puede ser resultado de las incorrectas prácticas agrícolas del suelo y al manejo inadecuado del agua destinada a irrigación, lo que facilita la movilización de las sales dentro del suelo y el transporte de las mismas hacia sitios específicos. Dicho proceso es conocido por proceso de salinidad antrópica, debido a que su origen se radica en el desarrollo de la sociedad humana (Summer, 1993; Rozema, 1996; Mashali, 1999).

### 2.3.2 La salinidad, un problema para los cultivos

Las zonas de clima árido y semiárido suelen presentar suelos salinos, principalmente por la concentración de sales como consecuencia del desequilibrio en el balance hídrico del perfil del suelo, ya que la evapotranspiración es mayor a la precipitación en estas zonas climáticas. El agua del suelo es absorbida y transpirada por las plantas y a la vez se evapora directamente desde el suelo (evapotranspiración), sin embargo, las sales solubles que contiene el agua no se evaporan y se van concentrando en la superficie, llegando a formarse una película en la capa externa del suelo formada por costras de diferentes sales. Así, en las tierras áridas y semiáridas, donde la evapotranspiración es mayor que la precipitación, se generan suelos salinos de forma natural (Paniza-Cabrera, 2002). La alta salinidad en el suelo causa considerables pérdidas en el rendimiento en una amplia variedad de cultivos alrededor del mundo. La salinidad puede inhibir el crecimiento de la planta y reducir la productividad, principalmente por tres factores: el déficit hídrico, la toxicidad por iones y el desbalance nutricional (Munns, 2002). Dentro de los efectos más evidentes inducidos por un aumento en la salinidad, se puede evidenciar una reducción de la tasa de crecimiento a nivel generalizado, obteniendo hojas más pequeñas, menor estatura, y a veces menor número de hojas (Munns y Termaat, 1986; Jacoby, 1994). Adicionalmente, aumentos en la salinidad se pueden evidenciar a través de una disminución en las tasas de germinación y del desarrollo radicular (Ruíz-Carrasco et al., 2011).

El efecto inicial y primario de la salinidad, especialmente de bajas a moderadas concentraciones, se debe a sus efectos osmóticos (Munns y Termaat, 1986; Jacoby, 1994), mientras que los efectos a altas concentraciones se asocian principalmente a efectos iónicos (Munns, 2002). Otra respuesta fisiológica de las plantas a la salinidad se evidencia en la disminución de la conductancia estomática; de esta forma se reduce la transpiración evitando la sequía fisiológica para mantener la turgencia de las células (Bernstein, 1961; Porta et al. 1994; Salisbury y Ross, 2000).

El cierre de estomas reduce el ingreso de CO<sub>2</sub> inhibiendo la fotosíntesis, dando como resultado la reducción en la síntesis de fotosintatos. En general, la consecuencia es la disminución en la producción de biomasa, puede evidenciarse en estructuras como raíces, hojas, tallos y semillas, así como en atributos relacionados con el área foliar y la altura de las plantas (Bernstein, 1961; Porta et al., 1994; Salisbury y Ross, 2000).

### 2.3.5 Mecanismos de tolerancia a salinidad

A lo largo de la evolución, diferentes especies con valor comercial, han desarrollado mecanismos de tolerancia a diferentes estreses presentes en el medio, siendo los mecanismos de tolerancia a estrés salino algunos de ellos. Estos mecanismos se encuentran detallados a continuación:

#### a) Ajuste Osmótico:

La osmorregulación o ajuste osmótico, que llevan a cabo las plantas al crecer, en condiciones de salinidad, confiere a estas la capacidad de tolerar condiciones de escasez de agua y salinidad elevada, con la expresión de mecanismos adaptativos, que consisten en disminuir su potencial osmótico interno para compensar el potencial osmótico externo y, de esta manera, mantienen la actividad enzimática, evitan la disminución de la fotosíntesis, las alteraciones en la traslocación, la distribución de los fotoasimilados y las consecuentes pérdidas de rendimiento (Szabolcs, 1994).

Las plantas han desarrollado este mecanismo de ajuste osmótico que les permite mantener la absorción de agua y la presión de turgencia bajo condiciones de estrés. El ajuste osmótico está basado en la acumulación activa de solutos, utilizando tanto iones tales como Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> y sintetizando solutos orgánicos compatibles, como por ejemplo prolina, colina, glicina-betaína, betaína, polioles y azúcares solubles (Zhu, 2002). Sin embargo, la acumulación de iones no reviste gran importancia en la tolerancia por ajuste osmótico en algunos cultivos como es el caso del arroz, debido a que la tolerancia se asocia con la exclusión de Na<sup>+</sup> y a una mayor capacidad de absorción de K<sup>+</sup> (Kumar et al., 2009).

El estudio de los niveles de prolina en arroz durante la respuesta a estrés salino, ha sido uno de los mecanismos de osmorregulación más estudiados (Su y Wu, 2004). Existen suficientes referencias como para asegurar que la prolina libre se acumula en un rango bastante amplio de plantas expuestas a situaciones de estrés, tanto biótico como abiótico (Karimi et al., 2005) atribuyéndole determinado grado de tolerancia a las plantas que tienen mayor capacidad de síntesis de prolina al estar sometidas

a estrés salino (Chaman, 2007). En cuanto al papel que juega la prolina frente al estrés salino, se sugieren funciones que pueden estar mejorando el estado de la planta ante situaciones de esta índole.

Este aminoácido parece estar vinculado a diversos procesos, como, por ejemplo:

- 1) Es fuente de energía en la regulación de los potenciales redox.
- 2) Es protector de las funciones celulares mediante la captura de especies reactivas de oxígeno.
- 3) Es estabilizador de proteínas, membranas y estructuras subcelulares.
- 4) Actúa como compuesto de reserva y fuente de nitrógeno, importante para el crecimiento inmediato luego de un estrés.

5) Se observó que, bajo un sistema libre in vitro, cumple la función de aliviar los efectos del NaCl sobre la actividad enzimática de la RubisCO (Munns y Tester, 2008). Aun cuando el ajuste osmótico por la adopción de cualquiera de los mecanismos facilita a las plantas la toma de agua en condiciones de estrés salino, la magnitud de las pérdidas de rendimiento inducida por la sal no puede atribuirse a un solo factor. Diferentes factores fisiológicos, bioquímicos en diferentes etapas de las plantas pueden estar involucrados (Munns, 2002)

#### b) Homeostasis iónica

En un ambiente salino, siempre que el ingreso pasivo de Na<sup>+</sup> aumente su concentración en el citoplasma por encima de un valor crítico, se inicia el proceso homeostático de exclusión de Na<sup>+</sup> del citoplasma (Szabolcs, 1994). La homeostasis de las concentraciones iónicas intracelulares es fundamental para el normal desarrollo de las células. Se requiere una correcta regulación del flujo iónico para mantener una baja concentración de iones tóxicos y una óptima concentración de aquellos que son esenciales. Ante una situación de estrés salino, la regulación de la absorción de K<sup>+</sup> y la prevención de entrada de Na<sup>+</sup>, el flujo de Na<sup>+</sup> de la célula y la utilización de Na<sup>+</sup> para el ajuste osmótico, son estrategias comunes utilizadas por las plantas, lo cual permite mantener una óptima relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en el citosol (Munns y Tester, 2008) Para la homeostasis iónica se ha planteado la existencia de antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> en el plasmalema (SOS) y en el tonoplasto ("NHX") que utilizan gradientes de H<sup>+</sup> creados por las H<sup>+</sup>-ATPasas, tanto citoplasmáticas como vacuolares, y por la pirofosfatasa del tonoplasto, los cuales permiten intercambiar H<sup>+</sup> por Na<sup>+</sup>. En estudios realizados en plantas de arroz sometidas a condiciones de salinidad, se ha planteado que el gen "NHX1" del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de tonoplasto, es inducido por salinidad y por incremento de ABA lo que relaciona a este transportador con la tolerancia al estrés ocasionado (Shi et al., 2002). Entre los mecanismos descritos que confieren homeostasis iónica, se destaca la activación del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (SOS1), proteína involucrada en el eflujo de Na<sup>+</sup> de la membrana plasmática de células vegetales.

La presencia del antitransportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (SOS1), puede ser una alternativa que indique respuesta a salinidad en las plantas, ya que autores como Shi et al. (Shi et al., 2002) y Munns y Tester (Munns y Tester, 2008) indican que, en la interfase suelo-raíz, SOS1 pudiera actuar extrayendo el exceso de iones  $\text{Na}^+$  de las células epidérmicas de la raíz. Los análisis de la distribución de  $\text{Na}^+$  entre la raíz y los meristemas en mutantes SOS1 de *Arabidopsis thaliana* en diferentes condiciones salinas, indican que SOS1 también participa en la redistribución de sodio entre las raíces y los meristemas por una vía compleja (Munns, 2005; Shi et al., 2002). Según Shi et al. (Shi et al., 2008; Shi et al., 2000) el SOS 1 juega un papel importante en la tolerancia de las células del meristemo, como en el crecimiento de la punta de las raíces y en el ápice de los brotes ya que estas células no presentan vacuolas grandes para la compartimentación del  $\text{Na}^+$ .

