

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**IDENTIFICACIÓN DE QTLs DE RESPUESTAS A ESTRÉS SALINO Y OSMÓTICO EN UNA
POBLACIÓN DE MAPEO *Lotus japonicus* x *L. burtii***

por

Gastón Eduardo QUERO CORRALLO

**TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de *Magister*
en Ciencias Agrarias opción Ciencias
Vegetales**

**MONTEVIDEO
URUGUAY**

Septiembre 2011

Tesis aprobada con mención por el tribunal integrado por el Dr. Jorge Monza, la Dra. Lucía Gutiérrez y la Ing. Agr. (Msc) Mónica Rebuffo el 26 de septiembre de 2011. Autor: Biol. Gastón Eduardo Quero Corrallo, Director: Dr. Ramiro Lascano, Co-director: Dr. Omar Borsani.

AGRADECIMIENTOS

A Jorge Monza por darme un espacio en su laboratorio y por su permanente apoyo en todas las instancias de mi trabajo.

A Omar Borsani, codirector de esta tesis, por su apoyo en la realización y corrección de esta tesis.

A Ramiro Lascano por la confianza depositada en mi trabajo dentro y fuera de las fronteras del país.

Al todo el grupo de Fisiología Vegetal del IFFIVE INTA, especialmente a Roberto Racca, Mariana Melchiorre y Victorio Trippi por su apoyo en las primeras etapas de mi formación.

A Lucía Gutiérrez por sus correcciones y aportes, que hicieron posible la realización de esta tesis.

A Paola Suárez por su amistad incondicional, sin la cual el trabajo de laboratorio no hubiera sido posible.

A Esteban Casaretto y a todo el grupo de Bioquímica de la Facultad de Agronomía por su compañerismo y apoyo en todas las actividades diarias.

A Armen Kemanian por sus aportes y consejos que fueron claves para la elaboración de esta tesis.

TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	VII
RESUMEN	XI
SUMMARY	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 <u>ESTRÉS ABIÓTICO</u>	1
1.1.1 <u>Mecanismos de respuesta de las plantas a salinidad y sequía</u>	1
1.1.1.1 Estrés por sequía	4
1.1.1.2 Estrés salino	4
1.1.2 <u>Mejoramiento frente a estrés abiótico</u>	6
1.1.2.1 Mejoramiento y selección de plantas tolerantes a sequía	7
1.1.2.2 Mejoramiento y selección de plantas tolerantes a salinidad	8
1.2 <u>SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES Y ANÁLISIS DE QTLs</u>	9
1.2.1 <u>Datos genotípicos</u>	12
1.2.1.1 Marcadores genéticos	12
1.2.1.2 Mapa de ligamiento	12
1.2.2 <u>Datos fenotípicos</u>	16
1.2.3 <u>Principios del análisis de QTLs</u>	17
1.2.3.1 Métodos para detectar QTLs	18
1.2.3.2 Factores que influyen en la detección de QTLs	20
1.3 <u>LEGUMINOSAS MODELO: HERRAMIENTAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS COMPONENTES ASOCIADOS A LA TOLERANCIA A ESTRÉS ABIÓTICO</u>	21
1.3.1 <u>Genoma de <i>Lotus japonicus</i></u>	23
1.3.1.1 Secuencias de expresión y transcriptómica	24

1.3.1.2 Poblaciones de mapeo en especies modelo de <i>Lotus spp.</i>	24
1.4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
1.4.1 <u>Hipótesis</u>	26
1.4.2 <u>Objetivos</u>	26
1.4.2.1 Objetivo general	26
1.4.2.2 Objetivos específicos	26
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	27
2.2 EVALUACIÓN DE LÍNEAS PURAS DE <i>Lotus spp</i>	27
2.2.1 <u>Material vegetal y condiciones de crecimiento</u>	27
2.3 SISTEMAS DE CULTIVO	28
2.3.1 <u>Sistema de placas</u>	28
2.3.2 <u>Sistema de <i>pouches</i></u>	28
2.3.3 <u>Sistema de hidroponía</u>	29
2.3.4 <u>Sistema de macetas</u>	31
2.3.4.1 Ensayo a corto plazo	31
2.3.4.2 Ensayo a largo plazo	32
2.4 PARÁMETROS EVALUADOS	32
2.4.1 <u>Parámetros de crecimiento y desarrollo</u>	32
2.4.1.1 Parámetros de crecimiento	32
2.4.1.2 Parámetros de desarrollo	33
2.5 EVALUACIÓN DE LÍNEAS RECOMBINANTES PURAS	33
2.5.1 <u>Material vegetal y condiciones de crecimiento</u>	33
2.5.2 <u>Sistema de cultivo y diseño experimental</u>	33
2.5.3 <u>Genotipado</u>	34
2.5.3.1 Marcadores moleculares y mapa de ligamiento	34
2.5.3.2 Análisis de QTLs	34

3 <u>RESULTADOS</u>	36
3.1 SISTEMAS DE CULTIVO	36
3.1.1 <u>Sistema de placas</u>	39
3.1.2 <u>Sistema de <i>pouches</i></u>	40
3.1.3 <u>Sistema de hidroponía</u>	42
3.1.3.1 <u><i>Lotus japonicus</i> MG20</u>	42
3.1.3.2 <u><i>Lotus japonicus</i> Gifu y <i>Lotus burtii</i></u>	43
3.1.4 <u>Sistema de macetas</u>	44
3.1.4.1 <u>Ensayo a corto plazo</u>	44
3.1.4.2 <u>Ensayo a largo plazo</u>	45
3.2 <u>EVALUACIÓN DE LAS RESPUESTAS AL ESTRÉS OSMÓTICO EN SISTEMAS DE HIDROPONÍA</u>	47
3.2.1 <u><i>Lotus japonicus</i> MG20</u>	47
3.2.2 <u><i>Lotus japonicus</i> Gifu y <i>Lotus burtii</i></u>	48
3.3 <u>LÍNEAS RECOMBINANTES PURAS</u>	49
3.3.1 <u>Distribución y correlación de las variables fenotípicas analizadas</u>	49
3.3.2 <u>Chequeo de datos genotípicos</u>	52
3.3.2.1 <u>Datos genotípicos faltantes</u>	52
3.3.2.2 <u>Frecuencia alélica</u>	53
3.3.2.3 <u>Dobles <i>crossovers</i></u>	54
3.3.2.4 <u>Fracción de recombinación estimada</u>	55
3.3.2.5 <u>Mapa de ligamiento</u>	56
3.3.3 <u>Análisis de QTLs</u>	57
4 <u>DISCUSIÓN</u>	65
4.1 <u>COMPARACIÓN DE DIFERENTES SISTEMAS DE FENOTIPADO EN ESTRÉS SALINO</u>	66

4.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE DOS GENOTIPOS DIPLOIDES DE LOTUS (<i>Lotus japonicus</i> GIFU y <i>Lotus burttii</i>) EN ESTRÉS SALINO Y OSMÓTICO	68
4.3 MAPEO DE QTLs ASOCIADOS A LA TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO Y OSMÓTICO EN UNA POBLACIÓN DE LINEAS RECOMBINANTES PURAS DE <i>Lotus</i> <i>japonicus</i> Gifu x <i>Lotus burttii</i>	70
5 <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	75
6 <u>ANEXOS</u>	82

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS**Cuadro n°**

1. Crecimiento de *Lotus japonicus* MG20 en cuatro sistemas de cultivo.
2. Crecimiento de tres genotipos de *Lotus* cultivados en placas de Petri en tres concentraciones de NaCl.
3. Desarrollo de tres genotipos de *Lotus* cultivados en placas de Petri en tres concentraciones de NaCl.
4. Crecimiento de tres genotipos de *Lotus* cultivados en *pouches* en tres concentraciones de NaCl.
5. Desarrollo de tres genotipos de *Lotus* cultivados en *pouches* en tres concentraciones de NaCl.
6. Crecimiento de *Lotus japonicus* MG20 cultivado en hidroponía en dos concentraciones de NaCl.
7. Desarrollo de *Lotus japonicus* MG20 cultivado en hidroponía en dos concentraciones de NaCl.
8. Crecimiento de *Lotus burtii* y *Lotus japonicus* Gifu cultivados en hidroponía en dos concentraciones de NaCl.
9. Desarrollo de *Lotus burtii* y *Lotus japonicus* Gifu cultivados en hidroponía en dos concentraciones de NaCl.
10. Crecimiento de *Lotus japonicus* MG20 cultivado en macetas en tres concentraciones de NaCl.
11. Desarrollo de *Lotus japonicus* MG20 cultivado en macetas en tres concentraciones de NaCl.
12. Crecimiento de tres genotipos de *Lotus* cultivados en macetas en tres concentraciones de NaCl.

13. Desarrollo de tres genotipos de *Lotus* cultivados en macetas en tres concentraciones de NaCl.
14. Crecimiento de *Lotus japonicus* MG20 cultivado en hidroponía en dos concentraciones de PEG.
15. Desarrollo de *Lotus japonicus* MG20 cultivado en hidroponía en dos concentraciones de PEG.
16. Crecimiento de *Lotus burtii* y *Lotus japonicus* Gifu cultivados en hidroponía en dos concentraciones de PEG.
17. Desarrollo de *Lotus burtii* y *Lotus japonicus* Gifu cultivados en hidroponía bajo dos concentraciones PEG.
18. Marcadores moleculares asociados a variables de crecimiento en tres condiciones experimentales.

Figura nº

1. Respuestas de la planta a estrés abiótico.
2. Tasas de crecimiento relativo de la planta en estrés salino.
3. Estructuras de datos utilizados en el análisis de QTLs.
4. Representación esquemática de los cambios en la composición genética de los cromosomas durante el desarrollo de una población RILs obtenida por autofecundación.
5. Simulación de datos fenotípicos para dos líneas puras, generación F2 y para una población RILs.
6. Estructura del análisis estadístico del mapeo de QTLs.
7. Principios del mapeo de QTLs.
8. Resultado de un mapeo de QTL por intervalo compuesto (CIM).

9. Filogenia de leguminosas.
10. Cronograma de aplicación de tratamientos en los sistemas de cultivos ensayados.
11. Sistemas de cultivos utilizados.
12. Crecimiento de *Lotus japonicus* MG20 en los distintos sistemas de crecimiento utilizados.
13. Desarrollo de *Lotus japonicus* MG20 en los distintos sistemas de crecimiento utilizados.
14. Fenotipo de la población RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*) evaluadas en hidroponía.
15. Distribución de frecuencia y correlación entre variables fenotípicas medidas en la población RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*) en tres condiciones experimentales.
16. Patrón de datos faltantes de la población RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*).
17. Frecuencia alélica de los marcadores moleculares identificados en la población de líneas recombinantes puras (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*).
18. Posibles errores y número de *crossover* observados en el mapa genético de la población RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*).
19. Fracción de recombinación estimada para todos los pares de marcadores de la población RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*).
20. Mapa genético de la población RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*).
21. Resultado del análisis de QTLs para la variable tasa de crecimiento relativo de tallo (TCRt) en la población RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*).
22. Resultado del análisis de QTLs para la variable tasa de crecimiento relativo de raíz (TCRr) en la población RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*).

23. Resultado del análisis de QTLs para la variable tasa de crecimiento relativo de total (TCRtotal) en la población RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*).
24. Resultado del análisis de QTLs para la variable relación tallo/raíz (RTR) en la población RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*).
25. Posición sobre mapa genético de todos los QTLs detectados en la población RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*).

RESUMEN

El género *Lotus* comprende un heterogéneo grupo de especies, que incluyen genotipos de interés agronómico y especies modelo que pueden ser usadas para trabajos de genética cuantitativa. En este trabajo, para establecer múltiples condiciones de intensidad y tiempo de estrés salino y osmótico, se utilizaron cuatro sistemas experimentales diferentes: placas, *pouch*, hidroponía y macetas. Estos permitieron discriminar respuestas fisiológicas, basadas en parámetros de crecimiento y desarrollo, en los genotipos *Lotus japonicus* (ecotipos MG20 y Gifu) y *Lotus burttii*. Esta información fue utilizada para caracterizar las respuestas frente a estas condiciones y tipos de estrés de una población de líneas recombinantes puras (RILs), producto del cruzamiento de *Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*, y para identificar loci asociados a rasgos cuantitativos (QTLs). En total se mapearon 18 QTLs, seis asociados al crecimiento del tallo, tres al crecimiento de la raíz, cinco al crecimiento total y cuatro a la relación tallo raíz. Del total de QTLs detectados, cuatro fueron ubicados en el cromosoma 1, tres en el cromosoma 2, seis en el cromosoma 3, uno en el cromosoma 4, dos en el 5 y dos en el cromosoma 6. Los QTLs tuvieron efectos distintos según la condición experimental ensayada. En la condición de estrés osmótico el alelo del parental *Lotus burttii* fue superior en 14 de los 18 QTLs identificados, mientras que en estrés salino el alelo de este parental fue superior en 9 QTLs. En el QTL asociado al marcador TM0324 (0,8 cM, cromosoma 1) se observó que el alelo del parental femenino *L. japonicus* Gifu tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de la raíz en condiciones de estrés salino, en cambio si el marcador tiene el alelo del parental *L. burttii* el comportamiento es el inverso. La región cercana al marcador TM0324 parece interesante para buscar genes asociados al comportamiento de la raíz en estrés iónico y osmótico. Este estudio provee herramientas útiles para potenciar los programas de mejoramiento de leguminosas cultivables de interés agronómico.

Palabras clave: RILs, *Lotus japonicus*, *Lotus burttii*, sistemas de cultivo, hidroponía

:IDENTIFICATION OF QTL CONTROLLING TRAITS RELATED TO SALINE AND OSMOTIC STRESS IN A *Lotus japonicus* X *L. burttii* MAPPING POPULATION

SUMMARY

The genus *Lotus* includes a heterogeneous group of species, that include genotypes of agronomic interest and model species that can be used for quantitative genetics. In this work, four different experimental systems were used: plates, pouch, hydroponic and pots, to establish multiple conditions of intensity and duration of ionic and osmotic stress. These strategies allowed discriminating physiological responses, supported in parameters of growth and development, of the genotypes *Lotus japonicus* (ecotypes MG20 and Gifu) and *Lotus burttii*. This information was used to characterize the responses against these conditions of stress of a population of recombinant inbred lines product of the cross of *Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*, and to identify associated-QTLs (*quantitative trait loci*). A total of 18 QTLs were mapped, six associated to the growth of stem, three to the growth of the root, five to total growth, and four to the stem root relation. Among the total of QTLs detected, four were located in chromosome 1, three in chromosome 2, six in chromosome 3, one in chromosome 4, two in 5 and two in chromosome 6. QTLs had different effects according to the experimental condition tested. Under osmotic stress condition the parental allele of *Lotus burttii* was superior in 14 of 18 QTLs identified, whereas in salt stress the allele of this parental was superior in 9 QTLs. The QTL associated to marker TM0324 (0.8 cM) showed that the parental allele of *Lj. Gifu* has a positive effect on the growth of root under salt stress conditions, however if the marker is the parental allele of *L. burttii* the behavior was the inverse one. The region near the marker TM0324 is a potential candidate for stress gene browsing. This study provides useful tools to harness the breeding programs of cultivated legumes of agronomic interest.

Key words: RILs, *Lotus japonicus*, *Lotus burttii*, growth system, hydroponia

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ESTRÉS ABIÓTICO

El estrés abiótico es la principal causa de pérdidas en la productividad de los cultivos a nivel mundial. Aproximadamente el 37% de las pérdidas potenciales en la producción se deben a problemas relacionados con la sequía y/o la salinidad (Athar y Ashraf, 2009, Munns y Tester 2008, Flowers, 2004, Zhang *et al.*, 2001). Actualmente, el 10% de las tierras cultivables están afectadas por procesos de sequía y/o salinización y se estima que para el año 2050 este porcentaje aumente a más del 50% (Athar y Ashraf, 2009, Wang *et al.*, 2003, Munns, 2002). Por esto, la obtención de cultivares productivos y tolerantes a estas condiciones es importante para mitigar los efectos del estrés abiótico y obtener una producción agropecuaria sustentable en el contexto del cambio climático global.

1.1.1 Mecanismos de respuesta de las plantas a salinidad y sequía

Los daños causados por sequía y/o salinidad tienen características comunes. Esto llevó a suponer que las vías de señalización celular y las respuestas implicadas son similares para ambos de tipos de estrés (Mazzucotelli *et al.*, 2008, Munns *et al.*, 2002, Zhu, 2001). Ambos estreses se manifiestan como estrés osmótico, que lleva a un cambio en la homeostasis celular y generalmente, se desencadena daño oxidativo (Munns y Tester, 2008, Wang *et al.*, 2003, Borsani *et al.*, 2001). Las respuestas de tolerancia / sensibilidad a sequía y salinidad, como a otros tipos de estrés abiótico, involucran mecanismos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que tienen como objetivo mantener procesos claves, como la respiración, la fotosíntesis y el transporte de nutrientes (Díaz *et al.*, 2005).

Dentro de los mecanismos de tolerancia al estrés, los que regulan la homeostasis iónica e hídrica parecen ser los más importantes. Las respuestas de tolerancia requieren de la integración a nivel de planta, de ajustes a nivel molecular, celular y tisular. Sin embargo el mejoramiento de la tolerancia está basado principalmente en la manipulación de genes que protegen y mantienen la estructura y funcionalidad de los componentes celulares (Athar y Ashraf, 2009, Wang *et al.*, 2003, Hasegawa *et al.*, 2000).

Los genes asociados a las respuestas de tolerancia se pueden agrupar en tres categorías, la primera está constituida por genes que participan en las cascadas de señales y en el control de factores transcripción, la segunda por genes relacionados a proteínas de protección de membranas, y la tercera por genes asociados a transportadores iónicos y acuaporinas (Wang *et al.*, 2003, Gong *et al.*, 2001). Los genes incluidos en estas categorías y los mecanismos bioquímicos asociados están esquematizados en la Figura 1.

1.1.1.1 Estrés por sequía

La sequía causa estrés en las plantas por falta de agua disponible en el suelo, en la atmósfera, o en ambos. La disminución en la cantidad de agua disponible en el suelo se traduce en una disminución del potencial hídrico (ψ_w), frente al cual la planta procura mantener el estado hídrico evitando la pérdida de agua o incrementando su entrada desde el suelo (Verslues *et al.*, 2006). Si el estrés es de moderada intensidad o de corta duración, se produce un desbalance hídrico que es corregido mediante el cierre de estomas, y el desarrollo radicular. Este tipo de repuestas son conocidas como estrategias de escape o evitación de la sequía (Khan *et al.*, 2010, Mitra, 2001).

No obstante si el déficit hídrico es severo o prolongado en el tiempo, se genera un proceso de deshidratación para el cual se necesitan mecanismos adicionales que permitan mantener la homeostasis. En este punto, la supervivencia de la planta depende de la capacidad de ajuste osmótico, y los solutos osmocompatibles juegan un rol central (Ashraf y Foolad, 2007). Esta respuesta se conoce como tolerancia a la sequía, la cual requiere de cambios metabólicos como la síntesis de proteínas de protección, como las dehidrinas y proteínas LEA (*late-embryogenesis-abundant*), y el control de los niveles de especies reactivas del oxígeno (EROs) a través de sistemas antioxidantes (Khan *et al.*, 2010).

Las repuestas al déficit hídrico así planteadas resumen un proceso que en realidad es producto de la integración e interrelación de mecanismos bioquímicos y fisiológicos de base multigénica, esto hace que la tolerancia a la sequía sea un rasgo cuantitativo complejo de difícil interpretación.

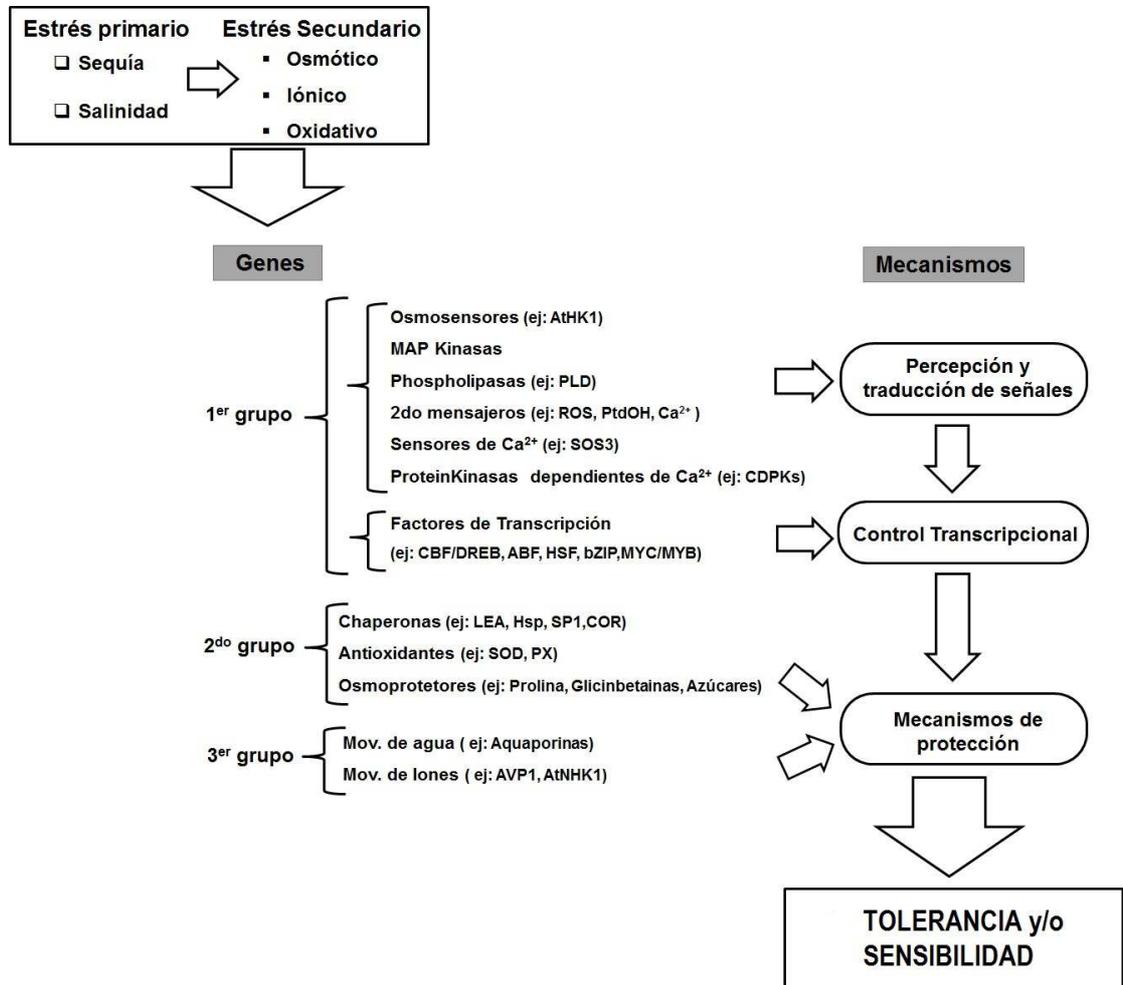


Figura 1. Respuestas de la planta a estrés abiótico. El estrés primario, como sequía o salinidad están generalmente interconectados, y causan un estrés secundario, como ser el estrés osmótico y oxidativo, que lleva al daño celular. La señal inicial del estrés (efecto osmótico e iónico) dispara *downstream* una serie de procesos de señalización secundaria y de control transcripcional. Estos procesos activan mecanismos de respuesta al estrés, como la protección y reparación de proteínas y membranas, tendientes a restablecer la homeostasis celular. Una respuesta inadecuada a uno o varios de estos pasos puede resultar en daños irreversibles a proteínas funcionales y estructurales y membranas, lo cual finalmente lleva a la muerte celular (Adaptado de Wang *et al.*, 2003).

1.1.1.2 Estrés salino

La salinidad afecta diferentes aspectos de la fisiología de la planta, y en términos generales la respuesta de los cultivos al estrés salino causado por altas concentraciones de NaCl se da en dos fases. En la primera se produce estrés osmótico, respuesta no específica causada por la diferencia de potencial hídrico generado por la concentración de sal fuera de la raíz. En la segunda fase se produce un estrés iónico, producto del desbalance de la relación K^+/Na^+ y del aumento a niveles letales de Na^+ y Cl^- . Esta respuesta es exclusiva del estrés salino y se debe a la toxicidad del NaCl (Munns y Tester, 2008, Díaz *et al.*, 2005, Borsani *et al.*, 2003, Munns, 2002).

El crecimiento y supervivencia de las plantas en este punto, depende principalmente de la capacidad de restablecer la homeostasis iónica (Borsani *et al.*, 2001). Para entender los mecanismos responsables de la tolerancia a la salinidad se debe conocer cómo y cuándo el crecimiento de la planta se altera por el efecto tóxico y osmótico del NaCl (Verslues *et al.*, 2006, Zhu, 2001).

En general las plantas utilizan dos tipos de mecanismos frente al estrés salino. En las plantas sensibles a la salinidad, se reduce la toma de NaCl y se produce un ajuste osmótico mediante la síntesis de solutos compatibles como la prolina, glicinbetainas y polioles, mientras que en las plantas tolerantes el NaCl se compartimentaliza en vacuolas, manteniéndose una alta relación K^+/Na^+ en el citoplasma celular (Shabala y Cuin, 2007, Yamaguchi y Blumwald, 2005).

Las plantas tolerantes a estrés salino poseen mecanismos de control a diferentes niveles. A nivel celular la tolerancia está determinada por la exclusión del Na^+ desde el citoplasma hacia la vacuola, proceso controlado por canales de transporte iónico, como son los canales de alta afinidad regulados por K^+ y los canales de baja afinidad regulados por Ca^{2+} , mientras que a nivel de planta entera la tolerancia se define por la capacidad de excluir y traslocar Na^+ . Así, una relación tallo/raíz alta, como una alta tasa de crecimiento es necesaria para mantener bajos los niveles de Na^+ en hoja (Yamaguchi y Blumwald, 2005, Munns *et al.*, 2002).

A nivel de planta entera la respuesta a la salinidad debe ser observada a través del tiempo. La primera etapa, fase osmótica, que comienza inmediatamente después de que la concentración de sal se incrementa sobre cierto nivel umbral. En esta primera etapa la tasa de crecimiento cae abruptamente (Figura 2). Esta respuesta se debe en gran parte al efecto del NaCl fuera de las raíces, aquí el crecimiento de la parte aérea se ve más afectado que el crecimiento radicular. En la segunda etapa, fase iónica, la planta comienza a acumular iones en hojas viejas, y estas comienzan a morir. Si la tasa de muerte de hojas viejas es mayor que la tasa en la cual hojas nuevas son producidas, la capacidad fotosintética de la planta cae, lo cual lleva a una reducción de la tasa de crecimiento (Munns, 2009, Munns y Tester, 2008).

Un incremento en la tolerancia al estrés osmótico no necesariamente va asociado con un incremento en la tolerancia iónica, la cual aparece de manera tardía (Figura 2A y B). La tolerancia a ambos estreses puede observarse en plantas que mantienen relativamente la misma tasa de crecimiento durante todo el periodo de estrés (Figura 2C).

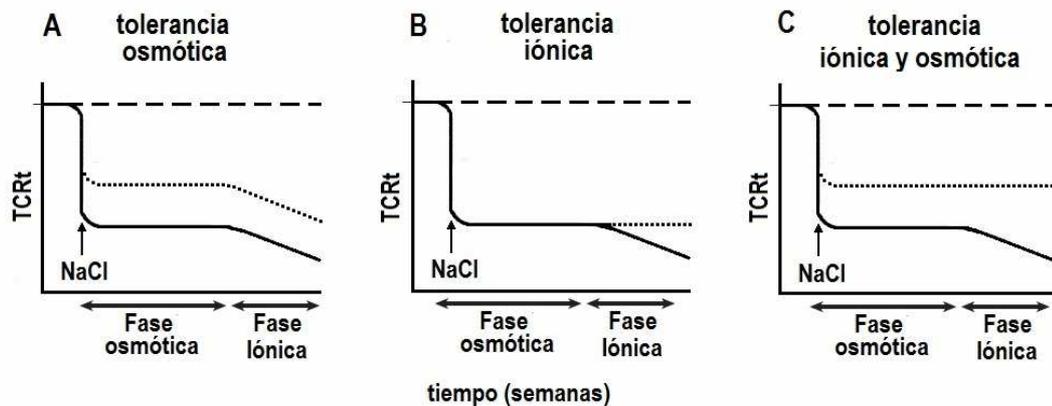


Figura 2. Tasas de crecimiento relativo de la planta en estrés salino. El estrés salino afecta la respuesta de crecimiento de la planta en 2 fases: Una rápida respuesta al incremento en la presión osmótica externa (Fase osmótica), y una lenta respuesta debido a la acumulación de Na⁺ en hojas (Fase iónica). La línea sólida representa cambios en la tasa de crecimiento relativo de tallo (TCRt) luego de la adición de NaCl. La línea a trazos representa la respuesta de la planta en condiciones sin estrés. La línea punteada representa la respuesta de plantas tolerantes al estrés. A) La línea punteada representa la respuesta hipotética de una planta con tolerancia al componente osmótico del estrés salino. B) La línea punteada representa la respuesta hipotética de una planta con tolerancia al componente iónico del estrés salino. C) La línea punteada representa la respuesta hipotética de una planta con tolerancia a ambos componentes, iónico y osmótico, del estrés salino (Adaptado de Munns y Tester, 2008).

1.1.2 Mejoramiento frente a estrés abiótico

En el mejoramiento de la tolerancia al estrés abiótico se pueden emplear dos aproximaciones. Una está dirigida a explorar y aumentar la variación genética existente en los cultivos de interés agrícola, ya sea por cruzamientos intra e inter-específicos, donde estas nuevas combinaciones de genes deben ser introducidas en los germoplasmas existentes en los distintos programas de mejoramiento (Ashraf, 2010, Flowers, 2004). La otra es la generación de cultivos tolerantes producto de la selección, a través de genes específicos, o de la generación de plantas transgénicas que tienen en su genoma genes que confieren tolerancia a estrés (Yamaguchi y Blumwald, 2005). En ambos casos es fundamental conocer los determinantes genéticos asociados a las distintas respuestas de tolerancia. En este sentido, la evaluación fenotípica de la respuesta de tolerancia es clave y debe hacerse simultáneamente con la generación de información del genoma de las especies involucradas (Munns *et al.*, 2002).

Si bien los mecanismos básicos de la tolerancia al estrés abiótico han sido descritos en numerosos trabajos, los determinantes génicos en general permanecen sin conocerse (Munns y Tester, 2008, Apse *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2003, Zhu, 2001). Por lo tanto, encontrar genes asociados a estas respuestas fisiológicas es fundamental para mejorar el comportamiento productivo de los cultivos en zonas agrícolas marginales (Botella *et al.*, 2005). En este punto, el desafío está en tratar de disminuir la brecha existente entre los experimentos ecofisiológicos realizados en cultivos de interés agronómico, con aquellos realizados en organismos modelos y que tienen como objetivo la elucidación de mecanismos moleculares involucrados en la percepción y respuesta al estrés abiótico (Verslues *et al.*, 2006). Así, para el mejoramiento de la tolerancia al estrés abiótico en cultivos de interés agrícola parece razonable combinar el mejoramiento convencional con técnicas de genética molecular.