Esta homeostasis intracelular es importante para la actividad de varias enzimas citosólicas, para mantener la potencial transmembrana y producir un apropiado contenido osmótico con el fin de regular el volumen celular (Munns y Tester, 2008; Parida y Das, 2005).

#### c) Desintoxicación de ROS

Las plantas emplean antioxidantes, tales como ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), carotenoides y enzimas detoxificantes, como por ejemplo superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT) y enzimas del ciclo del glutatión-ascorbato, con el fin de combatir el estrés oxidativo causado en condiciones salinas. Diversas señales de estrés abiótico convergen en cascadas de MAPK (del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase) regulando los sistemas de defensa antioxidantes (Parida y Das, 2005). Numerosos informes han demostrado el aumento de SOD, APX y GR en la respuesta al estrés salino (Vaidyanathan et al., 2003). Al respecto, algunos resultados han sido observados en cítricos, donde una peroxidasa y sus correspondientes genes son sobre expresados bajo condiciones de estrés salino (Ben-Hayyim et al., 2001), en el cultivo del arroz, donde se asocia una mayor expresión del sistema antioxidante en los cultivares tolerantes (Moradi e Ismail, 2007). De esta manera, estos sistemas antioxidantes confieren tolerancia a aquellos cultivares que en condiciones salinas tengan altos niveles en sus tejidos, tanto constitutivamente como inducidos por el estrés. Los resultados que aparecen en la bibliografía indican que el aumento de la resistencia al estrés salino parece estar asociado, al menos en parte, a la capacidad de las especies más tolerantes de supra-regular sistemas antioxidantes y así aliviar el daño oxidativo asociado (Mittova et al., 2002).

## 2.4 El cultivo de lechuga

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) pertenece a la familia Asteraceae y es probablemente originaria de Asia Menor. Su uso se remonta, por lo menos, a 500 años a.C., e incluso se han encontrado indicios de su uso en antiguos escritos de la cultura egipcia que datan del 4.500 A.C. (ODEPA, 2002)

Es la planta más importante entre las hortalizas de hojas que se consumen crudas. Desde el punto de vista alimenticio, posee un escaso valor nutritivo, con un alto porcentaje de agua; solamente presenta un aporte de fibra y de vitamina E en la dieta humana. Además de su utilización como alimento, es posible reconocer en ella otras propiedades, como por ejemplo antitusígeno, tranquilizante y somnífero, todas asociadas a los principios activos presentes, lactucina y lactupicrina (ODEPA, 2002).

Esta especie requiere para su desarrollo climas frescos y húmedos. En general es resistente a bajas temperaturas en sus primeras etapas de desarrollo, aunque cercano a la época de cosecha este factor puede producir daños que reducen la calidad del producto. Las altas temperaturas producen emisiones prematuras del tallo floral, quemaduras en las hojas y mermas en la calidad y presentación del producto final (ODEPA, 2002).

Las variedades se agrupan en tres grupos: de hoja o de amarra (variedad crispa); repolladas o de cabeza (variedad capitata) y romanas o costinas (variedad longifolia) (ODEPA, 2002).

Dentro del grupo de las hortalizas, la lechuga (*Lactuca sativa*) es una especie sensible a la salinidad, pero dicha sensibilidad varía dentro de la misma especie según la variedad que se considere. Los valores umbral para las especies de lechuga están en el rango de 1,0 a 1,4 dS m<sup>-1</sup> (0,6 a 0,9 g/l), y la pendiente para la disminución del rendimiento, desde 6,2% hasta 8% por dS m<sup>-1</sup> (Maas, 1986).

### 2.4.1. Situación nacional del cultivo

En Chile se cultivan aproximadamente 6847 hectáreas de lechugas anualmente (promedio años 2009 a 2014) con una concentración de la producción en la región metropolitana (2133 has, año 2016). Durante el año 2016 la superficie plantada fue de 6139 hectáreas y se estima una producción anual de 300 millones de unidades, equivalentes a alrededor de 75 mil toneladas, donde toda la producción tiene como destino el mercado nacional, (ODEPA, 2016).

La producción se concentra en la Región Metropolitana con un 46%, el 21% en la de Coquimbo y un 18% en la Región de Valparaíso (ODEPA, 2008).

#### 2.4.2 Variedades cultivadas en Chile

Se agrupan en cuatro grupos bastante definidos: a) lechuga de hojas o de amarra (*L. sativa* L. var. *capitata*), b) lechugas repolladas o de cabeza (*L. sativa* L. var. *crispa*), c) lechugas Cos o romanas (*L. sativa* L. var. *longifolia*), y d) lechugas de cortar (*L. sativa* L. var. *acephala*) (GIACONI y ESCAFF, 2001).

*Lactuca sativa* L. var. *crispa*: Corresponde a las lechugas que forman cabezas, mal llamadas escarolas en Chile. Forman numerosas hojas de borde irregularmente recortado (crespo). Las hojas externas se disponen abiertamente y las más nuevas e internas forman un cogollo o grumo central compacto, llamado cabeza. Las lechugas de este tipo son de mayor tamaño, y pueden llegar a pesar más de 1 kg, presenta un período de siembra a cosecha largo (más de 100 días). Es la variedad que más se utiliza en Estados Unidos y en muchos países, por esa razón existe una amplia disponibilidad de cultivares, siendo los más representativos Climax, Empire, Great Lakes 659, Great Lakes 118, Merit, Mesa 659, Minetto, Salinas y Vanguard.

*Lactuca sativa* L. var. *capitata*: Corresponde a las lechugas conocidas como de amarra, dónde se encuentran las lechugas mantecosas o españolas. Se caracterizan por presentar hojas lisas, orbiculares, anchas, sinuosas y de textura suave o mantecosa; además las hojas más internas forman un cogollo amarillento al envolver las más nuevas. Dentro de esta variedad se encuentran cultivares de menor tamaño de planta y de ciclo vegetativo más corto (55 a 70 días) que las otras variedades, por lo que en algunos países son los más usados para la producción en invernadero. La mayoría de los cultivares más tradicionales utilizados en Chile pertenecen a esta variedad botánica, por ejemplo, Milanese, francesa, Maravilla de Cuatro Estaciones, Reina de Mayo, Trocadero y White Boston.

*Lactuca sativa* L. var. *longifolia*: A este grupo pertenecen las lechugas romanas o cos, conocidas en Chile como costinas. La planta se caracteriza por desarrollar hojas grandes y erguidas, de 20 a 30 cm de largo y 6 a 10 cm de ancho, con nervadura prominente, superficie ligeramente ondulada, y con borde irregularmente denticulado. Presentan un tallo largo y forman una cabeza cónica o cilíndrica, por su disposición erecta, pueden alcanzar un peso de hasta 2 kg. Los cultivares más conocidos son 8 Conconina, Corsica, Costina Abarca, Parris Island, Romabella, Odessa y Oreja de Mulo. *Lactuca sativa* L. var. *acephala*: Corresponde a las lechugas de cortar o de hojas sueltas ("loose leaf"), se caracteriza por no formar cogollo, sino que sus hojas se presentan sueltas, no envolventes. Se

encuentran principalmente en huertas caseras, ya que sus hojas se pueden ir cosechando individualmente, aunque igual se comercializan enteras. Los cultivares más tradicionales son Grand Rapids, Lollo Rossa, Salad Bowl, Simpson y Red Sails. Su uso no es muy frecuente en Chile, aunque se produce su semilla para exportación (Krarup y Moreira, 1998).

## 2.5. Microorganismos antárticos

El continente antártico presenta condiciones naturales extremas, es aquí donde viven diversos microorganismos (e.g., hongos y bacterias) que han demostrado proporcionar beneficios a la vegetación expuesta bajo condiciones propias del continente como baja disponibilidad de nutrientes, escasez de agua, bajas temperaturas y salinidad (Upson et al., 2009). Por lo tanto, los microorganismos antárticos asociados a las raíces podrían ser una estrategia muy útil para las plantas frente al estrés salino presente en ambientes áridos o en condiciones sequía (Fardella et al., 2014).

De acuerdo con un estudio realizado por Molina-Montenegro (Molina-Montenegro et al., 2016), mostraron que las inoculaciones con microorganismos aislados de plantas antárticas mejoraron el rendimiento ecofisiológico y el rendimiento de la biomasa vegetal en lechuga (*Lactuca sativa*), bajo riego normal y reducido. En adición, las lechugas sometidas a déficit hídrico disminuyeron su rendimiento ecofisiológico, por tanto, la reducción de su acumulación de biomasa fresca. Sin embargo, la presencia de microorganismos en las raíces permite mantener una alta capacidad fotosintética y aumento en biomasa fresca, incluso en condiciones de déficit hídrico, posiblemente debido a la mejora de la eficiencia del uso del agua y de mecanismos osmoprotectores, presentes en estos individuos.

Resultados similares se han encontrado en otros estudios. Por ejemplo, Basahi et al. (2014) informaron que la fotosíntesis, la tasa de transpiración y la conductancia estomática en individuos de lechuga se redujeron significativamente en respuesta a la reducción en la disponibilidad de agua. Además, Karam et al. (2002) mostraron que los diferentes cultivares de lechuga presentan un menor número de hojas y una caída de 39% en biomasa fresca, provocada por el déficit hídrico.