1.1.2.1 Mejoramiento y selección de plantas tolerantes a sequía

El desarrollo de líneas o cultivares tolerantes a la sequía a través de la selección y el mejoramiento es un desafío para incrementar la producción en áreas con bajas precipitaciones o sin posibilidad de implementar sistemas de riego (Athar y Asrhaf, 2009).

Algunos de los caracteres que tradicionalmente se han utilizado para seleccionar plantas tolerantes a la sequía son la producción de semillas, el índice de cosecha, el ψ_w , y el ajuste osmótico de la hoja, la acumulación de prolina, la eficiencia en el uso de agua y la fluorescencia de clorofila (Ashraf, 2010). Sin embargo la mayoría de estos métodos insumen mucho tiempo y tienen un costo elevado, lo cual los hace poco eficientes y/o caros cuando se requiere hacer un *screening* a un gran número de plantas en poblaciones segregantes (Athar y Asrhaf, 2009).

En las metodologías antes mencionadas, se caracteriza la tolerancia al estrés a nivel de planta entera, lo cual ha hecho que este rasgo sea considerado demasiado complejo y por tanto muy difícil de manejar en los programas de mejoramiento. Una solución a este problema es estudiar las características de tolerancia en parte aérea y en raíz independientemente, es decir identificar genes responsables del comportamiento estomático, ajuste osmótico y arquitectura radicular, para luego combinar estos caracteres en el mejoramiento de variedades (Sharp *et al.*, 2004). En este sentido, una característica importante es la capacidad del sistema radicular de seguir creciendo a niveles de ψ_w bajos. En tales condiciones, algunos sistemas radiculares siguen creciendo a ψ_w menores a -1.5 MPa, a este nivel el crecimiento de tallo se ve inhibido. Por otra parte el mantenimiento del crecimiento radicular durante el déficit hídrico permite a la planta mantener un adecuado suministro de agua (Sharp *et al.*, 2004).

1.1.2.2 Mejoramiento y selección de plantas tolerantes a salinidad

Varias estrategias pueden ser adoptadas en el mejoramiento de la tolerancia al estrés salino; estas estrategias son básicamente las mismas que se utilizan para el mejoramiento de tolerancia a la sequía. Sin embargo en el caso de la salinidad se presenta la dificultad de poder distinguir los efectos diferenciales del NaCl. En este sentido el foco está puesto en los mecanismos de, acumulación y exclusión selectiva de iones, control de toma y distribución de Na^+ , compartimentalización de iones a nivel celular y a nivel de planta entera (Athar y Ashraf, 2009, Munns y Tester, 2008, Flowers, 2004).

Las principales limitantes en el mejoramiento de la tolerancia a la salinidad son: i) los métodos de *screening* fenotípicos, ii) los genes no deseados que se transfieren ligados a genes

que codifican para rasgos de interés, y iii) las barreras reproductivas que restringen la transferencia de alelos favorable (Athar y Ashraf, 2009).

Hasta el momento, el mejoramiento de cultivares para un rasgo cuantitativo complejo como la tolerancia al estrés por NaCl, no ha tenido el éxito esperado (Athar y Ashraf, 2009). Esto se debe principalmente a: i) la complejidad de los caracteres fenotípicos involucrados, lo que hace que no haya un consenso general en la identificación de qué rasgos fisiológicos están asociados a la tolerancia este tipo de estrés y ii) a que algunos rasgos de tolerancia están determinados por muchos de genes, que no solo presentan fenómenos de interacción génica, sino que además poseen un efecto pequeño comparado con la presión ambiental que impone el estrés por NaCl (Cuartero *et al.*, 2006, Flowers, 2004, Borsani *et al.*, 2003).

1.2 SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES Y ANÁLISIS DE QTLs

El rendimiento y otras características de interés agronómicos se conocen como rasgos cuantitativos, ya que exhiben una variación fenotípica continua, en oposición a los rasgos cualitativos, como la resistencia a ciertas enfermedades, donde los fenotipos individuales son categorías discretas (Mackay, 2001, Tanksley, 1993).

A principios del siglo XX se demostró que la variación observada en un rasgo cuantitativo es el resultado combinado de la acción de muchos genes y de factores ambientales particulares (Ansíns, 2002, Tuberosa *et al.*, 2002). Desde entonces, uno de los principales objetivos en los programas de mejoramiento vegetal, ha sido entender las bases genéticas de los rasgos cuantitativos dentro de una población de interés.

Actualmente la selección asistida por marcadores (MAS, *marker-assisted selection*) permite examinar simultáneamente cientos de regiones en el genoma de plantas creciendo en diversas condiciones ambientales, lo que no era posible con la herramientas y protocolos de los programas de mejoramiento tradicionales. La aproximación con MAS permite a los mejoradores piramidar genes con efectos similares, y así obtener cultivares tolerantes a distintos tipos de estrés abióticos (Ashraf, 2010).

Las regiones del cromosoma que controlan rasgos cuantitativos como las respuestas a la sequía y salinidad son llamados QTLs (*quantitative trait loci*). La ubicación de QTLs asociados a rasgos de tolerancia podría ayudar en identificar genes puntales que confieren tolerancia al estrés abiótico en cultivos de interés (Ashraf, 2010).

Así, el mapeo de QTLs es un camino efectivo en la disección de los componentes involucrados en la tolerancia al estrés abiótico. Sin embargo debido a la complejidad de los factores genéticos, e incluso a la interacción genotipo ambiente, en la mayoría de los casos un número limitado de QTLs han sido detectados de manera estable a través de diferentes *pools* genéticos y ambientes (Ashraf, 2010).

En las estrategias con MAS e identificación de QTLs es necesario establecer criterios de selección fenotípica y desarrollar sistemas experimentales que permitan evaluar esos criterios de manera eficiente, rápida y sencilla (Agbicodo *et al.*, 2009, Salekdeh *et al.*, 2009).

La herencia de los rasgos cuantitativos es poligénica por tanto éstos están condicionados por la variación alélica de varios locus. A su vez, dentro de un QTL el efecto individual de cada locus sobre el fenotipo es relativamente muy pequeño (Asíns, 2002, Doerge, 2002, Tanksley, 1993).

La identificación (o mapeo) de QTLs es una metodología estadística que consiste en detectar asociaciones significativas entre un rasgo cuantitativo de interés y el genotipo del individuo. Según esta idea, la identificación de QTLs basados solo en evaluación fenotípica convencional no es posible, es necesario contar con datos que brinden información sobre la base genética asociada al fenotipo estudiado. Para ello se usan “señales” discretas en el genoma conocidos como marcadores DNA o marcadores moleculares (Collard *et al.*, 2005).

El principal objetivo del análisis de QTLs es determinar la posición precisa de un QTL dentro de un cromosoma, en el genoma de un organismo en particular. La idea de usar un marcador genético para mapear un QTL que controla un rasgo cuantitativo fue propuesta por Thoday en 1961. Según este autor si la segregación de un marcador genético puede ser

determinada en el genoma de un organismo, entonces puede ser posible mapear y caracterizar el o los QTLs que afectan a un fenotipo particular.

El análisis de QTLs no solo permite identificar marcadores moleculares que pueden ser utilizados para la selección de individuos en los programas con MAS, sino que también son una herramienta básica en estudios de genómica funcional en plantas, lo que es particularmente importante cuando se realizan estudios fisiológicos sobre rasgos agronómicos como la tolerancia a estrés abiótico.

El éxito en la identificación de QTLs depende no solo de la precisión del modelo estadístico utilizado, sino de otros factores como son: el diseño experimental, tipo de población de mapeo, tamaño de la población, heredabilidad del carácter, número y contribución de cada QTL al total de la varianza genética, interacción entre QTLs, interacción de QTL con el ambiente, número y distancia entre marcadores consecutivos, porcentaje de marcadores codominantes, orden de los marcadores en el mapa de ligamiento y evaluación del rasgo cuantitativo, entre otros (Broman y Sen, 2009, Asíns, 2002, Tanksley, 1993).

Para la consideración de todos los aspectos mencionados, vamos a definir dos, estructuras de datos: La primera consiste en un grupo de características observables en la población, a la que denominaremos datos fenotípicos, que incluyen rasgos cuantitativos de interés (rendimiento, peso, longitud, etc), y covariables (condiciones ambientales, sexo, etc). La segunda estructura, a la que denominaremos datos genotípicos, incluye un grupo de marcadores esparcidos dentro del genoma, y el mapa genético donde se especifica la ubicación de los mismos marcadores, en términos de distancias genéticas, en los distintos cromosomas. El análisis de QTLs surge de la interacción de estas dos estructuras de datos.

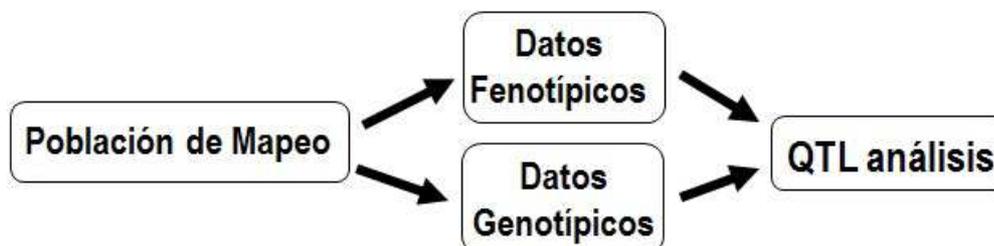


Figura 3. Estructuras de datos utilizados en el análisis de QTLs. A partir de una población de mapeo, se obtienen datos fenotípicos (peso, altura, rendimiento) y datos genotípicos (alelos de cada marcador) que luego son analizados conjuntamente para detectar posibles QTLs.

1.2.1 Datos genotípicos

1.2.1.1 Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos representan diferencias genéticas entre individuos. Estos marcadores se puede clasificar en tres categorías: a) marcadores morfológicos o visibles, un rasgo fenotípico en particular. b) marcadores bioquímicos, como las isozimas y, c) marcadores moleculares, que muestran variaciones en el DNA (Collard *et al.* 2005).

Dentro de estas tres categorías los marcadores moleculares poseen ciertas propiedades diferenciales, que los hacen ventajosos sobre los otros dos tipos. Estas propiedades son: 1) *Neutralidad fenotípica*, la mayoría de las variaciones alélicas de los marcadores moleculares son en regiones no codificantes del genoma. 2) *Polimorfismo*, que permite detectar diferencias entre individuos. Los marcadores polimórficos codominantes discriminan entre individuos heterocigotos. 3) *Abundancia*, los marcadores moleculares son prácticamente ilimitados en número, por esto es que son los más usados (Collard *et al.* 2005).

1.2.1.2 Mapa de ligamiento

Un mapa de ligamiento indica la posición y las distancias genéticas relativas entre marcadores a lo largo de los cromosomas. En un mapa genético la distancia entre marcadores es medida por la tasa de eventos de recombinación o *crossover* en la meiosis (Broman y Sen, 2009). Estas frecuencias de recombinación son usadas para estimar la distancia entre marcadores. Si dos marcadores están separados por 5 centiMorgans (cM) significa que hay entre

ellos un promedio de 5 *crossovers* cada 100 productos de la meiosis. Una frecuencia de recombinación del 50% indica que los marcadores están localizados muy lejos en el mismo cromosoma o en diferentes cromosomas (Collard *et al.* 2005).

En este punto el nivel de polimorfismo del marcador es importante ya que la variación alélica es la que permite seguir la segregación del marcador en la progenie, y por tanto hacer los grupos de ligamiento sobre los cuales se puedan detectar y ubicar QTLs (Margarido *et al.*, 2007).

Según Broman y Sen (2009), hay tres puntos fundamentales en la construcción de los mapas de ligamientos: 1) producción de una población de mapeo, 2) identificación de polimorfismos, 3) análisis de ligamiento de los marcadores.

1) *Población de mapeo*: Una población de mapeo (población segregante) corresponde a un conjunto de individuos producto de un cruzamiento entre dos líneas consideradas “parentales”. En el caso de las plantas, las poblaciones de mapeo pueden ser obtenidas mediante el cruzamiento de líneas puras. Una línea pura se forma mediante autofecundaciones sucesivas hasta obtener individuos completamente homocigotos, es decir, idénticos en todas las posiciones en ambos cromosomas. Todos los individuos en un línea pura son genéticamente idénticos unos de otros (Broman, 2005). En un experimento típico de análisis de QTLs las poblaciones de mapeo más utilizadas son, la F₂, retrocuzas, dobles haploides y líneas recombinantes puras (RILs, *recombinat inbred lines*).

En especies autógamas, las poblaciones F₂ y las retrocuzas son las más utilizadas debido a que son fáciles de obtener. Sin embargo una estrategia útil es usar RILs. Estas líneas son construidas a partir de una F₂, seguida por una serie de autofecundaciones, hasta construir un nuevo panel de líneas puras cuyo genoma en un mosaico de las dos líneas iniciales (Figura 4).

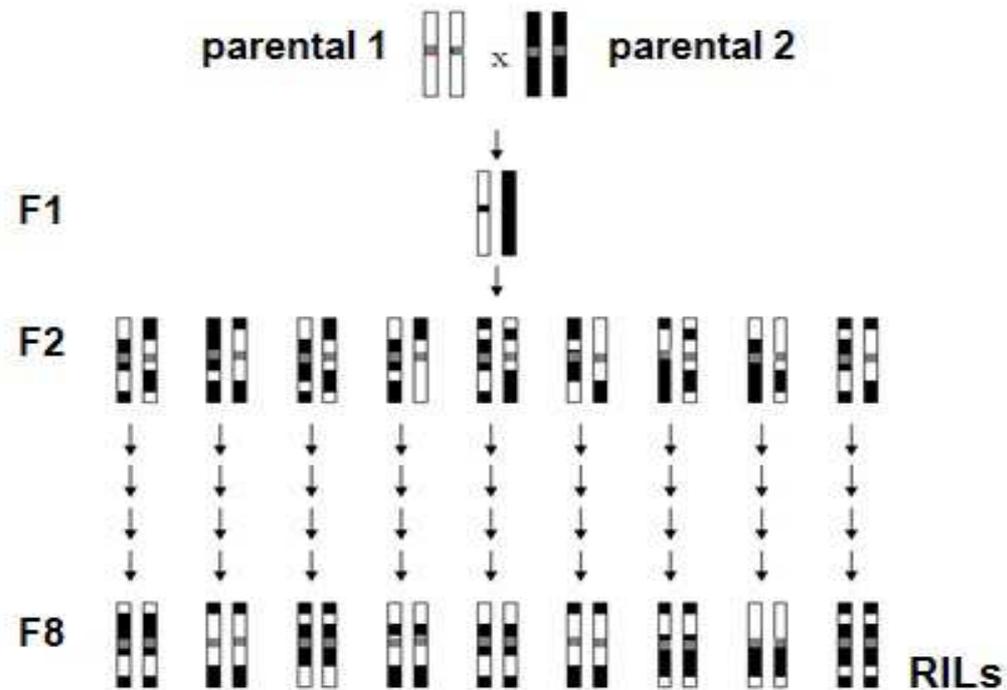


Figura 4. Representación esquemática de los cambios en la composición genética de los cromosomas durante el desarrollo de una población RILs obtenida por autofecundación. Las dos líneas puras, parental 1 y 2, están representados por los cromosomas blanco y negro respectivamente. Mediante auto fecundación de la generación F1 se genera variación genética que resulta en la F2. Cada línea de la F2 a su vez es autofecundada sucesivamente, el resultado es la pérdida de heterocigotos en las generaciones subsiguientes. Si este proceso continua por varias generaciones (F8-F10) se producen individuos que son completamente homocigotos en cada locus, pero con cromosomas que son un mosaico de los cromosomas parentales (Adaptado de Broman, 2005).