### 2.5.1 Uso de microorganismos antárticos como alternativa para enfrentar el estrés salino

Varios son los estudios que sugieren a los microorganismos (e.g., hongos y bacterias) como una estrategia alternativa para enfrentar los efectos del cambio climático, principalmente el déficit hídrico y estrés salino (véase Thom et al. 2012; Coleman-Derr y Tringe 2014), pero esto rara vez se ha probado experimentalmente (Molina-Montenegro et al., 2016)

No obstante, los esfuerzos científicos por encontrar nuevos y más eficientes microorganismos han ido más allá de los suelos cultivables. De esta manera, la búsqueda se ha concentrado en aquellos lugares críticos para el desarrollo de la vida, donde la selección natural ha determinado que diversos microorganismos faciliten la supervivencia de plantas vasculares en ambientes con un alto grado de estrés abiótico, los microorganismos han demostrado conferir tolerancia a la sequía en muchos cultivos por mecanismos morfológicos y bioquímicos, tales como una mayor eficiencia del uso del agua y una mayor tasa fotosintética (Swarthout et al., 2009).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Aislamiento e identificación de hongos radiculares**

Se extrajo una muestra correspondiente a 25 raíces frescas de la especie vegetal *Deschampsia antarctica* (*Poaceae*), colectadas desde una porción de suelo (250g) localizadas en King George Island, ubicadas en el continente antártico, durante la temporada de crecimiento (verano).

Las raíces fueron segmentadas y almacenadas en bolsas plásticas a una temperatura de 10°C. Posteriormente fueron esterilizadas superficialmente en inmersiones sucesivas de etanol al 70% (1 min) y 2% de hipoclorito de sodio (3 min) seguido de un lavado con agua destilada. Luego de ello, los fragmentos fueron puestos en placas Petri con agar de dextrosa de papa (PDA) más cloranfenicol a una concentración de 100 g/mL. Posterior a ello, las placas Petri fueron incubadas por 6 días a 18°C.

Las raíces fueron observadas bajo un microscopio de disección, y al evidenciarse la emergencia de los hongos, fueron transferidos sobre PDA. En el momento en que se presenciaron hifas, creciendo fuera de las raíces, se hizo una re-inoculación en nuevas placas con medio fresco. Estos aislados fueron mantenidos en subcultivos de esporas simples. Finalmente, las colonias individuales formadas fueron almacenadas a 4°C hasta su utilización en los experimentos de campo.

Los aislados correspondieron a las especies *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium brevicompactum* (Molina-Montenegro et al., 2016)

### **3.2 Aislamiento e identificación de bacterias radiculares**

Se colectó una muestra de suelo (partículas  $\leq 2$  mm) firmemente adheridas a las raíces (suelo rizosférico) y se separó cuidadosamente de las raíces para ser usado para el cultivo bacteriano. Se diluyó un gramo de suelo rizosférico en 10 ml de solución fisiológica estéril. Esta solución se diluyó en serie por 10 veces y se sembró por triplicado sobre Luria Bertani (LB) y medio agar (R2A) (Oxoid) y se incubó a 4 ° C durante 7 días. Las colonias presentes en medios sólidos se purificaron mediante placas repetidas para obtener colonias individuales (Ørskov 1922). Posteriormente, las cepas purificadas se cultivaron a 4 ° C como condición selectiva para evaluar su tolerancia a la sal. Las cepas puras se congelaron en un 25% de glicerol a -80 ° C para una posterior identificación molecular.

Las células de la rizobacteria se resuspendieron en 50  $\mu$ l de TE estéril (Tris / HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM) en tubos de 1,5 ml y se incubaron a 100 ° C durante 8 min. Después se centrifugaron a 13000 g por 10 min, el sobrenadante que contenía el ADN liberado se almacenó a -20 ° C y se usó como plantilla para la amplificación por PCR. El protocolo de PCR comenzó con un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94 ° C seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 30 s, recocido a 55 ° C durante 1 minuto y extensión a 72 ° C durante 1 min. El protocolo se concluyó con una extensión final adicional de 5 min a 72 ° C). La identificación filogenética de los aislados se realizó por secuenciación parcial del gen 16S rRNA obtenido usando los cebadores universales 27F y 1492R (Brosius et al., 1978). El tamaño de los amplicones varió de 1.2 a 1.4 Kb. Los productos de PCR se controlaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se secuenciaron en ambos sentidos.

Las secuencias de cada cepa se analizaron con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, base de datos nucleotide collection nr / nt) utilizando Megablast para determinar el porcentaje de identidad máxima, el vecino más cercano con las secuencias disponibles en la base de datos global. Las accesiones de las secuencias se depositaron en la base de datos de GenBank (Fig. 3.2).

Strain Code	Genbank accession	Nearest Neighbor	16S rRNA similarity (%)	Maximum NaCl tolerance (%)
Da1	KX268492	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	5
Da2	KX268493	<i>Planococcus</i> sp.	99	5
Da3	KX268494	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	5
Da4	KX268497	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	5

Fig. 3.2 Clasificación de especies bacterianas del ensayo, fuente: genbank.com

### 3.3 Montaje del experimento

Para este ensayo se sembraron semillas de lechuga (var. Romana) en bandejas de almácigos (speedlings) durante el mes de abril del año 2017. Posterior a esto, las bandejas fueron ubicadas en un invernadero en condiciones de control ambiental (invernaderos de la Universidad de Talca, Talca, Chile) (Fig.3.3)



Fig.3.3 Ubicación del invernadero, Universidad de Talca (Fuente: Google Earth)

Luego de dos a tres semanas posteriores a la germinación y una vez evidenciado el desarrollo de las plántulas, estas fueron trasplantadas en macetas individuales de 500 cc, usando como sustrato, tierra de transplante esterilizada (turba y perlita) y arena.

Tras un mes de desarrollo, se escogieron 100 plantas de lechuga, las que fueron divididas en cuatro tratamientos (25 plantas por cada tratamiento) de la siguiente forma: (i) Control (sólo agua) (ii) Agua + inoculación de microorganismos, (iii) Sal (200 mM) sin inoculación de microorganismos y (iv) Sal (200 m M + inoculación de microorganismos). La inoculación con hongos se realizó con un concentrado de esporas (5000 esporas/g) junto con una mezcla bacterial de esporas, aislados en laboratorios de la Universidad de Talca. La inoculación fue repetida tres veces para asegurar la asociación fúngica y bacterial en los plantines de lechuga (Fig 3.4)



Fig. 3.4 Inoculación de microorganismos en lechuga.

Las plantas fueron regadas de forma homogénea a través de un sistema de aspersión manual, diariamente o bien cuando el cultivo lo requería. El sustrato utilizado fue una mezcla de arena, perlita y turba en una relación de 1:1:1, lo que permitió un buen drenaje y buena retención de humedad. La fertilización fue realizada con aplicaciones foliares del fertilizante “Fostrogen”, además de adiciones de nitrógeno amoniacal (urea) cada 14 días. El desarrollo del cultivo comprendió un tiempo aproximado de 3 meses.

### 3.4 Mediciones

Se midió biomasa fresca, eficiencia fotoquímica, contenido de prolina, peroxidación lipídica y expresión del gen NHX1, medidas sobre hojas de *L. sativa* visualmente sanas en 25 individuos correspondientes a cada tratamiento. Las mediciones fueron hechas sobre el mismo individuo a los 30, 45 y 60 días. Al final del período experimental, se muestrearon individualmente lechugas, de cada tratamiento, extrayéndolas de forma completa desde el suelo sin dañar el sistema de raíces.

Después, las raíces fueron lavadas sin remover tallos ni hojas y se dejaron secar por 1 hr a la sombra. La biomasa fresca total de ambos, raíces y hojas de cada individuo fueron pesadas en una balanza digital electrónica (Boeco BBL-52; 0,01 gr- precisión).

#### 3.4.1 Eficiencia fotoquímica

Las curvas de respuesta de la tasa de fotosíntesis neta a la luz (o curvas de saturación de luz) proporcionan mucha información sobre el funcionamiento fotosintético de las hojas. En dichas curvas (se utiliza comúnmente, como medida de luz incidente, la densidad de flujo fotónico fotosintético (PPFD), o radiación fotosintéticamente activa, (PAR), que corresponde al flujo de fotones o cuanta con longitudes de onda efectivas para la fotosíntesis (dentro del intervalo 400-700 nm del espectro de radiación solar que incide sobre la hoja. Los valores máximos de PAR que se pueden medir en un día soleado en latitudes medias oscilan entre 2000 y 2300  $\mu$  mol de fotones  $\cdot$  m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup> (Azcon-Bieto y Talon, 2013)

#### 3.4.2 Peroxidación Lipídica

Todas las células están rodeadas por una membrana que las separa del medio extracelular. La membrana celular contiene proteínas que juegan papeles vitales en la interacción de la célula con otras células, hormonas y agentes reguladores del líquido extracelular. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva (Goodam, 1998). Éstas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y por lo tanto vulnerables al ataque de radicales libres que traen como consecuencia la peroxidación lipídica. Esta es generalmente inducida por un radical hidroxilo que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado, lo que genera una cadena de reacciones oxidativas.