Las RILs tienen ventajas importantes sobre las otras dos poblaciones se pueden lograr mejores resoluciones del mapa genético, cada línea se tiene genotipar una sola vez, se pueden fenotipar múltiples individuos por cada línea lo cual reduce la varianza individual y ambiental (Broman y Sen, 2009, Broman, 2005, Ansíns, 2002).

2) *Identificación de polimorfismo*: El segundo paso en la construcción del mapa de ligamiento es identificar los marcadores moleculares que muestren diferencia entre los parentales. Una vez identificado el polimorfismo de los marcadores se debe hacer un escaneo (genotipado) en toda la población de mapeo incluidos los parentales. Las relaciones de segregación esperadas en una población RILs es de 1:1, desviaciones significativas de las

segregaciones esperadas pueden ser analizadas usando un test chi cuadrado (Broman y Sen, 2009).

3) *Análisis de ligamiento de los marcadores*: El paso final en la construcción del mapa genético involucra la codificación de los datos de cada marcador molecular, para cada individuo de la población, y realizar el análisis de ligamiento con un software determinado (Margarido *et al.*, 2007, Varshney *et al.*, 2007).

El ligamiento entre marcadores es usualmente calculado como la probabilidad de que dos marcadores estén ligados, versus la probabilidad de que no estén ligados. Estas probabilidades son expresadas como LOD score (*Likelihood odds*). Un LOD score de 3 entre dos marcadores indica que la hipótesis de ligamiento es 1000 veces más probable que la hipótesis de no ligamiento. LOD score >3 son típicamente usados para construir los mapas de ligamiento (Margarido *et al.*, 2007).

Los marcadores son agrupados juntos en “grupos de ligamientos” los cuales representan segmentos de cromosomas o cromosomas enteros. El orden de los marcadores en cada grupo, así como la distancia genética entre ellos, están directamente relacionados al número de individuos estudiados en la población de mapeo. Idealmente la población de mapeo debería consistir en un mínimo de 50 individuos para construir los mapas de ligamiento (Collard *et al.*, 2005).

Distintas funciones de mapeo son requeridas para convertir fracciones de recombinación en centiMorgans (cM), esto se debe a que las fracciones de recombinación y las frecuencias de *crossovers* no están linealmente relacionadas. Una función de mapeo relaciona la longitud genética en un intervalo, generalmente no estimable, con la fracción de recombinación en ese intervalo, la cual si es estimable. Las dos funciones comúnmente usadas son: la función Kosambi, la cual asume que un evento de recombinación afecta la ocurrencia del evento de recombinación adyacente, y la función Haldane la cual asume que no hay interferencia entre eventos de *crossover*, es decir ocurren al azar. Bajo el modelo de no interferencia (Haldane) el

genotipo de un marcador es independiente del genotipo de los marcadores adyacentes. Generalmente, para simplificar los cálculos, se asume un modelo de no interferencia (Margarido *et al.*, 2007).

En general se da el caso que las distancias en mapa de ligamiento no este directamente relacionada con la distancia física entre marcadores dentro del cromosoma. En esos casos el mapa citogenético puede brindar información complementaria, ya que está basado en la estructura física del cromosoma (Broman y Sen, 2009, Collard *et al.* 2005, Schneider, 2005).

1.2.2 Datos Fenotípicos

Si dos líneas puras crecidas en un ambiente común muestran una diferencia fenotípica significativa, se puede considerar que tales diferencias tienen bases genéticas. La identidad de los QTLs causantes de la diferencia fenotípica entre líneas puede ser revelada analizando el fenotipo de la progenie. Sin embargo dentro de cada línea cualquier variación en el fenotipo no es por causa génica, ya que todos los individuos son genéticamente idénticos, por tanto las variaciones fenotípicas se debe más bien a la combinación de medidas del error, variación ambiental y ruido de desarrollo individual (Figura 5) (Broman y Sen, 2009).

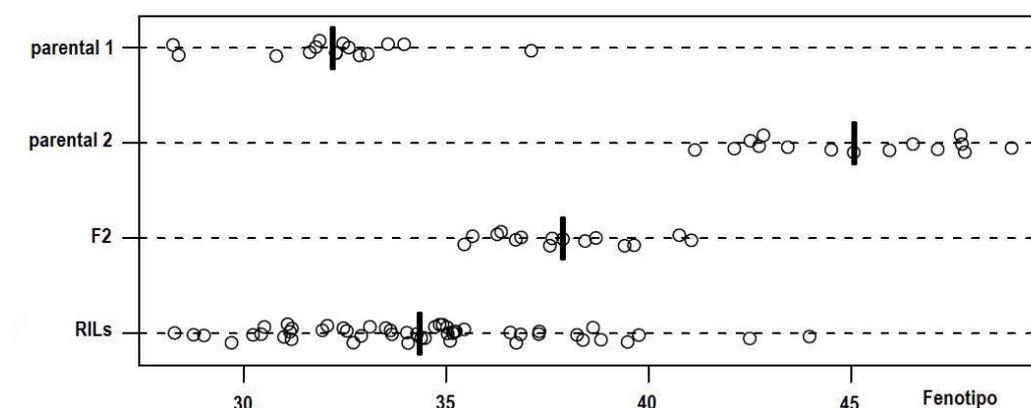


Figura 5. Simulación de datos fenotípicos para dos líneas puras, para generación F2 y para una población de líneas RILs. Los segmentos verticales dentro de cada grupo representan las medias. En este ejemplo la diferencia genotípica entre las líneas es mayor que la diferencia dentro de cada línea. La media fenotípica de la generación F2 es intermedia entre los dos parentales, mientras que la población de RILs presenta una variación más amplia y una media parecida al parental 1 (Adaptado de Broman y Sen, 2009).

1.2.3 Principios del análisis de QTLs

El fenotipo está influenciado por el QTL asociado al mismo más posibles covariables, como factores ambientales. Sin embargo, en la mayoría de los casos el genotipo del QTL no se observa sino a través del genotipo de marcadores asociados (debido al ligamiento). Es el ligamiento entre el marcador y el QTL, lo que permite asociar el fenotipo al genotipo de los marcadores (Figura 6).

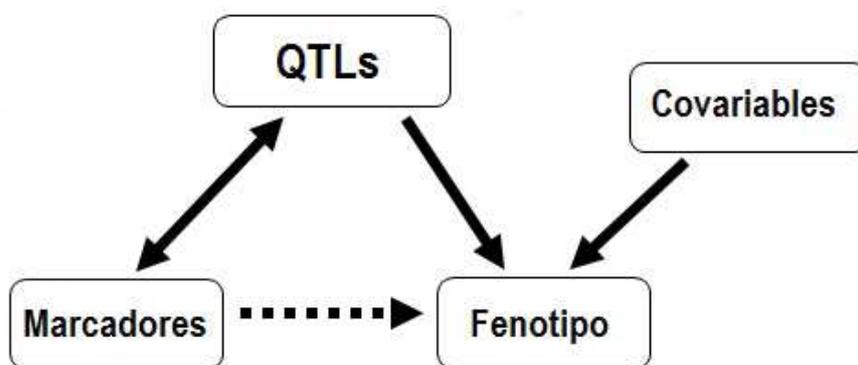


Figura 6. Estructura del análisis estadístico del mapeo de QTLs. Los QTLs y las covariables son los responsables de la variación fenotípica (indicado por la dirección de las flechas solidas). Los marcadores y los QTLs están correlacionados uno con otros debido al ligamiento (indicado por la flecha sólida bidireccional). Los marcadores en general no codifican directamente el fenotipo, estos marcadores pueden ser asociados con el fenotipo vía ligamiento del QTL indicado por la dirección de la flecha punteada (Adaptado de Broman y Sen, 2009).

El análisis de QTL está basado en el principio de que existe una asociación entre el fenotipo y los marcadores (Figura 7). Los marcadores son usados para dividir la población de mapeo en diferentes grupos basados en el genotipo de un marcador en un locus particular y determinar si existen diferencias significativas en las medias fenotípicas de cada grupo. Si los fenotipos difieren significativamente, esto es interpretado como que los QTLs que afectan un determinado rasgo están ligados al marcador usado para subdividir a la población (Collard *et al.* 2005, Tuberosa *et al.*, 2002, Tanksley, 1993).

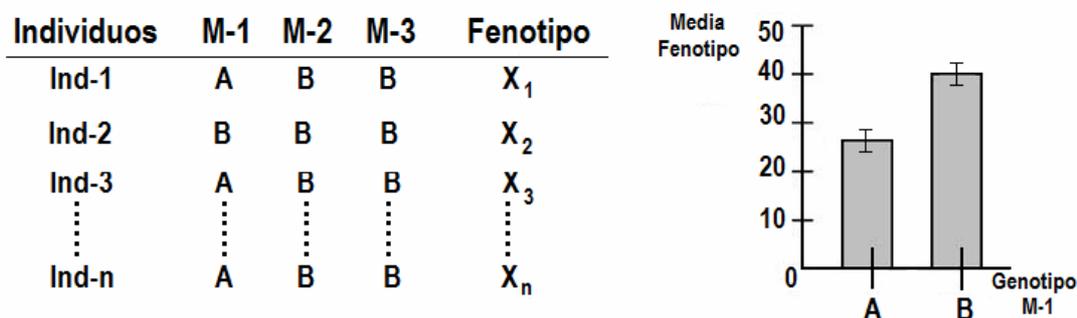


Figura 7. Principios del mapeo de QTLs. Si una población de mapeo se puede particionar de acuerdo al genotipo de un marcador, y esto refleja diferencias significativas en el fenotipo, puede inferirse que el marcador está ligado a un QTL. En el ejemplo, el marcador 1 (M-1) está ligado a un QTL, porque hay diferencias significativas entre las medias de los subgrupos de la población.

1.2.3.1 Métodos para detectar QTLs

Las estrategias de mapeo de QTLs tienen como principal objetivo detectar la presencia de un QTL asociado a un carácter fenotípico determinado. Una vez detectada la asociación entre el QTL y el fenotipo se intenta determinar la región en el genoma donde se ubican los QTLs. Finalmente se trata de estimar el efecto que tiene el QTL sobre el fenotipo. Para lograr estos objetivos se utilizan estrategias de análisis puntuales y análisis por intervalos.

En los análisis puntuales, la hipótesis nula testeada es que la media de los valores fenotípicos es independiente del genotipo del marcador en particular. Si la hipótesis nula es rechazada con cierto nivel de significancia, implica que el QTL está ligado al marcador bajo investigación. Cada asociación marcador-fenotipo, es evaluado independientemente de todos los otros marcadores (Doerge, 2002).

En los análisis puntuales estas asociaciones se determinan mediante análisis de varianza (ANOVA) o regresión lineal. En este tipo de análisis se trata de determinar cuanta de la variación fenotípica observada puede ser explicada por los QTLs ligados al marcador, para ello generalmente se usa el coeficiente de regresión R^2 (Collard *et al.*, 2005).

La desventaja más importante del análisis de regresión simple es que considera la presencia de un solo QTL, es decir no se pueden separar QTLs ligados, no se pueden determinar

las posibles interacciones entre QTLs y se confunde el efecto del QTL con la posición (Broman y Sen, 2009).

Los métodos por intervalos se pueden dividir en dos, mapeo por intervalo simple (SIM) y mapeo por intervalo múltiples (CIM). El SIM utiliza el mapa de ligamiento y analiza simultáneamente los intervalos entre marcadores adyacentes a lo largo del cromosoma. El uso de marcadores ligados en el análisis compensa la recombinación entre los marcadores y el QTL, y es considerado estadísticamente más poderoso si se lo compara con los métodos puntuales ya que permite separar posición de efecto. Sin embargo el análisis de hace de un QTL por vez.

En el CIM utiliza múltiples QTLs (en general ya identificados previamente) para realizar el análisis de interacciones. La principal ventaja del CIM es que es más preciso y efectivo en el mapeo de QTLs comparado con los otros dos métodos anteriores especialmente cuando los QTLs involucrados están ligados. El mapeo por intervalos produce un perfil de los sitios más probables para un QTL entre marcadores ligados adyacentes, en otras palabras el QTL es localizado en el mapa genético (Collard *et al.*, 2005, Tanksley, 1993).

Los resultados del test estadístico para SIM and CIM, son típicamente representados por el LODscore (Figura 8). Estos perfiles de LODscore son usados para identificar la posición más probable del QTL en relación al mapa de ligamiento, la cual coincide con la posición donde el mayor LODscore fue obtenido. El pico máximo que excede un nivel de significancia específico puede ser considerado como un posible QTLs. Para la determinación de los umbrales de significancia en general se usan test de permutación (Broman y Sen, 2009, Jones *et al.*, 1997).

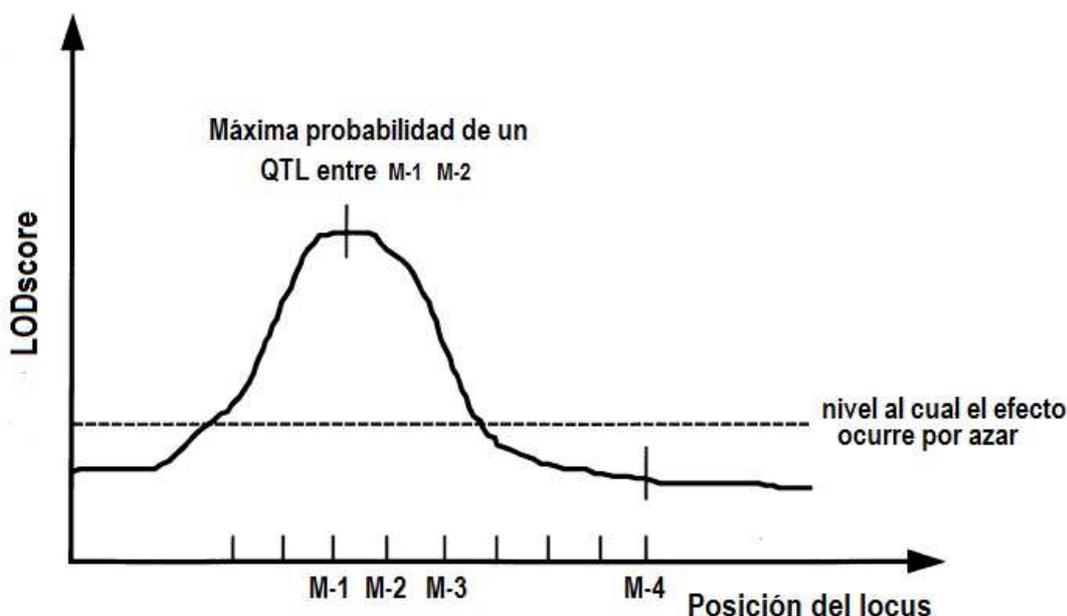


Figura 8. Resultado de un mapeo de QTL por intervalo compuesto (CIM). La línea punteada representa el umbral de significancia determinado por un test de permutación. La posición más probable del QTL es cerca del marcador 1, el mejor intervalo para este QTL es el flanqueado por los marcadores 1 y 2, M-1 y M-2 respectivamente (Adaptado de Jones *et al.*, 1997).