En las plantas sometidas a estrés salino, se incrementa la producción de especies químicas activas de oxígeno (EAO), debido a la alteración en la transferencia de electrones durante los procesos de fotosíntesis y respiración (Silveira et al., 2005; Ab-dul et al., 2009), lo que provoca procesos degenerativos de biomoléculas, tales como peroxidación de lípidos (Shalata y Tal, 1998; Silveira et al., 2005), oxidación de aminoácidos y fragmentación de proteínas (Bartels y Sunkar, 2005), inhibición de actividad enzimática (Gueta-Dahan et al., 1997), y daños estructurales en ácidos nucleicos (Sairam y Tyagi, 2004).

Se extrajeron 500 mg de tejido fresco de hojas de lechuga y se homogeneizaron con 2 ml de TCA (1%) y se centrifugó a 10 000 revoluciones, durante 5 minutos. Se mezclaron 250 ml del sobrenadante con 1 ml de TBA (0,5%) en TCA (20%). Las mezclas se incubaron en agua hirviendo durante 30 min, y

luego se enfriaron a temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a 532 nm y la absorbancia no específica a 600 nm (Hodges et al., 1999). El contenido de MDA (malodialdehído) se determinó por su coeficiente de extinción molar de 155 mM<sup>-1</sup> cm

### 3.4.3 Prolina

Este aminoácido es uno de los más estables en condiciones de sequía, el menos inhibitorio del crecimiento celular y posee una naturaleza altamente higroscópica. Además, juega un papel fundamental en el ajuste osmótico ( $\Psi_s$ ), funciona como soluto osmoprotector del citoplasma, provee estabilidad a los coloides, y es una fuente de nitrógeno en condiciones de sequía (Andrade et al.1995; Nolte et al.1997).

La concentración de prolina tisular se determinó en plantas de lechuga en todos los tratamientos siguiendo el método de Bate con ligeras modificaciones. Aproximadamente 100 mg de hojas congeladas, en nitrógeno líquido, se trituraron en 1,2 ml de ácido sulfosalicílico al 3% y el homogenado se centrifugó a 16,000 revoluciones a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadió una alícuota del sobrenadante (1 ml) a 2 ml de reactivo de ninhidrina [2,5% de ninhidrina en ácido acético glacial-agua destilada-85% de ácido ortofosfórico (6: 3: 1)]. Las mezclas de reacción se mantuvieron en un baño de agua a 90 ° C durante 1 h para desarrollar el color. Los tubos de ensayo se enfriaron luego en un baño de hielo y se añadieron 2 ml de tolueno para separar el cromóforo. La absorbancia de la fase de tolueno se leyó en un espectrofotómetro a 525 nm, y la concentración de prolina se calculó comparando las absorbancias de muestra con la curva de prolina estándar.

### 3.4.4 Expresión del gen “NHX1”

El gen “AtNHX1” es responsable de codificar el antiportador vacuolar más abundante de Na<sup>+</sup>/ H<sup>+</sup> y de regular el transporte de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> en la vacuola (Apse et al. 1999; Zhan y Blumwald, 2001).

En la sobreexpresión constitutiva de “AtNHX1” y en homólogos de otras plantas se ha demostrado que confiere tolerancia a la sal en una variedad de especies de plantas como resultado del aumento de iones de sodio secuestrados en la vacuola (Yamaguchi et al. 2005). La importancia del gen “AtNHX1” para la tolerancia al estrés salino se demostró aún más cuando el ADN-T de plantas mutantes insectivas que carecen de un antiportador de nhx1 funcional, mostraron ser más sensibles a la sal que Arabidopsis de tipo salvaje (Apse et al. 2003). Además, se encontró que los mutantes

“NHX1” exhiben un fenotipo alterado bajo condiciones normales de crecimiento, incluidas las células más pequeñas, hojas más pequeñas y otras irregularidades del desarrollo asociado con la homeostasis de  $K^+$  alterada, provocada por la falta de “AtNHX1”. Estos resultados sugieren que “AtNHX1” se asocia con otros procesos celulares que no están necesariamente relacionados con la tolerancia a la sal.

Un estudio (Sottosanto et al, 1993) también sugirió que “AtNHX1” es importante para la expresión de varios procesos celulares, incluidos los componentes de la estructura celular, procesamiento y tráfico de proteínas, y balance de energía, aunque “AtNHX1” no apareció notoriamente, afecta la expresión de muchos otros transportadores.

#### 3.4.5 Biomasa Fresca

El cálculo de la biomasa, definida como la cantidad de materia vegetal presente en una determinada superficie y en un momento concreto, resulta una buena aproximación para determinar y evaluar el nivel de producción de las plantas. Su determinación suele realizarse sobre la parte aérea de la vegetación, dada la dificultad de acceder a la materia enterrada y, en el caso de este tipo de estudios, debido al bajo interés que la fracción enterrada supone para la explotación ganadera (Gómez, 2008). Para el caso de este experimento se midieron hojas y raíces.

#### 3.5 Mecanismos de protección

En orden de evaluar si la presencia de microorganismos radiculares antárticos regularon algunos parámetros relacionados con mecanismos potenciales que participan en la tolerancia al estrés salino, se midió: el daño celular por degradación oxidativa de lípidos (peroxidación lipídica) y niveles de prolina. La peroxidación lipídica es considerada como un indicador de daño celular, y se estima midiendo la concentración de malondialdehído (MDA) a través del ensayo de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Egert and Tevini, 2002), mientras que las concentraciones elevadas de prolina en el tejido vegetal se relacionan a una respuesta frente al estrés osmótico.

Para cada tratamiento se muestrearon 15 plantas de lechuga (hubo pérdidas en la población inicial, principalmente por patógenos de carácter fúngico) y fueron analizadas en 3 tiempos (T0= 30 días; T1= 45 días y T2= 60 días). De cada plántula se extrajeron muestras de tejido fresco (0,5 g), las cuales fueron congeladas y mantenidas en un freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior preparación y envío para los análisis en los laboratorios de la Universidad de Concepción.

### 3.6 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA). El efecto de la inoculación endófitas y el estrés salino sobre las características de las plantas de lechuga se evaluó mediante medidas repetidas (rm) ANOVA en aquellas variables medidas a lo largo del tiempo (acumulación de prolina, peroxidación de lípidos [TBARS], expresión génica “NHX1” y eficiencia fotoquímica [Fv / Fm]). El ajuste del modelo mixto no paramétrico se realizó con la función lme en el paquete R de nlme utilizando el individuo anidado en el tiempo como la estructura de error aleatorio. (Pinheiro et al. 2017). Las comparaciones a posteriori para los modelos mixtos entre los grupos experimentales se realizaron mediante la comparación de sus medias marginales estimadas (EMM), según lo confirmado por la función de pares en el paquete R de emmeans (Lenth 2018). Las diferencias en la biomasa fresca final se analizaron mediante ANOVA estándar bidireccionales independientes para cada tipo de tejido (raíz, hoja o el individuo completo). Utilizamos la presencia de microorganismos (con: M+ o sin: M-) y el estado de estrés (sin estrés: control, estrés salino: estrés) como variables explicativas. Cuando se obtuvieron resultados significativos, las diferencias a posteriori entre los grupos experimentales se analizaron mediante la prueba de Tukey Diferencias Significativas Honestas (HSD).

## **4. RESULTADOS**

### 4.1 Efectos fisiológicos del estrés salino

La eficiencia fotoquímica, medida como Fv / Fm, mostró la tendencia esperada entre las plantas bajo estrés salino en individuos M- y M +; esto es, su rendimiento fotosintético a lo largo del tiempo pareció verse afectado negativamente si se compara con individuos de control sin adición de sal (Fig. 4.1a). Sin embargo, como se pudo observar entre individuos estresados en los días 45 y 60, la presencia de microorganismos mejoró significativamente el impacto negativo del estrés salino, manteniendo los valores Fv / Fm por encima de 0,7. De hecho, pareció estabilizar su deterioro a lo largo del tiempo (Fig.4.1a). Por el contrario, entre los individuos no inoculados bajo estrés, los valores de Fv / Fm continuaron descendiendo en el día 60 si se comparan con su rendimiento en el día 45 (Fig. 4.1a). Curiosamente, entre las plantas sin estrés salino, la presencia de microorganismos mejora significativamente sus valores de Fv / Fm; para el día 45, los individuos con M+ eran 3.8% más eficientes en su desempeño fotoquímico que las plantas M-, y esta diferencia se mantuvo en el tiempo (Fig.4.1a).