1.2.3.2 Factores que influyen en la detección de QTLs

Si los efectos de los distintos alelos de un QTL difieren en su magnitud o sentido (+/-) en diferentes *backgrounds* genéticos, en diferentes ambientes o entre machos y hembras, entonces el efecto del QTL es dependiente del contexto. Para el caso de la interacción con el ambiente, estos efectos contexto dependientes son formalmente identificados por métodos estadísticos apropiados donde se analiza la interacción genotipo x ambiente (GEI) (Mackay *et al.*, 2009)

La GEI es un fenómeno que ocurre cuando los genotipos responden de manera diferencial a los cambios en el ambiente. El desarrollo de modelos estadísticos para determinar la magnitud de la GEI sobre un rasgo de interés ha sido uno de los principales desafíos en los programas de mejoramiento vegetal durante los últimos años (Hageman *et al.*, 2010). Sin embargo pocos trabajos se han dedicado a la incorporación de GEI en los métodos de detección de QTL, es decir a la expresión diferencial de QTLs en relación a condiciones ambientales cambiantes, los que se conoce como interacción QTL x ambiente (QEI) (Malosetti *et al.*, 2004).

Dentro de los modelos utilizados para la detección de QTLs, los modelos de regresión mixtos son particularmente adecuados en el caso de situaciones complejas como es el modelado de la QEI. La ventaja de la aproximación por modelos mixtos, reside en la posibilidad de modelar la correlación genética subyacente en los datos obtenidos en distintos ambientes, lo que permite testear el efecto del QTL en ellos. Esta estrategia en el mapeo de QTLs es importante en estudios de tolerancia al estrés (Malosetti *et al.*, 2011).

1.3 LEGUMINOSAS MODELOS: HERRAMIENTAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS COMPONENTES ASOCIADOS A LA TOLERANCIA A ESTRÉS ABIÓTICOS

Con más de 700 géneros y 20.000 especies, las leguminosas pertenecen a una de las familias más numerosa dentro de las Angiospermas. Junto a las gramíneas, las leguminosas incluyen a los cultivos de mayor importancia económica en la producción agropecuaria por su capacidad de producir proteínas, carbohidratos y aceites, tanto para consumo humano como animal (Singh *et al.*, 2007).

Las leguminosas son claves en la agricultura sustentable debido a su capacidad de fijar nitrógeno en asociación con bacterias fijadoras de nitrógeno, colectivamente denominadas rizobios, lo que constituye una ventaja en los cultivos en suelos poco fértiles. La producción de la carne y leche se basa fundamentalmente en el uso de leguminosas como forraje, ya que son la principal fuente de proteínas, fibras y energía (Graham y Vance, 2003).

Las leguminosas pueden ser divididas en tres subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae. La subfamilia Papilionoideae contiene a casi todos los cultivos económicamente importantes, desde de los cultivos de granos como: soja (*Glycine max*), maní (*Arachis hypogaea*), lenteja (*Lens culinaris*), poroto (*Phaseolus vulgaris*), arveja (*Pisum sativum*), hasta cultivos forrajeros como: alfalfa (*Medicago sativa*), Trébol (*Trifolium pratense*) y Lotus (*Lotus corniculatus*). A pesar de estar filogenéticamente muy relacionadas, estas especies difieren enormemente en el tamaño del genoma, en número de cromosomas, niveles de poliploidía, y niveles de autocompatibilidad (Figura 9) (Udvardi *et al.*, 2005, Zhu *et al.*, 2005, Doyle y Luckow, 2003).

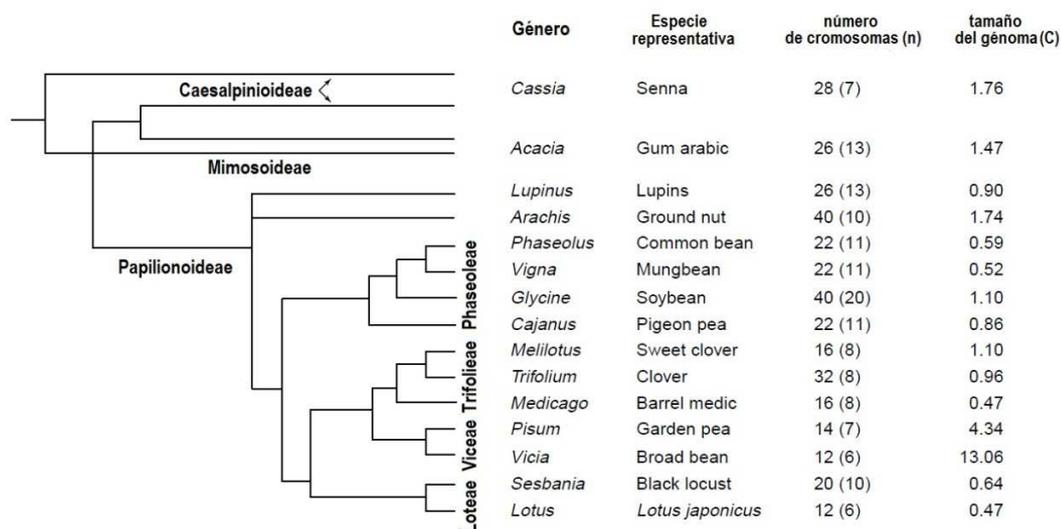


Figura 9. Filogenia de leguminosas. Se muestran las tres subfamilias, con especies representativas, particularmente de Papilionoideae (Adaptado de Udvardi *et al.*, 2005).

En general las leguminosas cultivables no son buenos sistemas modelo para estudios genéticos y genómicos, porque en general poseen genomas de gran tamaño, muchas son tetraploides y la mayoría son recalcitrantes a la transformación.

Debido a esto *Medicago truncatula* (nodulación indeterminada) y *Lotus japonicus*, (nodulación determinada) han sido adoptadas como leguminosas modelos (Udvardi *et al.*, 2005). Como especie modelo *L. japonicus* presenta numerosas ventajas: ciclo corto de 3 meses, genoma pequeño ($2n=12$; $1C=466$ Mbp), autogamia, gran producción de flores y semillas, alta transformabilidad mediante *Agrobacterium*, gran número de EST (*expressed sequences tag*), *cDNA clones*, mapas de ligamiento, y en la actualidad su genoma está completamente secuenciado (Sato *et al.*, 2008, Gondo *et al.*, 2007, Pajuelo *et al.*, 2005).

En numerosos trabajos se ha demostrado la conservación de la estructura genómica (sintenia) entre las leguminosas modelos y las cultivables (Nelson *et al.*, 2010, Tsubokura *et al.*, 2008, Zhu *et al.*, 2005) esto sugiere que la información generada en *L. japonicus* puede ser utilizada en los programas de mejoramiento de leguminosas cultivables.

L. japonicus es una leguminosa salvaje muy relacionada con otras especies del género Lotus como *L. corniculatus*, *L. glaber* y *L. uliginosus*, las cuales son usadas como forraje de alto valor nutritivo (Szczyglowski y Stougaard, 2008). Dos ecotipos de *L. japonicus* (Gifu y MG20) y dos especies relacionadas *L. filicaulis* y *L. burtii* han sido propuestas como líneas parentales para el estudio de varios aspectos genéticos (Sandal *et al.*, 2006, Kawaguchi *et al.*, 2005, Sandal *et al.*, 2002, Jiang y Gresshoff, 1997, Handberg y Stougaard, 1992).

1.3.1 Genoma de *Lotus japonicus*

En los últimos años el análisis genético y genómico de *L. japonicus* ha progresado rápidamente. Esto incluye la secuenciación del genoma a gran escala, la generación de marcadores moleculares y construcción de mapas de ligamiento de alta densidad (Ohmido *et al.*, 2010, Sandal *et al.*, 2006).

El bajo número de cromosomas de *L. japonicus* ($n = 6$) facilitó la identificación de grupos de ligamientos, actualmente existen dos mapas de ligamiento de alta densidad reportados para *L. japonicus*. El primero está basado en la cruce intraespecífica de *L. japonicus* Gifu x *L. japonicus* MG20 (Sato y Tabata, 2006), el segundo fue obtenido a partir de la cruce interespecífica *L. filicaulis* x *L. japonicus* Gifu (Sandal *et al.*, 2002). Adicionalmente un tercer mapa fue establecido a partir de la cruce interespecífica de *L. japonicus* Gifu x *L. burtii*. Y actualmente este mapa está en proceso de construcción (Kawaguchi *et al.*, 2005).

Estos mapas fueron integrados usando un set de marcadores fijos *anchor marker* que fueron generados durante el proyecto de secuenciación del genoma. Esta integración de los mapas permitió la alineación de ciertos loci, lo cual facilita la transferencia de información entre los mapas, especialmente en regiones donde la falta de recombinación o altas distorsiones de segregación limitan la resolución genética en algunas de las cruces. Así las especies diploides *L. japonicus*, *L. filicaulis* y *L. burtii* forman un “triángulo” para investigaciones en genética molecular de Lotus (Sandal *et al.*, 2006, Sato y Tabata., 2006, Kawaguchi *et al.*, 2005, Udvardi *et al.*, 2005).

1.3.1.1 Secuencias de expresión y transcriptómica

Con el objetivo de analizar la estructura del genoma de *L. japonicus* hace varios años que se viene desarrollando un proyecto de secuenciación a gran escala. Para este propósito se han utilizado varias tecnologías que incluyen construcción de librerías genéticas, secuenciación de DNA, hibridización por fluorescencia *in situ* (FISH), mapeo genético y herramientas bioinformáticas. Estas estrategias han permitido aislar e identificar secuencias ESTs, cDNAs, segmentos de genes y construir TAC (*transformation-competent artificial chromosome*) (Sato *et al.*, 2008, Udvardi *et al.*, 2005).

Actualmente el 67% del genoma físico de *L. japonicus* se encuentra secuenciado esto representa el 91.3% del espacio intergénico. Este avance en el escaneo del genoma de *L. japonicus* ha permitido registrar en bases de DNA públicas más de 120.000 ESTs agrupados en 28.460 secuencias únicas, incluidas 12.485 secuencias consenso (TCs). En total el 41% de las secuencias han sido posicionadas en el mapa genético y se espera que esta proporción aumente sustancialmente con la continua detección de SNP (*single-nucleotide polymorphism*) (Szczyglowski y Stougaard, 2008, Sato y Tabata, 2006).

Las ESTs y las TCs pueden ser consultadas en el website de Kazusa DNA Research Institute (www.kazusa.or.jp) y en el Institute for Genomic Research (TIGR) Gene Index database (www.tigr.org). A su vez, los correspondientes clones de cDNA fueron usados para construir *arrays* de DNA para análisis de transcriptómica (Sato *et al.*, 2008, Sato y Tabata., 2006).

1.3.1.2 Poblaciones de mapeo en especies modelo de *Lotus spp.*

Los mapas genéticos fueron desarrollados a partir de poblaciones F2 en cada una de las cruces. A partir de estas F2, se han desarrollado poblaciones RILs, de la descendencia de una única semilla hasta la generación F8.

Hasta el momento, se obtuvieron 79 RILs a partir de la cruce *L. filicaulis* x *L. japonicus* Gifu, 108 marcadores microsatélites fueron usados para mapear esta población. Los datos del mapa genético están disponibles en <http://www.Lotusjaponicus.dk> (Sandal *et al.*, 2006). Un total

de 205 RILs se obtuvieron a partir de la cruce de *L japonicus* MG20 x *L japonicus* Gifu, y 32 marcadores microsatélites se utilizaron para mapear este cruzamiento, el mapa genético está disponible en <http://www.kazusa.or.jp>. Un total de 174 RILs se obtuvieron a partir de la cruce de *L japonicus* Gifu x *L. burttii* y 83 marcadores microsatélites están siendo analizados para la construcción del mapa genético (Kawaguchi *et al.*, 2005).

1.4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.4.1 Hipótesis

1. *L. japonicus* y *L. burttii* presentan diferencias en la respuesta de los parámetros de crecimiento y desarrollo frente a condiciones de estrés salino/osmótico.
2. El fenotipado de una población de mapeo RILs de *L japonicus* Gifu x *L. burttii* en condiciones estandarizadas y controladas de estrés salino y osmótico permite:
 - a. establecer diferencias significativas en las respuestas de crecimiento y desarrollo frente a condiciones de estrés salino/osmótico
 - b. identificar QTLs asociados a las diferentes respuestas de crecimiento y desarrollo frente a condiciones de estrés salino/osmótico.

1.4.2 Objetivos

1.4.2.1 **Objetivo general**

Identificar marcadores fisiológicos y genéticos en estrés salino y osmótico en especies modelos de Lotus que puedan ser aplicados en programas de mejoramiento asistido por marcadores de especies de Lotus de interés agronómico.

1.4.2.2 **Objetivos específicos:**

1. Establecer condiciones de intensidad y tiempo de estrés salino y osmótico que permitan diferenciar las respuestas de los genotipos parentales *L japonicus* Gifu, *L japonicus* MG20 y *L. burttii*.
2. Caracterizar las respuestas de crecimiento y desarrollo en condiciones de estrés salino y osmótico de RILs de *L japonicus* Gifu x *L. burttii* e identificar QTLs asociados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2 EVALUACIÓN DE LÍNEAS PURAS DE *Lotus spp.*

2.2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se usaron tres genotipos del género *Lotus*: *Lotus japonicus* B-129-S9 Gifu (Stougaard y Beuselinck, 1996) de ahora en adelante *Lj. Gifu*, *L. japonicus* Miyakojima MG20 (Kawaguchi, 2000) de ahora en adelante *Lj. MG20* y *L. burtii* B-303-S9 (Kawaguchi *et al.*, 2005) de ahora en adelante *L. burtii*. Las semillas fueron provistas por la Ing. Agr. Mónica Rebuffo (INIA La Estanzuela, Uruguay).

Las semillas fueron escarificadas mecánicamente con papel lija fino N°2, y luego desinfectadas durante 1 min en etanol al 70% (v/v), luego se hicieron 6 enjuagues con agua seguidos por la inmersión en un solución 20 % (v/v) de hipoclorito de sodio comercial (55 mg de Cloro activo) y 0.1% Tween-20 durante 10 min. Después de 6 lavados con agua estéril, se dejaron durante 3-4 h en agua estéril, y se cultivaron en placas de Petri con 8% agar - agua donde permanecieron hasta el traspaso a cada sistema de cultivo. En cada sistema, las plántulas se dejaron crecer durante 7 días (período de aclimatación) en medio Broughton y Dilworth (1971) (medio B&D) antes de aplicar los tratamientos de estrés.

Todos los sistemas de cultivos fueron mantenidos en cámara de crecimiento a 28 °C con un fotoperiodo de 16 h luz de 150 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la humedad relativa ambiente se mantuvo en un 70 %.

2.3 SISTEMAS DE CULTIVO

2.3.1 Sistema de placas

Las semillas germinadas fueron transferidas a placas de Petri plásticas de 14 cm de diámetro con medio B&D solidificado con 8% de agar, estéril (Figura 11A y B). Luego del período de aclimatación, las plantas fueron transferidas a placas de Petri suplementadas con 0, 50 y 150 mM de NaCl. En cada placa se colocó un promedio de 20 plantas al momento del trasplante.

Los datos se tomaron a los 0, 7 y 14 días de tratamiento (7, 14 y 21 días desde el cultivo de las semillas respectivamente, Figura 10).

2.3.2 Sistema de pouches

Las semillas germinadas fueron transferidas a bolsas flexibles, *pouch*, (18 x 16.5 cm, Mega International, USA) con 20 mL de medio B&D líquido. Los *pouches* fueron colocados de forma vertical en un organizador, y se mantuvo oscura la zona radicular (Figura 11C y D).