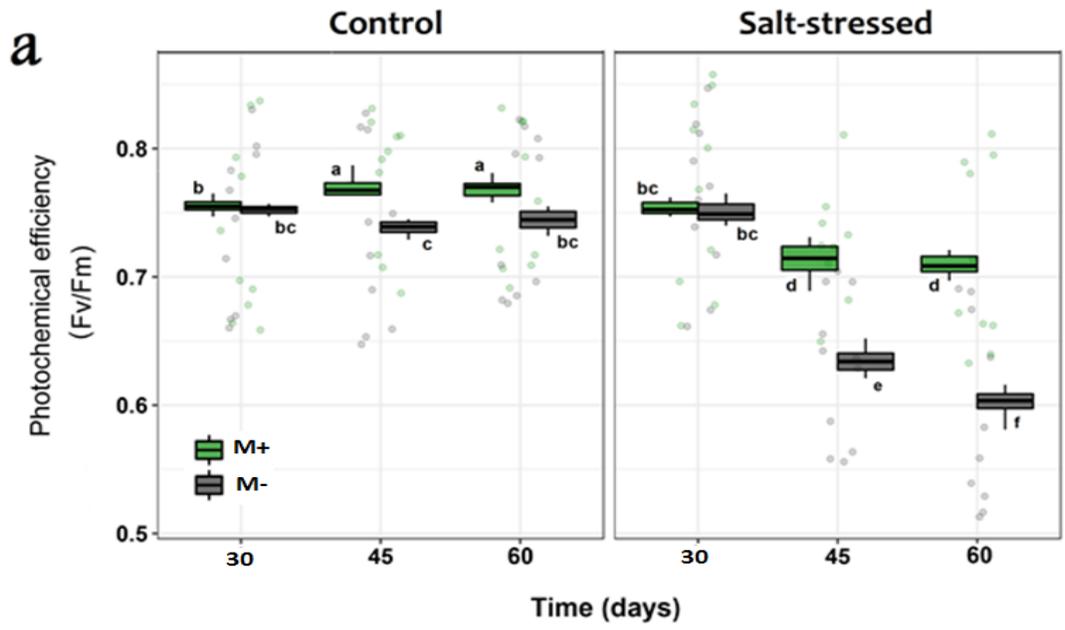


Figura 4.1a Eficiencia fotoquímica en condiciones de control y estrés salino, con y sin microorganismos.

Por otro lado, como un proxy de la peroxidación lipídica de la membrana, la cantidad de TBARS describe el estado de estrés entre las plantas experimentales a nivel celular. En este caso, mostró un aumento sustancial para las plantas M+ y M- en condiciones de estrés salino, sin embargo, entre los individuos M+ este aumento fue menos de la mitad de lo que se observó para sus homólogos M- (Fig.4.1b).

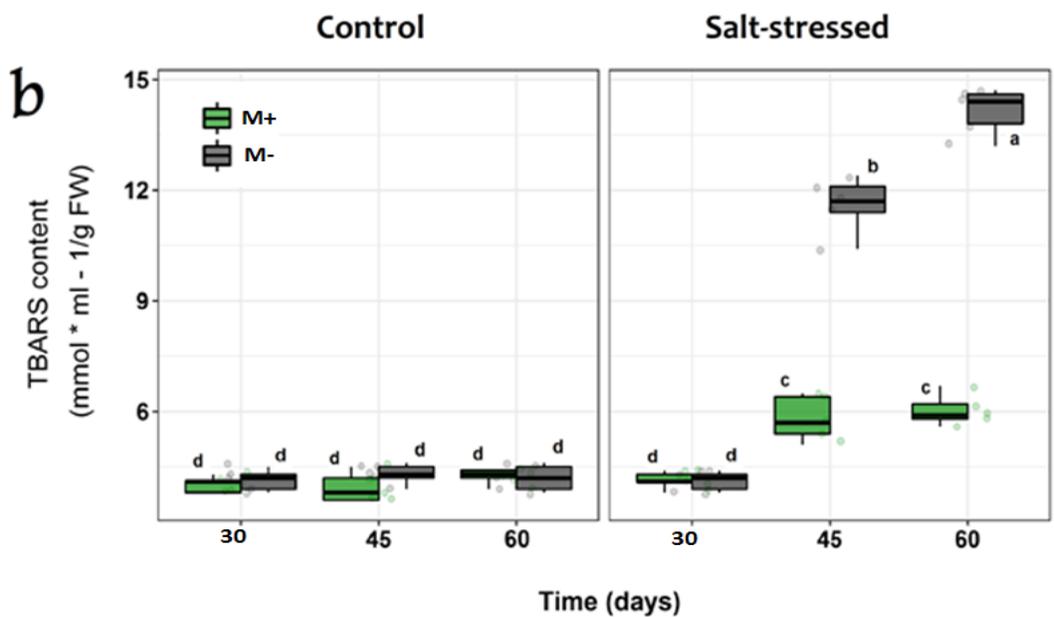


Fig 4.1b Peroxidación lipídica en condiciones de control y estrés salino, con y sin microorganismos.

#### 4.2 Mecanismos de tolerancia al estrés salino

Como un regulador osmótico, la concentración de prolina aumentó significativamente después de 45 y 60 días en individuos estresados por la sal en comparación con las plantas no estresadas (Fig.4.2a). Sin embargo, mientras los individuos M- bajo estrés salino mostraron un aumento en la concentración de prolina de 32 y 48% a los 45 y 60 días, respectivamente; para las plantas inoculadas con microorganismos (M+), este aumento alcanza un 96 y 98% durante el mismo período (Fig.4.2a). Como se esperaba, entre individuos sin adición de sal se observó que las concentraciones medias de prolina eran independientes del tiempo o la presencia de microorganismos. Además, descrita como una respuesta genética al estrés salino (Khan et al., 2013), la expresión relativa de “NHX1” mostró mayores cambios en el tiempo entre individuos estresados por sal, si se compara con plantas M- y M+ no estresadas. Además, bajo estrés salino este aumento pareció estar relacionado con la presencia de las asociaciones de microorganismos ya que en el día 45 el aumento de expresión relativa de “NHX1” con respecto al valor inicial (día 0) fue 32.2% para M- pero 58.6% para plantas M+, tendencia que se mantuvo el día 60 (Fig.4.2b). Curiosamente, la presencia de microorganismos también cambia la expresión relativa de “NHX1” en condiciones no estresadas, a pesar de que se observó un aumento significativo (8,5%) en el día 45 entre las plantas M+, contrario a la expresión de “NHX1” de individuos M-, que no presenta cambios a lo largo del tiempo (Fig.4.2b).

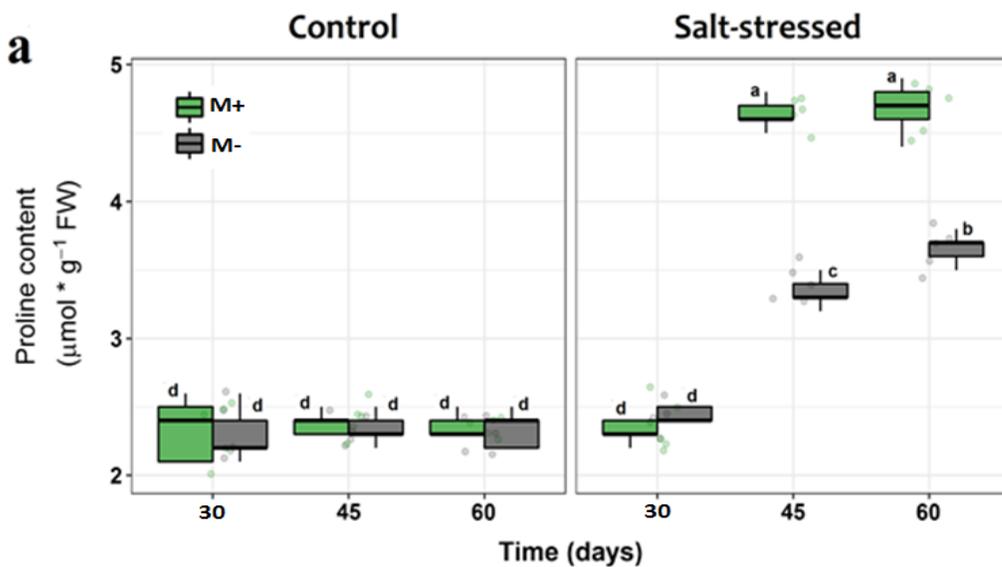


Fig 4.2a Contenido de prolina en condiciones de control y estrés salino, con y sin microorganismos.

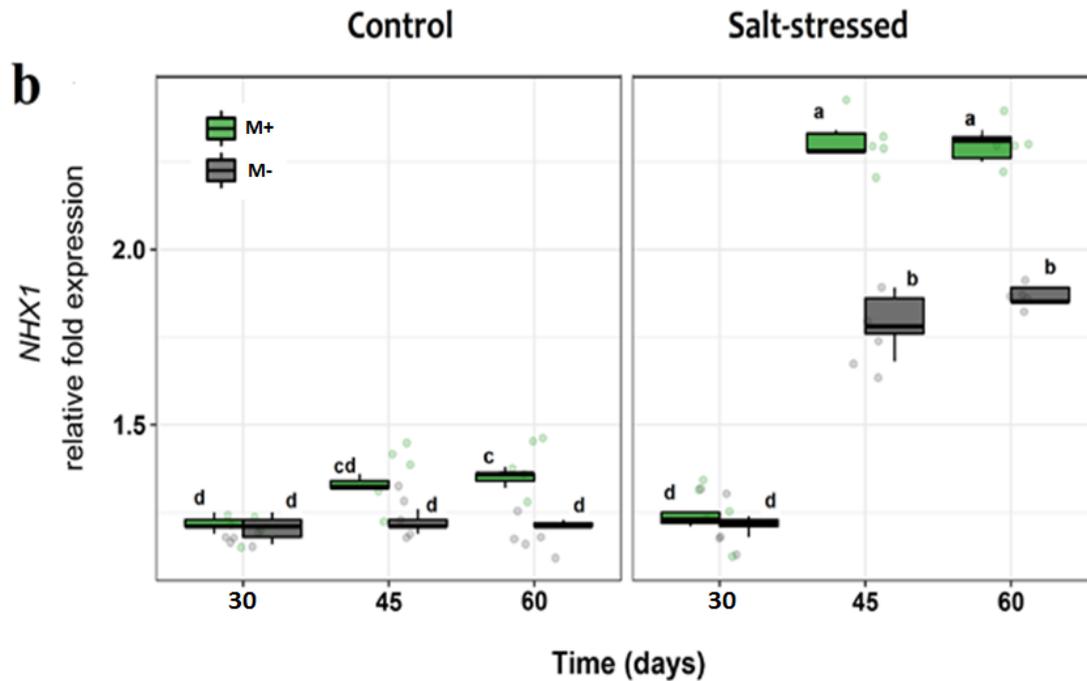


Fig.4.2b Expresión del gen "NHX1" en condiciones de control y estrés salino, con y sin microorganismos.