Los tratamientos 0, 50 y 150 mM de NaCl fueron aplicados bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. En cada *pouch* (repetición) se colocaron en promedio 8 plantas al momento del trasplante. El cronograma de la toma de datos y la aplicación de tratamientos se describe en el apartado 2.3.1 y se muestra en la Figura 10.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron modelos mixtos con el siguiente modelo lineal con submuestreo:

$$Y = \text{genotipo} + \text{tratamiento} + \text{genotipo} * \text{tratamiento} + \text{pouch},$$

dónde Y es la variable analizada, y *pouch* fue considerado con efecto aleatorio para evaluar el error de submuestreo. Luego se realizó un análisis de varianza para determinar si hay diferencias significativas entre los tratamientos, los genotipos y la interacción entre ambos. Las medias se ajustaron para las combinaciones de tratamiento por genotipo.



Figura 11. Sistemas de cultivos utilizados. A y B) Sistema de placas. C y D) Sistema de *pouches*. E y F) Sistema de hidroponía. G y H) Sistema de macetas.

Luego se utilizó un test de comparación de medias en base al estadístico de Tukey, para lo cual se calculó un valor crítico (diferencia mínima significativa, DMS) para la identificación de diferencias significativas.

2.3.3 Sistema de hidroponía

Las semillas germinadas fueron transferidas a un sistema de cultivo en hidroponía con aireación continua. En cada bandeja de cultivo de 400 mL (repetición), se colocaron en promedio 20 plantas en el momento del trasplante (Figura 11E y F). En este sistema se aplicaron tratamientos con NaCl (estrés iónico y osmótico) y tratamientos con polyetilenglycol (PEG) (sólo estrés osmótico). Todos los tratamientos se aplicaron en medio B&D líquido luego del período de aclimatación. Las concentraciones de NaCl ensayadas fueron 0 y 150 mM, mientras que la concentración de PEG fue del 15 % p/v la que produce una presión osmótica de (-0.85 MPa).

Los genotipos *Lj. Gifu* y *L. burttii* fueron evaluadas en un mismo ensayo, el cronograma de la toma de datos y la aplicación de tratamientos se describe en el apartado 2.3.1 (Figura 10). El genotipo *Lj. MG20* se evaluó en un ensayo diferente y los datos se tomaron a los 7 y 14 días de tratamiento (14 y 21 días desde el cultivo respectivamente, Figura 10).

Ambos ensayos de hidroponía se realizaron bajo un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones por tratamiento. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó un modelo lineal con submuestreo:

$$Y = \text{bloque} + \text{tratamiento} + \text{bandeja},$$

dónde Y es la variable analizada y la bandeja fue considerada con efecto aleatorio para evaluar el error de submuestreo. El análisis de los datos se hizo según lo descrito en la sección 2.3.2.

2.3.4 Sistema de macetas

Las semillas germinadas fueron transferidas a macetas de plástico de 250 mL que se regaron por subirrigación con medio B&D líquido. Como sustrato se usó vermiculita expandida de granulometría media (Figura 11G y H).

2.3.4.1 Ensayo a corto plazo

En este ensayo solo se evaluó la línea *Lj. MG20*. Las concentraciones de NaCl evaluadas fueron 0, 50 y 150 mM, el cronograma de la toma de datos y la aplicación de tratamientos se describe en el apartado 2.3.1 y Figura 10. Los tratamientos fueron aplicados bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. En cada maceta (repetición) se colocaron en promedio 5 plantas en el momento del trasplante.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron modelos mixtos con el siguiente modelo lineal con submuestreo:

$$Y = \text{tratamiento} + \text{maceta},$$

dónde Y es la variable analizada, la maceta fue considerada con efecto aleatorio para evaluar el error de submuestreo. Las medias se ajustaron para las combinaciones de tratamiento. El análisis de los datos se hizo según lo descrito en la sección 2.3.2.

2.3.4.2 Ensayo a largo plazo

Las concentraciones NaCl evaluadas fueron 0, 50 y 150 mM. Los datos fueron tomados a los 60 días de tratamiento. Los tratamientos antes mencionados fueron aplicados bajo un diseño completamente al azar con 3 repeticiones por tratamiento. En cada maceta (repetición) se colocaron en promedio 5 plantas en el momento del trasplante.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron modelos mixtos con el siguiente modelo lineal con submuestreo:

$$Y = \text{genotipo} + \text{tratamiento} + \text{genotipo} * \text{tratamiento} + \text{maceta},$$

dónde Y es la variable analizada y la maceta fue considerada con efecto aleatorio para evaluar el error de submuestreo. Las medias se ajustaron para las combinaciones de tratamiento por genotipo. El análisis de los datos se hizo según lo descrito en la sección 2.3.2.

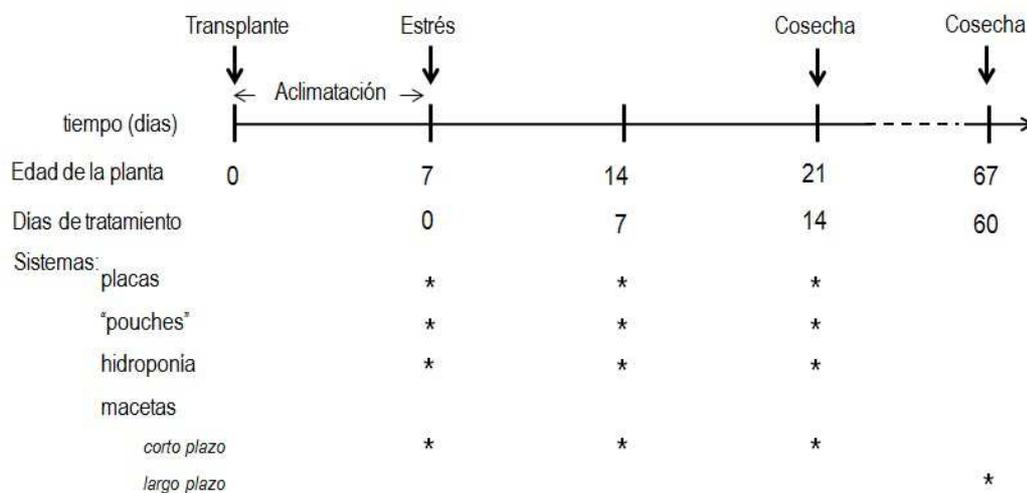


Figura 10. Cronograma de aplicación de tratamientos en los sistemas de cultivos ensayados. * Toma de datos en cada sistema.

2.4 PARÁMETROS EVALUADOS

2.4.1 Parámetros de crecimiento y desarrollo

Los datos fueron tomados de manera no destructiva mediante la toma de fotografías. Para el análisis de imágenes se usó el software libre ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2011). Para el cálculo de los parámetros de crecimiento y desarrollo se usó la longitud de tallo, raíz y total.

2.4.1.1 Parámetros de crecimiento

Crecimiento Absoluto (CA): fue calculado con la ecuación:

$$CA = L_f - L_i,$$

donde L_f y L_i , son medidas de la longitud final e inicial respectivamente.

Tasa de Crecimiento Relativo (TCR): fue calculada con la ecuación:

$$TCR = \ln L_f - \ln L_i / t_2 - t_1,$$

donde L_f y L_i , son medidas de longitud final e inicial respectivamente, t_2 y t_1 son tiempo final en inicial respectivamente.

2.4.1.2 Parámetros de desarrollo

Relación Tallo/Raíz (RTR): La RTR fue calculada con la ecuación:

$$RTR = L_t / L_r,$$

donde L_t es la longitud del tallo y L_r es la longitud de la raíz.

Tasa de Desarrollo Foliar (TDF): La TDF fue calculada con la ecuación:

$$TDF = n^\circ \text{ de trifolios} / d,$$

dónde d es el número de días desde el cultivo.

Nº de trifolios por tallo (Nt/T): Este parámetro fue calculado con la ecuación:

$$Nt/T = n^\circ \text{ de trifolios} / \text{longitud de tallo}.$$

2.5 EVALUACIÓN DE LÍNEAS RECOMBINANTES PURAS

2.5.1 Material Vegetal y condiciones de crecimiento

Como población de mapeo se usaron líneas recombinantes puras (RILs, *recombinant inbred line*) producto del cruzamiento interespecífico de *L. burttii* x *Lj. Gifu* (Kawaguchi *et al.*, 2005). Las semillas utilizadas fueron suministradas por la Ing. Agr. Mónica Rebuffo (INIA La Estanzuela, Uruguay). La escarificación, desinfección y cultivo de las semillas, así como las condiciones ambientales de crecimiento se describen en el apartado 2.2.1.

2.5.2 Sistema de hidroponía

Las semillas germinadas fueron transferidas a un sistema de cultivo en hidroponía (descrito en el apartado 2.3). Los tratamientos aplicados fueron 0 y 150 mM de NaCl o 15 % p/v de PEG, en medio B&D líquido. Los datos fueron tomados a los 7 y 14 días de tratamiento (14 y 21 días desde el cultivo, respectivamente) (Figura 10).

Para evaluar la población de RILs se utilizó una muestra aleatoria de 100 líneas de una población de mapeo de 171 líneas en total. Se utilizó un diseño de bloques incompletos con arreglo factorial de los genotipos y los tratamientos de estrés. Donde cada bloque incompleto corresponde a una bandeja con 30 genotipos a los que se les asignó un tratamiento de estrés.

Los parámetros medidos fueron TCRt, TCRr, TCRtotal y RTR, los mismos se describen en el apartado 2.4.1.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizaron modelos mixtos con el siguiente modelo lineal:

$$Y_{ijk} = B_i + R_j + e_{ijk}$$

dónde Y_{ijk} es la observación para la variable medida, B_i es i-esimo bloque incompleto, R_j es la j-esima RIL, e_{ijk} son los errores asociados a cada una de las k-esimas plantas que se midieron. Se definió B_i como efecto aleatorio en el i-esimo bloque incompleto, perteneciente a la j-esima línea RIL y R_j como efecto fijo.

2.5.3 Genotipado

2.5.3.1 Marcadores moleculares y Mapa de ligamiento

Se trabajó sobre un mapa genético consistente en seis grupos de ligamiento que corresponden a los seis cromosomas de *Lotus japonicus* según lo descrito por Sandal *et al.*, (2002) y Pedrosa *et al.*, (2002). La información de los marcadores moleculares está disponible en el sitio <http://www.kasuzo.or.jp/lotus/>.

Para cada marcador se analizó la distorsión de segregación usando un test chi cuadrado para la desviación de la segregación esperada 1:1 en una población RILs. El mapa de ligamiento fue verificado usando el software R/qtl (Broman *et al.*, 2003) usando un valor de LOD= 3 y una fracción de recombinación $r = 1/2$. Las fracciones de recombinación fueron convertidas a centiMorgans (cM) usando la función de mapeo Haldane (Margarido *et al.*, 2007).

2.5.3.2 Análisis de QTLs

En primera instancia se detectaron marcadores asociados a cada variable en cada uno de los tratamientos ensayados. Luego se utilizaron esos marcadores como covariables en el análisis de QTL x Ambiente. El mapeo de QTLs en cada ambiente fue llevado a cabo en R/qtl (Broman y Senn, 2009). El mapeo de QTL conjunto para todos los ambientes y la estimación de

efectos fue realizado con implementaciones propias en R (Gutiérrez *et al.*, com. pers. 22 de diciembre 2010) considerando la matriz de simetría compuesta como matriz de varianzas y covarianzas entre ambientes.

El análisis se hizo con las medias estimadas de todas las variables medidas en las 46 RILs. El método de mapeo por intervalo compuesto (CIM) con cofactores (Jansen y Stam, 1994) fue usado para detectar, mapear y caracterizar a los QTLs. Para declarar un posible QTL, un P valor mínimo fue fijado, asegurándose un nivel de significancia del 5 %. La distancia entre pseudo-marcadores fue de 2 cM y el intervalo entre los marcadores de flaqueo fue de 10 cM.

3 RESULTADOS

3.1 SISTEMAS DE CULTIVO

Para establecer una estrategia experimental que permita evaluar el crecimiento y desarrollo en *Lotus*, se usó como modelo a *Lj. MG20* cultivado en cuatro sistemas experimentales: placas de Petri, *pouch*, bandejas para sistema de hidroponía y macetas de con vermiculita. En todos los sistemas se utilizó medio B&D como solución nutritiva.

Para la variable Crecimiento Absoluto de tallo (CA_t) la respuesta observada en placas y *pouches* fue similar, mientras que en hidroponía la respuesta fue similar a la observada en macetas. A su vez, en placas y *pouches*, el CA_t fue marcadamente menor al alcanzado en hidroponía y macetas (Figura 12A).

Por otra parte, cuando se analizó el Crecimiento Absoluto de raíz (CA_r) y el Crecimiento Absoluto total (CA_{total}) se observó que estos parámetros fueron mayores en macetas respecto a los otros tres sistemas (Figura 12B y C).

En cuanto a los parámetros de desarrollo evaluados se observó que el número de trifolios producidos por las plantas crecidas en placas fue menor respecto al alcanzado en los otros tres sistemas (Figura 13A), mientras que la mayor Relación Tallo/Raíz (RTR) se obtuvo en plantas crecidas en hidroponía (Figura 13B).

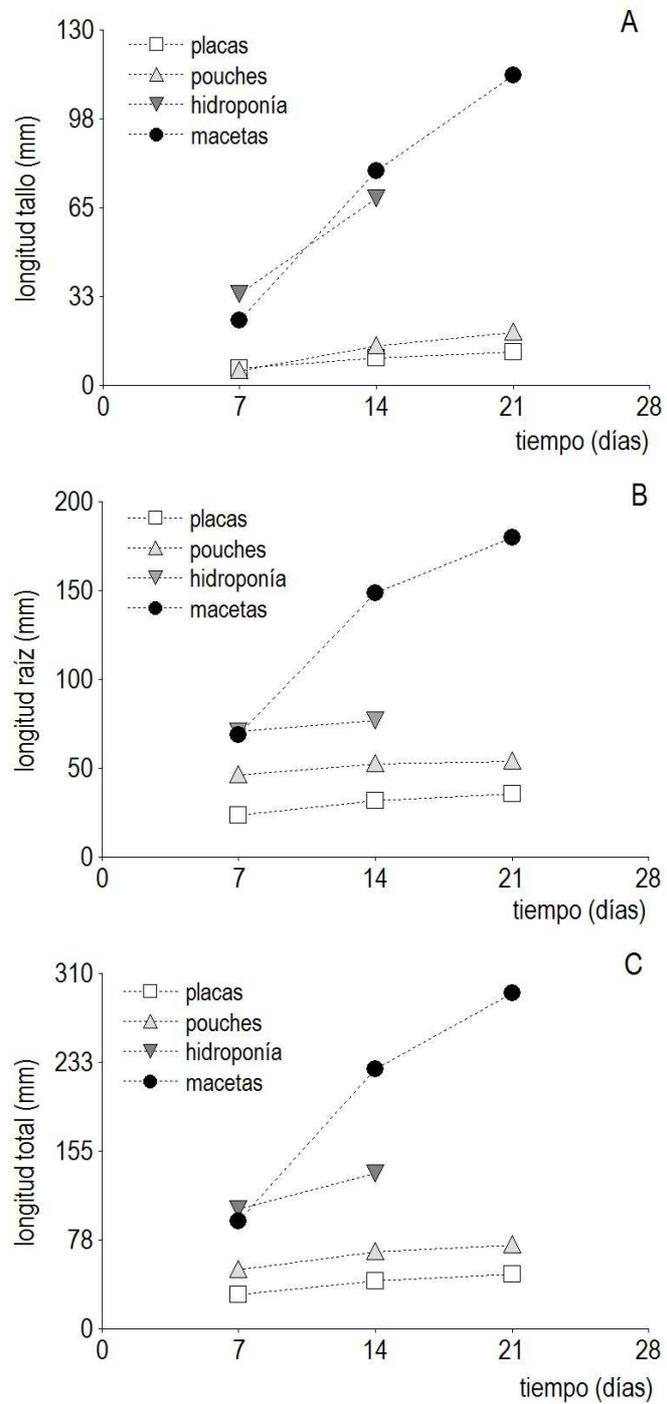


Figura 12. Crecimiento de *Lj.MG20* en los distintos sistemas utilizados. A) longitud de tallo, B) longitud de raíz, C) longitud total. Los valores son las medias ajustadas de cada variable en cada sistema

La Tasa de Desarrollo Foliar (TDF) aumentó en los tiempos iniciales de cada ensayo, este patrón de respuesta fue similar en todos los sistemas evaluados (Figura 13C). Al comparar el número de trifolios por unidad de longitud de tallo (Nt/T) fue similar en todos los sistemas de cultivo evaluados pero en los primeros días de crecimiento en *pouches*, hubo una caída en el Nt/T (Figura 13D).