#### 4.3 Impacto en la productividad

El ANOVA de dos vías sobre los valores finales de biomasa fresca mostró un impacto negativo general en las condiciones de crecimiento salino sobre la productividad (factor sal-estrés:  $df = 1,49$ ;  $F = 5,502$ ;  $p = 0,023$ ); sin embargo, la importancia del término de interacción ANOVA (es decir, microorganismos x sal-estrés:  $df = 1,49$ ;  $F = 4,981$ ;  $p = 0,031$ ) sugiere que este efecto negativo depende del estado de infección de los microorganismos. En este sentido, la reducción de la biomasa de la raíz sólo se observó entre los individuos M-, como se pudo observar en los resultados a posteriori HSD-Tukey. De hecho, para las plantas de lechuga bajo estrés salino, la ausencia de microorganismos mostró una disminución del 37.7% en el peso de la biomasa fresca de las raíces respecto a las plantas no estresadas, una tendencia que también se observó en la biomasa aérea con un 30.7% en plantas bajo estrés salino, y consecuentemente entre el individuo completo (Fig.4.3). Curiosamente, el ANOVA bidireccional para los tejidos de hojas y para todo el individuo, a pesar de mostrar valores significativos de  $p$  para "Microorganismos" y "Estrés salino" como términos separados, no presentó un término de interacción significativo "Microorganismos x Estrés salino" (hojas:  $df = 1,49$ ;  $F = 1,777$ ;  $p = 0,118$ ; planta entera:  $df = 1,49$ ;  $F = 3,047$ ;  $p = 0,0871$ ). Esto sugiere un papel de ambos factores en los resultados observados, sin embargo, con una aparente independencia entre ellos. A

pesar de esto, las diferencias significativas a-posteriori en cualquiera de las variables de biomasa sólo se pudieron observar entre plantas M- estresadas y no estresadas (Fig.4.3). Por el contrario, entre plantas de lechugas M+ estresadas por sal y no estresadas, no encontramos ninguna evidencia estadística de diferencias entre el peso fresco medio de los tejidos de raíz u hojas, ni para el individuo completo.

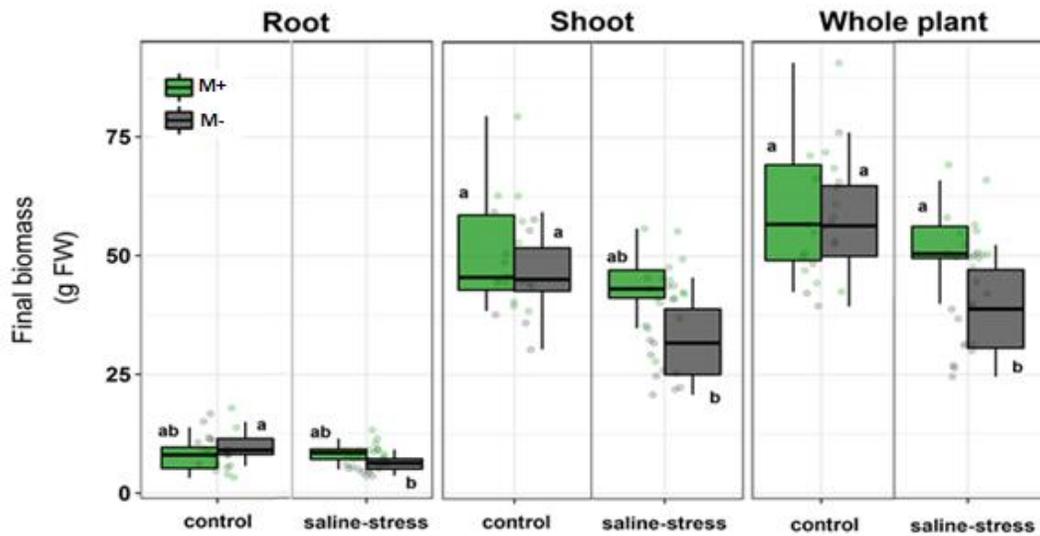


Fig.4.3 Biomasa en peso fresco para diferentes zonas de la planta: raíz, hoja y planta completa.

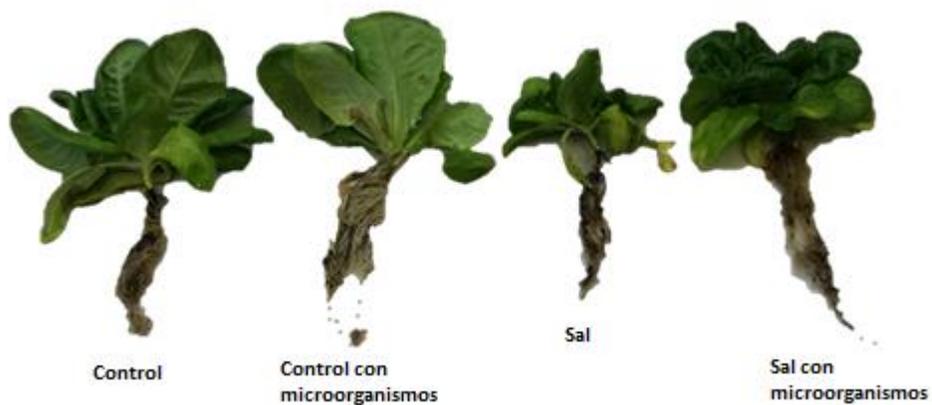


Fig.5 Plantas de lechuga bajo los distintos tratamientos

## 5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos después de la inoculación de plantas de lechuga con una mezcla de microorganismos en nuestros experimentos, muestran una diferencia significativa en el tamaño del individuo inoculado frente a individuos no inoculados bajo tratamiento con sal (Fig.5). Complementariamente, la eficiencia fotoquímica fue mayor en los individuos inoculados que en los no inoculados, incluso en individuos inoculados en condiciones de control (Fig.4.1a). Otros estudios han informado una reducción de la fotosíntesis y la ganancia de biomasa en plantas de lechuga bajo estrés hídrico (Bashai et al., 2014; Karam et al., 2002). En este sentido, nuestros resultados muestran un efecto positivo en la biomasa y la eficiencia fotoquímica, cuando están presentes las rizobacterias tolerantes a la salinidad y hongos endófitos.

Varios estudios han demostrado que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (su sigla en inglés PGPR) mejoran efectivamente el crecimiento de varios cultivos agrícolas bajo condiciones de estrés por salinidad (Kim et al., 2014; Kaushal y Wani, 2016; Orhan, 2016; Qin et al., 2016; Singh y Jha, 2016; Etesami, 2018). Se ha predicho o se ha demostrado que los mecanismos mediante los cuales mejoran el crecimiento incluyen la acumulación de osmolitos tales como aminoácidos y sus derivados (por ejemplo, glutamato, prolina, péptidos y aminoácidos N-acetilados). En nuestro trabajo, el contenido de prolina aumenta drásticamente en individuos inoculados bajo tratamiento con sal. La acumulación de prolina en plantas no inoculadas bajo tratamiento con sal, sin embargo, es menor y muestra un efecto directo de microorganismos en su producción. Se proponen varias funciones para la acumulación de prolina en tejidos expuestos a condiciones ambientales adversas: estabilización de membranas evitando la filtración de electrolitos (Shahid et al., 2014), manteniendo la turgencia celular y el equilibrio osmótico (Ben Ahmed et al., 2011) y antioxidantes (Hayat et al., 2012). En nuestro ensayo, las plantas inoculadas mostraron mayor tamaño que las plantas no inoculadas bajo estrés salino, tal vez debido a una disminución en los efectos del estrés oxidativo que impone a los iones durante el estrés salino, esto es consistente con las medidas de TBARS en las plantas inoculadas. La peroxidación lipídica medida como TBARS en plantas bajo tratamiento salino en nuestro trabajo, mostró un aumento de casi tres veces respecto a individuos inoculados bajo tratamiento salino apoyando el papel de la prolina en la estabilización de membranas bajo estrés salino y disminución del efecto de los efectos oxidativos del estrés salino.

Varias funciones se han asociado con antiportadores "NHX1", que incluyen homeostasis de pH,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Leidi et al., 2010; Bassil y Blumwald, 2014), expansión celular (Apse y col., 2003), tolerancia a la sal (Hernandez et al. 2009, Bassil y Blumwald, 2014) y, muy recientemente, la organización de microtúbulos y el crecimiento direccional de las raíces (McCubbin et al., 2014). Un modo generalmente aceptado de operación de "NHX1" da como resultado el transporte de  $\text{K}^+$  o  $\text{Na}^+$  a la vacuola o endosoma a cambio de eflujo de  $\text{H}^+$  al citosol (Bassil y Blumwald, 2014), que también contribuye a la

absorción de  $K^+$ , capturando  $K^+$  en vacuolas para almacenamiento celular, generación de turgencia y regulación de pH.  $K^+$  y, en algunos casos,  $Na^+$  evitando así las relaciones tóxicas de  $Na^+ -K^+$  en el citosol mientras se acumulan solutos para el equilibrio osmótico. Por lo tanto,  $K^+$  podría tener un importante papel osmótico en las células vegetales, y la acumulación vacuolar de este elemento es una característica especialmente crucial para las plantas bajo estrés osmótico (Jiang et al., 2010). Por ejemplo, el PGPR *B. subtilis* también puede disminuir la absorción de cantidades excesivas de  $Na^+$  por las raíces de las plantas mediante la regulación negativa de la expresión del transportador  $K^+$  de alta afinidad (HKT1) en las raíces de las plantas afectadas por la salinidad (Zhang et al., 2008; Qin et al., 2016). Además, estos PGPR facilitan la recirculación de  $Na^+$  de la raíz desencadenando la inducción de “HKT1” en los brotes (Zhang et al., 2008). El efecto de los endófitos fúngicos se ha demostrado en otros modelos y con otras especies de hongos endófitos. *Piriformospora indica* es un endofito fúngico aislado de suelo desértico de la India, capaz de colonizar raíces de cebada, maíz y Arabidopsis con efectos positivos en aquellas plantas bajo estrés salino. Este endófito aumenta la expresión de “NHX1” en plantas de Arabidopsis cultivadas en sal respecto a plantas no inoculadas (Abdelaziz et al., 2017). En nuestro estudio, las plantas de lechuga inoculadas indujeron transcripciones de “NHX1” y aunque los niveles de contenido celular y vacuolar de  $Na^+$  no fueron medidos, los efectos de la alta concentración de iones no se visualizaron en las plantas inoculadas.

El uso de microorganismos asociados a plantas provenientes de sitios extremos aparece como una poderosa herramienta para mejorar la tolerancia al estrés salino en cultivos no tolerantes. Sin dudas, la Antártica podría ser uno de los mejores lugares para encontrar microorganismos con características de PGPR y las plantas vasculares antárticas podrían albergar muchos hongos endófitos con usos biotecnológicos insospechados.

## 6. CONCLUSIONES

- Las plantas inoculadas con microorganismos antárticos aumentaron en un 14,2% la eficiencia fotoquímica en condiciones de estrés salino frente a las plantas no inoculadas, para el tiempo final (60 días).
- Las plantas inoculadas con microorganismos antárticos disminuyeron en un 60% el daño celular producto de la peroxidación lipídica, en condiciones de estrés salino frente a las plantas no inoculadas, para el tiempo final (60 días).
- Las plantas inoculadas con microorganismos antárticos mejoraron en un 20% la acumulación de prolina en el tejido vegetal, en condiciones de estrés salino frente a las plantas no inoculadas, para el tiempo final (60 días).
- En las plantas inoculadas con microorganismos antárticos, la expresión del gen “NHX1” presentó un alza de un 21% aprox. vs las plantas no inoculadas, en condiciones de salinidad para el tiempo final (60 días)
- En las plantas inoculadas con microorganismos antárticos la biomasa fresca aumentó en un 25% aprox. vs las plantas no inoculadas, en condiciones de salinidad para el tiempo final (60 días).

Por lo anterior, queda demostrado que el uso de microorganismos antárticos en condiciones de salinidad, en el cultivo de lechuga, tiene un impacto positivo en la productividad, en la fisiología del cultivo y en los mecanismos osmoprotectores de las plantas, por lo que en un futuro cercano podría suponer una alternativa factible para la producción de cultivos a escala agrícola en Chile y el mundo en escenarios de salinidad promovidos por el cambio climático.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdón y Meza. 2008. *Cambio climático: consecuencias y desafíos para Chile*. Temas de agenda pública, Centro Interdisciplinario de Cambio Global (CICG-UC), Pontificia Universidad Católica de Chile. Disponible en: <http://politicaspUBLICAS.uc.cl/wpcontent/uploads/2015/02/cambio-climatico-consecuencias-y-desafios-paras-chile.pdf>
- Abdul C, Riyadh K, Gopi R, Ma-nivannan P, Jallali I, Jasim H, Chang-Xing Z, Hong-Bo S, Panneerselvam R (2009) Anti-oxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiol. Plant.*31: 427-436.
- Adger W., Huq S., Brown K., Conway D., Hulme M. 2003. "Adaptation to climate change in the developing world", *Progress in Development Studies* 2003 3: 179.
- Aguilera-Gómez, L.; Davies, F. T.; Olalde-Portugal, V.; Duray, S. A. y Phavaphutanon, L. 1999. Influence of phosphorus and endomycorrhiza (*Glomus intraradices*) on gas exchange and plant growth of chile ancho pepper (*Capsicum annum* L. C.V. San Luis). *Photosynthetica*, 1999, vol. 36, 12:441-449.
- Alberdi M, Bravo LA, Gutiérrez A, Gidekel M, Corcuera LJ (2002) Ecofisiología de plantas vasculares antárticas. *Physiol Plant* 115: 479–486
- Andrade, J.L., A. Larqué-Saavedra y C. Trejo L. 1995. Proline accumulation in leaves of four cultivars of *Phaseolus vulgaris*L. with different drought resistance. *J. Exp. Bot.* 57:149-157.
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E: Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. *Science* 1999, 285(5431):1256-1258.
- Apse MP, Sottosanto JB, Blumwald E: Vacuolar cation/H<sup>+</sup> exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the *Arabidopsis* vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Plant J* 2003, 36(2):229-239.
- Augé, R. M. 2000. Stomatal behavior of arbuscular mycorrhizal plants. *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*, Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 9:201-237.

Banco Mundial, 2002. "Water—The essence of life". Washington, D.C.: DevNews Media Center (Worldbank Group), 17 de mayo de 2002. Disponible en: <http://web.worldbank.org/WBSITE/EXTERNAL/NEWS/0,,contentMDK:->

Banco Mundial. 2003. Water—a priority for responsible growth and poverty reduction: An agenda for investment and policy change. Washington, D.C.: Banco Mundial (Documento de trabajo del Banco Mundial 25770).

Banco Mundial. 2013. "Turn Down the Heat: Climate extremes, regional impacts and the case for resilience Executive Summary" p.7 Disponible en: [http://www.wds.worldbank.org/external/default/WDSContentServer/WDSP/IB/2013/06/14/000333037\\_20130614104709/Rendered/PDF/784220WP0Engl0D0CONF0to0June019090.pdf](http://www.wds.worldbank.org/external/default/WDSContentServer/WDSP/IB/2013/06/14/000333037_20130614104709/Rendered/PDF/784220WP0Engl0D0CONF0to0June019090.pdf)

Barrientos-Díaz L, Gidekel M, Gutierrez-Moraga A (2008) Caracterización de bacterias rizosféricas aisladas de *Deschampsia antarctica* Desv. World J Microbiol Biotechnol 24 (en prensa)

Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. Crit. Rev. Plant Sci. 24: 23-58.

Basahi JM, Ismail IM, Hassan IA. 2014. Effects of enhanced UV-B radiation and drought stress on photosynthetic performance of Lettuce (*Lactuca sativa* L. Romaine) Plants. Annual Research and Review in Biology 4:1739-1756.

Bernstein, L. 1961. *Osmotic adjustment of plants to saline media I. Steady state*. Amer. J. Bot. 48:909-918 pp.

Cheplick GP, SH Faeth. 2009. Ecología y evolución de la simbiosis hierba-endófito. Oxford, Inglaterra. Prensa de la Universidad de Oxford. 256 p.

Coleman-Derr D, Tringe SG. 2014. Building the crops of tomorrow: advantages of symbiont-based approaches to improving abiotic stress tolerance. Frontiers in Microbiology 5:283.

Crocker, J. L.; Witte, W. T. y Augé, R. M. 1998. Stomatal sensitivity to nonhydraulic root-to-shoot signals of partial soil drying in six temperate, deciduous forest trees. J. Exp. Bot., 1998, vol. 49, 16:761-774.