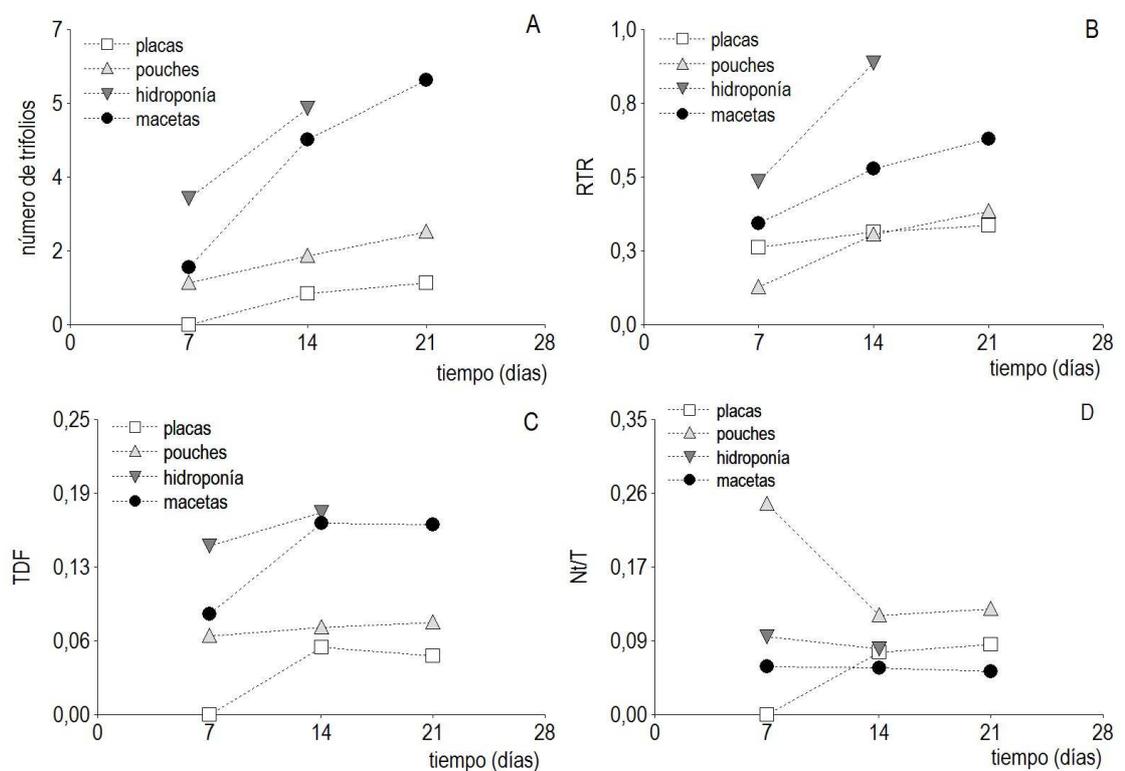


Figura 13. Desarrollo de *Lotus japonicus* MG20 en los distintos sistemas utilizados. A) RTR: Relación Tallo/Raíz, B) TDF: Tasa de Desarrollo Foliar, C) Nt/T: número de trifolios/longitud de tallo. Los valores son las medias ajustadas de cada variable en cada sistema.

3.1.1 Sistema de placas

En el sistema de placas se evaluaron tres genotipos de *Lotus*: *L. burttii*, *Lj. Gifu* y *Lj. MG20*. Estos fueron cultivados en medio B&D sólido con 0, 50 y 150 mM de NaCl durante 14 días.

Cuando se comparó la Tasa de Crecimiento Relativo de tallo (TCRt) se observó que en *L. burttii* y *Lj. Gifu* la aplicación de NaCl 150 mM produjo un descenso de la TCRt tanto a los 7 como a los 14 días. En el caso de *Lj. MG20* este efecto se vio solo a los 14 días (Cuadro 2).

Cuadro 2. Crecimiento de tres genotipos de *Lotus* cultivados en placas de Petri en tres concentraciones de NaCl. Los valores corresponden a las medias de cada tasa. El tiempo corresponde a los 7 y 14 días transcurridos desde la aplicación del NaCl.

Línea	Tiempo	TCRt [†]			TCRr ^{††}			TCR total ^{†††}		
		0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM
<i>L. burttii</i>	7 d	0,049	0,048	0,025	0,007	0,012	0,011	0,285	0,239	0,206
<i>Lj. Gifu</i>		0,089	0,115	0,042	0,035	0,008	0,005	0,293	0,284	0,223
<i>Lj. MG20</i>		0,081	0,085	0,090	0,049	0,052	0,035	0,319	0,312	0,282
<i>L. burttii</i>	14 d	0,045	0,036	0,032	0,001	0,017	0,016	0,013	0,024	0,021
<i>Lj. Gifu</i>		0,019	0,005	0,011	0,019	0,006	0,009	0,019	0,006	0,010
<i>Lj. MG20</i>		0,026	0,024	0,001	0,017	0,002	0,039	0,019	0,008	0,028

†TCRt: tasa crecimiento relativo de tallo, ††TCRr: tasa crecimiento relativo de raíz, †††TCRtotal: tasa crecimiento relativo total.

La Tasa de Crecimiento Relativo de raíz (TCRr) de *L. burttii* se incrementó con las dos concentraciones de NaCl en ambos tiempos. Mientras que en *Lj. Gifu* el NaCl produjo un descenso de la TCRr este efecto fue negativo (Cuadro 2). A los 14 días en NaCl 50 mM también disminuyó la TCRr de *Lj. MG20*, a diferencia de lo que ocurrió en NaCl 150 mM donde la TCRr se estimuló por el NaCl (Cuadro 2). Al analizar la Tasa de Crecimiento Relativo total (TCRtotal) se observó que a los 14 días, el NaCl estimula el crecimiento de *L. burttii* e inhibe el de *Lj. Gifu*. En el caso de *Lj. MG20* la respuesta de la TCRtotal fue similar a la descrita para la TCRr en este tiempo (Cuadro 2).

Al evaluar el efecto del NaCl sobre los distintos parámetros de desarrollo se observó que la RTR aumentó en los tres genotipos en presencia de NaCl, tanto a los 7 como a los 14 días (Cuadro 3). La TDF y el Nt/T de *Lj. MG20* disminuyeron en NaCl 150 mM en ambos tiempos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Desarrollo de tres genotipos de *Lotus* cultivados en placas de Petri en tres concentraciones de NaCl. El tiempo corresponde a los 7 y 14 días transcurridos desde la aplicación del NaCl. Los valores corresponden a las medias de cada tasa.

Línea	Tiempo	RTR [†]			TDF ^{††}			Nt / T ^{†††}		
		0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM
<i>L. burttii</i>	7 d	0,320	0,470	0,510	0,077	0,077	0,077	0,151	0,117	0,151
<i>Lj. Gifu</i>		0,414	0,569	0,512	0,077	0,074	0,077	0,113	0,103	0,150
<i>Lj. MG20</i>		0,316	0,345	0,462	0,057	0,067	0,004	0,074	0,081	0,006
<i>L. burttii</i>	14 d	0,434	0,535	0,571	0,050	0,050	0,050	0,110	0,091	0,120
<i>Lj. Gifu</i>		0,415	0,564	0,520	0,050	0,050	0,050	0,099	0,104	0,139
<i>Lj. MG20</i>		0,337	0,403	0,355	0,050	0,050	0,011	0,083	0,079	0,026

[†]RTR: Relación longitud tallo/ longitud raíz, ^{††}TDF: tasa de desarrollo foliar expresada en d⁻¹, ^{†††}Nt/T: número de trifolios sobre longitud de tallo.

3.1.2 Sistema de *pouches*

En el sistema de *pouches* se evaluaron tres genotipos de *Lotus*: *L. burttii*, *Lj. Gifu* y *Lj. MG20*. Estos fueron cultivados en medio B&D líquido con NaCl 0, 50 y 150 mM durante 14 días.

A los 7 días el NaCl inhibió la TCRt en los tres genotipos. En este tiempo, la menor TCRt de *Lj. Gifu* ocurrió en NaCl 50 mM mientras que en *L. burttii* y *Lj. MG20* la menor TCRt se observó en NaCl 150 mM (Cuadro 4). A los 14 días el NaCl inhibió la TCRt de *L. burttii*, mientras que en *Lj. Gifu* este efecto sólo ocurrió a 50 mM de NaCl. En el caso de *Lj. MG20* el NaCl indujo la TCRt tanto en 50 mM como en 150 mM (Cuadro 4).

A los 7 días el NaCl inhibió la TCRr de *L. burttii* y de *Lj. Gifu*, mientras que en este tiempo, el NaCl estimuló la TCRr de *Lj. MG20* (Cuadro 4). A los 14 días el NaCl 150 mM inhibió la

TCRr de *L. burttii*. En *Lj. Gifu* este efecto se observó en 50 mM y en 150 mM. En cambio la TCRr de *Lj. MG20* fue estimulada por el NaCl en ambas concentraciones (Cuadro 4).

La TCRtotal de *L. burttii* y *Lj. Gifu* disminuyó en NaCl 150 mM en los dos tiempos ensayados (Cuadro 4). En *Lj. MG20* el NaCl no tuvo efecto sobre la TCRtotal a los 7 días, pero tuvo efecto positivo a los 14 días (Cuadro 4).

Cuadro 4. Crecimiento de tres genotipos de *Lotus* cultivados en *pouches* en tres concentraciones de NaCl. El tiempo corresponde a los 7 y 14 días transcurridos desde la aplicación del NaCl. Los valores corresponden a las medias ajustadas de cada variable.

Línea	Tiempo	TCRt [†]			TCRr ^{††}			TCRtotal ^{†††}		
		0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM
<i>L. burttii</i>		0,104 e	0,086 d	0,061 b	0,021 e	0,009 b	0,006 a	0,037 de	0,031 c	0,021 b
<i>Lj. Gifu</i>	7 d	0,160 g	0,042 a	0,072 c	0,032 g	0,012 c	0,010 bc	0,057 f	0,016 a	0,021 b
<i>Lj. MG20</i>		0,149 f	0,063 bc	0,047 a	0,015 d	0,026 f	0,034 g	0,036 d	0,036 d	0,040 e
<i>L. burttii</i>		0,083 d	0,063 c	0,021 a	0,020 d	0,017 d	0,006 ab	0,036 d	0,033 d	0,010 ab
<i>Lj. Gifu</i>	14 d	0,097 f	0,068 c	0,090 e	0,033 e	0,006 abc	0,010 bc	0,055 f	0,005 a	0,026 c
<i>Lj. MG20</i>		0,044 b	0,091 ef	0,119 g	0,004 a	0,029 e	0,040 f	0,014 b	0,042 e	0,058 f

† TCRt: tasa de crecimiento relativo de tallo, ††TCRr: tasa de crecimiento relativo de raíz en d⁻¹, †††TCRtotal: tasa de crecimiento relativo total.

La RTR de *L. burttii* se incrementó en presencia del NaCl a los 7 y 14 días, mientras que en *Lj. Gifu* disminuyó (Cuadro 5). En *Lj. MG20*, la RTR no mostro una respuesta definida al NaCl a los 7 ni a los 14 días (Cuadro 5). En NaCl 150 mM la TDF de *L. burttii* disminuyó en los dos tiempos ensayados, mientras que la TDF de en *Lj. Gifu* y *Lj. MG20* aumento en NaCl 150 mM en los dos tiempos ensayados (Cuadro 5).

A los 7 y 14 días el Nt/T de *L. burttii* disminuyó en presencia de NaCl, mientras que tanto en *Lj. Gifu* está disminución se observó solo a los 14 días. En *Lj. MG20* el Nt/T aumentó en presencia de NaCl en ambos tiempos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Desarrollo de tres genotipos de *Lotus* cultivados en pouches en tres concentraciones de NaCl. El tiempo corresponde a los 7 y 14 días transcurridos desde la aplicación del NaCl. Los valores corresponden a las medias ajustadas de cada variable.

Línea	Tiempo	RTR [†]			TDF ^{††}			Nt/T ^{†††}		
		0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM
<i>L. burtii</i>		0,289 e	0,492 h	0,446 g	0,114 d	0,109 c	0,081 b	0,185 d	0,123 b	0,131 c
<i>Lj. Gifu</i>	7 d	0,446 g	0,102 b	0,075 a	0,079 b	0,108 c	0,129 e	0,218 g	0,252 h	0,207 e
<i>Lj. MG20</i>		0,306 f	0,199 c	0,250 d	0,074 a	0,133 f	0,136 f	0,118 a	0,215 f	0,358 i
<i>L. burtii</i>		0,416 c	0,660 f	0,485 e	0,116 d	0,115 d	0,076 a	0,152 c	0,114 a	0,134 b
<i>Lj. Gifu</i>	14 d	0,658 f	0,172 a	0,170 a	0,108 c	0,088 b	0,127 e	0,212 f	0,192 e	0,165 cd
<i>Lj. MG20</i>		0,384 c	0,278 b	0,451 d	0,078 a	0,138 f	0,129 e	0,126 ab	0,169 d	0,194 e

†RTR: Relación tallo/raíz, ††TDF: Tasa de desarrollo foliar en d⁻¹, †††Nt/T: N° de trifolios/longitud de tallo.

3.1.3 Sistema de hidroponía

En este sistema se realizaron dos ensayos independientes, uno con el genotipo *Lj. MG20* y otro con los genotipos *L. burtii* y *Lj. Gifu*. Estos últimos se evaluaron juntos por ser los parentales de la población RILs utilizada en la búsqueda de QTLs.

3.1.3.1 *Lotus japonicus* MG20

Lj. MG20 fue cultivado en un sistema de hidroponía con medio B&D líquido con NaCl 0 y 150 mM durante 14 días.

La TCR_t disminuyó a los 14 días en presencia de NaCl, mientras que en ese tiempo el NaCl estimuló la TCR_r y la TCR_{total} (Cuadro 6).

Cuadro 6. Crecimiento de *Lotus japonicus* MG20 cultivado en hidroponía en dos concentraciones de NaCl. El tiempo corresponde a los 14 días transcurridos desde la aplicación del NaCl. Los valores corresponden a las medias ajustadas de cada variable.

Línea	TCRt [†]		TCRr ^{††}		TCRtotal ^{†††}	
	0 mM	150 mM	0 mM	150 mM	0 mM	150 mM
<i>Lj.</i> MG20	0,075 b	0,067 a	0,011 a	0,025 b	0,037 a	0,041 b

†TCRt: tasa de crecimiento relativo de tallo, ††TCRr: tasa de crecimiento relativo de raíz, †††TCRtotal: tasa de crecimiento relativo total.

A los 7 días la RTR y TDF se vieron estimuladas por el NaCl, mientras que en este tiempo el Nt/T se inhibió por el NaCl. A los 14 días los tres parámetros evaluados disminuyeron en presencia de NaCl (Cuadro 7).