- Danneberg, G.; Latus, C.; Zimmer, W.; Hundeshagen, B.; Scheneider-Poetsch, H. y Bothe, H.1992. Influence of vesiculararbuscular mycoorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). *J. Plant Physiol.*, 1992, vol. 141, 4:33-39.
- Davies, F. T. J.r.; Durray, S. A.; Phavaphutanon, L. y Stahl, R. S.1999. Phosphorus influence on gas exchange and plant growth and development of two morphologically distinct types of *Capsicum annuum*. *Photosynthetica*, 1999, vol. 36, 9-106 pp.
- Davies, F. T.; Svenson, S. E.; Cole, J. C.; Phavaphutanon, L.; Durray, S. A.; Olalde-portugal, V.; Meier, C. E. y Bos, S. H.1996. Nonnutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiol.*, 1996, vol. 16, 13:985-993.
- Duan, X.; Neuman, D. S.; Reiber, J. M.; Green, C. D.; Saxton, A. M. y Augé, R. M.1996. Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors involved in the control of stomatal conductance during drought. *J. Exp. Bot.*, 1996, vol. 47, 16:1541-1550.
- Ebel, R. C.; Duan, X.; Still, D. W. y Augé, R. M.1997. Xylem sap abscisic concentration and stomatal conductance of mycorrhizal *Vigna unguiculata* in drying soil. *New Phytol.*, 1997, vol. 135, 14:755-761.
- Egert M, Tevini. 2002. Influence of drought on some psysiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Enviromental and Experimental of Botany* 48:43-49
- Esrey, S. A.; Potash, J. B.; Roberts, L. y Shiff, C. 1991. "Effects of improved water supply and sanitation on ascariasis, diarrhoea, dracunculiasis, hookworm infection, schistosomiasis, and trachoma". *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 69, 5:56-58.
- FAO. 2012. Disponible en [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/emergencies/docs/CAP\\_2012\\_Yemen.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/emergencies/docs/CAP_2012_Yemen.pdf)
- Fardella C, Osés R, Torres-Díaz C, Molina-Montenegro MA. 2014. Hongos endófitos antárticos como herramienta para la reintroducción de especies nativas en zonas áridas. *Bosque* 35:235-239.
- Giaconi, V. y Escaff, M. 2001. *Cultivo de Hortalizas*. Editorial Universitaria. Chile 336 p.

- Gielwanowska I, Szczuka E (2005) Nuevas características ultraestructurales de orgánulos en células de la hoja de *Deschampsia Antarctica* Desv. *Polar Biol* 28: 951–955
- Goodman, S.T. 1998. *Medical cell biology*, vol. II, pp. 27-65, USA: Goodman, S.T., ed. Lippincott-Raven Publishers.
- Gueta-Dahan Y, Yaniv Z, Zilinskas B, Ben-Hayyim B (1997) Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta* 203: 460-469.
- Hansen J, Sato M, y Ruedy R. 2012. "The New Climate Dice: Public Perceptions of Climate Change", NASA, Instituto Goddard de Estudios Espaciales 23 pp.
- Hinrichsen, Don; Robey, Bryant y Upadhyay, Ushuma D 1998. *Solutions for a water-short world*. Baltimore, Md.: Johns Hopkins School of Public Health, Population Reports, vol. 26, nº 1, 10 pp.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207:604-611.
- INACH 2015. "Antártica profunda, el Nuevo desafío". Boletín antártico chileno, Vol. 34, nº1, 2015, disponible en <http://www.inach.cl/inach/wp-content/uploads/2013/04/bach34-1.pdf>
- Jacoby, B.1994. *Mechanisms involved in salt tolerance of plants*. Handbook of plant and crop stress. Marcel Dekker, New York, NY. 6:97-123 pp.
- Karam F, Mounzer O, Sarkis F, Lahoud R. 2002. Yield and nitrogen recovery of lettuce under different irrigation regimes. *Journal Applied Horticulture* 4:70-76.
- Kasrils, Ronnie. 2002. "Ensuring the provision of water remains government's task." Artículo de la página web del gobierno de Sudáfrica.
- Koide, R. T. *Physiology of the mycorrhizal plant*.1993 En: Tommerup IC. (ed.): *Advances in Plant Pathology, Mycorrhiza synthesis*. New York. Academic Press, 9: 33-54
- KRARUP, C., MOREIRA, I. 1998. *Hortalizas de estación fría. Biología y diversidad cultural*. P. Universidad Católica de Chile, VRA, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Santiago, Chile. [http://www.puc.cl/sw\\_educ/hort0498](http://www.puc.cl/sw_educ/hort0498) (23 may 2009)

- Maas, E.V. 1986. *Salt tolerant of plant*. App. Agr. Res. 1:12-16 pp.
- Molina-Montenegro M., Oses R., Torres-Díaz C., Atala C., Zurita-Silva A., Ruiz-Lara S., 2016. *Root-endophytes improve the ecophysiological performance and production of an agricultural species under drought condition*. AoB PLANTS Advance Access published September 9, 2016.
- Munns, R. y A. Termaat. 1986. *Whole-plant responses to salinity*. Aust. J. Plant Physiol. 13: 143-160 pp.
- Munns, R. 2002. *Comparative physiology of salt and water stress*. Plant Cell Environ. 28: 239-250 pp.
- Nolte, H.D., A.D. Hanson, y D.A. Gage. 1997. Proline accumulation and methylation to proline betaine in Citrus: Implications for genetic engineering of stress resistance. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122: 8-13
- Lambers H, Chapin FS, Pons TL. 1998. *Plant physiological ecology*. Springer, Heidelberg. 540 pp.
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), 2002. *Descripción del mercado de lechugas en Chile*, artículo disponible en: <http://www.odepa.cl/articulo/descripcion-del-mercado-de-las-lechugas-2/>
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), 2013. “Cambio Climático Impacto en la Agricultura Heladas y Sequía”, Informe final, año 2013.
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), 2016. Informe estadístico de superficie cultivada de hortalizas en Chile, disponible en: <http://www.odepa.gob.cl/estadisticas/productivas/>
- OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013), OECD-FAO. *Agricultural Outlook 2013*, OECD Publishing.
- OXFAM, 2013. “Adversidad creciente: cambio climático, alimentos y lucha contra el hambre”. Informe temático, 2013, 8 pp.
- Paniza Cabrera A., 2002. Geografía de la Desertificación: *Procesos de Abandono de Tierras por Salinización en el Oasis Norte de Mendoza (Argentina)*. Colección Monográfica Tierras del Sur. Universidad de Granada e Instituto de Desarrollo Regional. Ed. Universidad de Granada, 56pp.

- Porta, J., M. López-Acevedo y C. Roquero. 1994. *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid 7:89-92 pp.
- Ruiz-Carrasco K, Antognoni F, Coulibaly AK, et al. 2011. *Variation in salinity tolerance of four lowland genotypes of quinoa (Chenopodium quinoa Willd) as assessed by growth, physiological traits, and sodium transporter gene expression. Plant Physiology and Biochemistry* 49: 1333-1341 pp.
- Ruiz-Lozano, J. M.; Azcón, R. y Gómez, M., 1995. Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Appl Environ. Microbiol.*, 1995, vol. 61, 13:456-460.
- Sairam R, Tyagi A (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.* 86: 407-421.
- Salisbury, F.B. y C.W. Ross. 2000. *Fisiología de las plantas. Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental*. Editorial Paraninfo, Madrid, 8:37-42 pp.
- Schwob, I.; Ducher M.; Sallanon, H. y Coudret, A. 1998. Growth and gas exchange responses of *Hevea brasiliensis* seedlings to inoculation with *Glomus mosseae*. *Trees*, 1998, vol. 12, 10: 236-240.
- Segerfeldt F., 2005. *Agua para todos: cómo la empresa privada y el mercado pueden resolver la crisis mundial del agua*. Cato Institute, 2: 7-12 pp.
- Shalata A, Tal M (1998) The effect of salt stress on lipid per-oxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated to-mato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiol. Plant.* 104: 169-174.
- Silveira J, Lima J, Cavalcanti F, Maia J, Viégas R (2005) Salt induced oxidative response in plants: damage or protection? En Custodio R, Araújo E, Gómez L, Cavalcante U (Eds.) *Estresses Ambientais: Danos e Benefícios em Plantas*. MXM Gráfica. Recife, Brasil. pp. 106-117
- Sokal R, Rohlf FJ. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. Freeman company, New York, 887 pp.

- Sottosanto JB, Gelli A, Blumwald E: DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter: impact of AtNHX1 on gene expression. *Plant J* 2004, 40(5):752-771.
- Munns R: Physiological processes limiting plant-growth in saline soils – some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ* 1993, 16(1):15-24.
- Sustainable Development Network. 2003. “Water for sustainable development: A sustainable development network briefing paper”. Londres: Sustainable Development International.
- Swarthout D, Harper E, Judd S, Bultman T. 2009. *Measures of leaf-level water-use efficiency in drought stressed endophyte infected and non-infected tall fescue grasses*. *Environmental and Experimental Botany* 66:88-93 pp.
- Thom ER, Popay AJ, Hume DE, Fletcher LR. 2012. Evaluating the performance of endophytes in farm systems to improve farmer outcomes – a review. *Crop and Pasture Science* 63:927-943 pp.
- Upton R, Read DJ, Newsham KK. 2009. Nitrogen form influences the response of *Deschampsia antarctica* to dark septate root endophytes. *Mycorrhiza* 20:1-11.
- Woicke P., 2003. *Making water work for development*. International Herald Tribune. 7-13 pp.
- Yamaguchi T, Aharon GS, Sottosanto JB, Blumwald E: Vacuolar Na<sup>+</sup>/ H<sup>+</sup> antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca<sup>2+</sup>- and pH-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102(44):16107-16112.
- Zhang HX, Blumwald E: Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology* 2001, 19(8):765-768.