Cuadro 7. Desarrollo de *Lotus japonicus* MG20 cultivado en hidroponía en dos concentraciones de NaCl. El tiempo corresponde a los 7 y 14 días transcurridos desde la aplicación del NaCl. Los valores corresponden a las medias ajustadas de cada variable

Línea	Tiempo	RTR [†]		TDF ^{††}		Nt/T ^{†††}	
		0 mM	150 mM	0 mM	150 mM	0 mM	150 mM
<i>Lj.</i> MG20	7 d	0,485 a	0,640 b	0,143 a	0,159 b	0,093 b	0,056 a
	14 d	0,887 b	0,815 a	0,171 b	0,164 a	0,078 b	0,047 a

†RTR: Relación tallo/raíz, ††TDF: tasa de desarrollo foliar en d⁻¹, †††Nt/T: N° de trifolios/longitud de tallo.

3.1.3.2 *Lotus japonicus* Gifu y *Lotus burttii*

Los genotipos *L. burttii* y *Lj. Gifu* fueron cultivados en un sistema de hidroponía con medio B&D líquido con NaCl 0 y 150 mM durante 14 días. A los 14 días el NaCl inhibió la TCRt, TCRr y TRCtotal en ambos genotipos (Cuadro 8).

Cuadro 8. Crecimiento de *Lotus burttii* y *Lotus japonicus* Gifu cultivados en hidroponía en dos concentraciones de NaCl. El tiempo corresponde a los 14 días transcurridos desde la aplicación del NaCl. Los valores corresponden a las medias ajustadas de cada variable.

Línea	TCRt [†]		TCRr ^{††}		TCRtotal ^{†††}	
	0 mM	150 mM	0 mM	150 mM	0 mM	150 mM
<i>L. burttii</i>	0,097 d	0,034 a	0,053 c	0,001 a	0,068 c	0,012 a
<i>Lj. Gifu</i>	0,072 c	0,052 b	0,039 c	0,020 b	0,050 bc	0,032 b

†TCRt: tasa de crecimiento relativo de tallo, ††TCRr: tasa de crecimiento relativo de raíz, †††TCRtotal: tasa de crecimiento relativo total.

En presencia de NaCl la RTR y la TDF de *L. burttii* disminuyeron tanto a los 7 como a los 14 días, mientras que el Nt/T aumentó en los dos tiempos (Cuadro 7). Por otro lado, tanto la RTR como la TDF y el Nt/T de *Lj. Gifu* aumentaron a los 14 días de ensayo (Cuadro 9).

Cuadro 9. Desarrollo de *Lotus burttii* y *Lotus japonicus* Gifu cultivados en hidroponía en dos concentraciones de NaCl. Los valores corresponden a las medias ajustadas de cada variable. El tiempo corresponde a los 7 y 14 días transcurridos desde la aplicación del NaCl.

Línea	Tiempo	RTR [†]		TDF ^{††}		Nt/T ^{†††}	
		0 mM	150 mM	0 mM	150 mM	0 mM	150 mM
<i>L. burttii</i>	7 d	0,787 c	0,629 a	0,143 c	0,105 a	0,097 a	0,153 c
<i>Lj. Gifu</i>		0,708 b	0,884 d	0,135 bc	0,127 b	0,138 bc	0,124 b
<i>L. burttii</i>	14 d	1,066 c	0,798 a	0,208 c	0,095 a	0,072 a	0,109 b
<i>Lj. Gifu</i>		0,891 b	1,103 c	0,183 b	0,190 b	0,113 b	0,130 b

†RTR: Relación tallo/raíz, †TDF: Tasa de desarrollo foliar en d⁻¹, †Nt/T: N° de trifolios/longitud de tallo.

3.1.4 Sistema de macetas

3.1.4.1 Ensayo a corto plazo

En este ensayo se evaluó el genotipo *Lj.* MG20 cultivado en macetas con vermiculita y regado con medio B&D líquido con NaCl 0, 50 y 150 mM durante 14 días.

A los 7 días la TCRt, la TCRr así como la TCRtotal disminuyeron por el tratamiento con NaCl, sin embargo a los 14 días el tratamiento 50 mM de NaCl causó un efecto positivo sobre estas tasas (Cuadro 8). La TCRr fue la única variable que se vio afectada negativamente en 150 mM de NaCl a los 14 días (Cuadro 10).

Cuadro 10. Crecimiento de *Lotus japonicus* MG20 cultivado en macetas de bajo tres concentraciones de NaCl. El tiempo corresponde a los 7 y 14 días transcurridos desde la aplicación del NaCl. Los valores corresponden a las medias ajustadas de cada variable.

Línea	Tiempo	TCRt [†]			TCRr ^{††}			TCRtotal ^{†††}		
		0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM
<i>Lj.</i> MG20	14 d	0,109 c	0,064 a	0,079 b	0,070 c	0,051 b	0,043 a	0,080 b	0,055 a	0,055 a
	28 d	0,041 a	0,0567 b	0,040 a	0,022 bc	0,037c	0,005 a	0,029 b	0,044 c	0,020 a

†TCRt: tasa de crecimiento relativo de tallo, ††TCRr: tasa de crecimiento relativo de raíz, †††TCRtotal: tasa de crecimiento relativo total.

En los dos tiempos ensayados el NaCl inhibió la RTR, mientras que sobre la TDF este efecto se observó solo en 150 mM (Cuadro 9). El NaCl no tuvo efecto sobre el Nt/T en ninguno de los dos tiempos (Cuadro 11).

Cuadro 11. Desarrollo de *Lotus japonicus* MG20 cultivado en macetas bajo tres concentraciones de NaCl. El tiempo corresponde a los 7 y 14 días transcurridos desde la aplicación del NaCl. Los valores corresponden a las medias ajustadas de cada variable.

Línea	Tiempo	RTR [†]			TDF ^{††}			Nt/T ^{†††}		
		0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM
<i>Lj.</i> MG20	14 d	0,529 a	0,556 b	0,670 c	0,162 b	0,141 a	0,171 b	0,056 a	0,056 a	0,055 a
	28 d	0,630 a	0,668 b	0,915 c	0,161 a	0,162 b	0,173 c	0,051 a	0,051 a	0,051 a

†RTR: Relación tallo/raíz, ††TDF: Tasa de desarrollo foliar, †††Nt/T: N° de trifolios/longitud de tallo.

3.1.4.2 Ensayo a largo plazo

En este ensayo se evaluaron tres genotipos de Lotus: *L. burttii*, *Lj. Gifu* y *Lj. MG20*, que fueron cultivados en macetas con vermiculita, regados con medio B&D líquido con NaCl 0, 50 y 150 mM durante 60 días.

En *L. burttii* el NaCl inhibió el CAT, CAr y CATotal, a diferencia de *Lj. Gifu* donde el NaCl estimuló las tres variables. En *Lj. MG20* el NaCl estimuló el CAT, pero inhibió el CAr y el CATotal (Cuadro 12).

Cuadro 12. Crecimiento de tres genotipos de *Lotus* cultivados en macetas en tres concentraciones de NaCl. Los valores corresponden a las medias ajustadas de cada variable a los 60 días de la colocación de las plantas en las distintas concentraciones de NaCl.

Línea	CAT [†]			CAr ^{††}			CATotal ^{†††}		
	0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM
<i>L. burttii</i>	128,3 c	68,0 b	15,3 a	114,5 bcd	81,4 b	40,2 a	241,2 cd	149,3 bc	55,6 a
<i>Lj. Gifu</i>	48,7 b	183,5 e	223,2 f	103,2 bc	143,6 cde	150,9 de	149,8 bc	325,0 de	373,0 e
<i>Lj. MG20</i>	127,4 c	175,5 e	169,3 de	184,4 de	111,6 bcd	88,1 b	312,4 de	281,5 de	253,0 d

†CAT: Crecimiento Absoluto de tallo (mm), ††CAr: Crecimiento Absoluto de raíz (mm), †††CATotal: Crecimiento Absoluto total (mm).

En presencia de NaCl la RTR y la TDF de *L. burttii* disminuyeron tanto a 50 como a 150 mM, mientras que en *Lj. Gifu* y *Lj. MG20* aumentaron. En estas concentraciones el NaCl tuvo un efecto positivo sobre el Nt/T de *L. burttii* y negativo sobre el Nt/T de *Lj. Gifu*. En el caso *Lj. MG20* el efecto negativo del NaCl solo se observó en 50 mM (Cuadro 13).

Cuadro 13. Desarrollo de tres genotipos de *Lotus* cultivados en macetas en tres concentraciones de NaCl. Los valores corresponden a las medias de cada variable a los 60 días de la colocación de las plantas en las distintas concentraciones de NaCl.

Línea	RTR [†]			TDF ^{††}			Nt/T ^{†††}		
	0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM	0 mM	50 mM	150 mM
<i>L. burtii</i>	1,46 d	0,84 c	0,76 bc	0,14 bc	0,11 b	0,07 a	0,07 c	0,12 d	0,24 f
<i>Lj. Gifu</i>	0,60 a	2,09 e	2,26 fg	0,13 b	0,18 cd	0,22 d	0,16 e	0,04 b	0,05 b
<i>Lj. MG20</i>	0,70 b	2,23 f	2,34 g	0,11 b	0,17 cd	0,20 d	0,07 c	0,02 a	0,08 c

†RTR: Relación tallo/raíz, ††TDF: Tasa de desarrollo foliar en d⁻¹, †††Nt/T: N° de trifolios/longitud de tallo.

3.2 EVALUACIÓN DE RESPUESTAS A ESTRÉS OSMÓTICO EN SISTEMAS DE HIDROPONIA

En función de los resultados obtenidos en los distintos sistemas de cultivo utilizados para evaluar las respuestas a estrés salino, el sistema de hidroponía demostró ser el más adecuado para el análisis fenotípico masivo de genotipos. En este sentido la inducción de un estrés osmótico mediante la adición de PEG en el medio de cultivo simularía el efecto que la sequía puede causar en una planta y de esta forma permitiría identificar las respuestas a estrés osmótico genotipo dependientes.

3.2.1 *Lotus japonicus* MG20

El genotipo *Lj. MG20* fue cultivado en un sistema de hidroponía con medio B&D líquido con PEG 0 y 15% (-0,85 MPa) durante 14 días.

A los 14 días el PEG estimuló la TCRt, la TCRr y la TCRtotal (Cuadro 14).

Cuadro 14. Crecimiento de *Lotus japonicus* MG20 cultivado en hidroponía en dos concentraciones de PEG. Los valores corresponden a las medias ajustadas de cada variable, a los 14 días desde la aplicación del PEG.

Línea	TCRt [†]		TCRr ^{††}		TCRtotal ^{†††}	
	0%	15%	0%	15%	0%	15%
<i>Lj. MG20</i>	0,075 a	0,083 b	0,011 a	0,029 b	0,037 a	0,052 b

†TCRt: tasa de crecimiento relativo de tallo, ††TCRr: tasa de crecimiento relativo de raíz, †††TCRtotal: tasa de crecimiento relativo total.

. El PEG tuvo estimuló la RTR en los dos tiempos ensayados, a diferencia del Nt/T que disminuyó se afectó negativamente por el tratamiento con PEG en las dos fechas (Cuadro 15). Por último, la TDF no se vio afectada por el PEG en ninguno de los tiempos (Cuadro 15).

Cuadro 15. Desarrollo de *Lotus japonicus* MG20 cultivado en hidroponía en bajo dos concentraciones de PEG. Los valores corresponden a las medias ajustadas de cada variable, a los 7 y 14 días desde la aplicación del PEG.

Línea	Tiempo	RTR [†]		TDF ^{††}		Nt/T ^{†††}	
		0%	15%	0%	15%	0%	15%
<i>Lj.</i> MG20	7 d	0,485 a	0,613 b	0,143 a	0,146 a	0,093 b	0,041 a
	14 d	0,887 a	0,918 a	0,171 b	0,164 a	0,078 b	0,031 a

[†]RTR: Relación tallo/raíz, ^{††}TDF: Tasa de desarrollo foliar en d⁻¹, ^{†††}Nt/T: N° de trifolios/longitud de tallo.

3.2.2 *Lotus japonicus* Gifu y *Lotus burttii*

Los genotipos *L. burttii* y *Lj.* Gifu fueron cultivados en un sistema de hidroponía con medio B&D líquido con PEG 0 y 15% durante 7 y 14 días.

A los 14 días el PEG tuvo un estimuló todas las tasas de crecimiento de *L. burttii*, sin embargo en *Lj.* Gifu el PEG inhibió la TCRr y la TCRtotal, sin afectar la TCRt (Cuadro 16).

Cuadro 16. Crecimiento *Lotus burttii* y *Lotus japonicus* Gifu cultivados en hidroponía bajo dos concentraciones de PEG. Los datos fueron tomados a los 14 días desde la colocación de las plantas en las distintas concentraciones de PEG. Los valores corresponden a las medias ajustadas de cada tasa.

Línea	TCRt [†]		TCRr ^{††}		TCRtotal ^{†††}	
	0%	15%	0%	15%	0%	15%
<i>L. burttii</i>	0,097 b	0,144 c	0,053 b	0,079 d	0,067 c	0,107 d
<i>Lj.</i> Gifu	0,072 a	0,075 a	0,039 b	0,024 a	0,049 b	0,039 a

[†]TCRt: tasa de crecimiento relativo de tallo, ^{††}TCRr: tasa de crecimiento relativo de raíz, ^{†††}TCRtotal: tasa de crecimiento relativo total.

En presencia de PEG la RTR de ambos genotipos disminuyó tanto a los 7 como a los 14 días. Sin embargo, en ambos tiempos el PEG estimuló la TDF y el Nt/T de *Lj. Gifu*. En *L. burttii* este efecto del PEG sobre la TDF se observó sólo a los 14 días, mientras que el PEG inhibió el Nt/T en este tiempo (Cuadro 17).

Cuadro 17. Desarrollo de *Lotus burttii* y *Lotus japonicus* Gifu cultivados en hidroponía en dos concentraciones de PEG. Los datos fueron tomados a los 14 días desde la colocación de las plantas en las distintas concentraciones de PEG. Los valores corresponden a las medias ajustadas de cada tasa.

Línea	Tiempo	RTR [†]		TDF ^{††}		Nt/T ^{†††}	
		0%	15%	0%	15%	0%	15%
<i>L. burttii</i>	7 d	0,787 d	0,609 b	0,142 a	0,142 a	0,097 a	0,101 a
<i>Lj. Gifu</i>		0,708 c	0,581 a	0,135 a	0,167 b	0,138 b	0,157 c
<i>L. burttii</i>	14 d	1,066 d	0,957 c	0,208 b	0,226 bc	0,072 b	0,058 a
<i>Lj. Gifu</i>		0,891 b	0,827 a	0,183 a	0,238 c	0,113 c	0,133 d

†RTR: Relación tallo/raíz, ††TDF: Tasa de desarrollo foliar en d⁻¹, †††Nt/T: N° de trifolios/longitud de tallo.

3.3 LÍNEAS RECOMBINANTES PURAS (RILs)

Para la detección de QTLs se utilizó como población de mapeo, una población RILs producto del cruzamiento interespecífico de *Lj. Gifu* x *L. burttii*. Esta población se evaluó en hidroponía con medio B&D líquido y se definieron tres condiciones experimentales: condición control (solo medio B&D), NaCl (medio B&D +150 mM de NaCl), y PEG (medio B&D + 15 % de PEG). Las plantas se sometieron a las condiciones antes mencionadas durante 14 días.

3.3.1 Distribución y correlación de las variables fenotípicas analizadas

Cuando se comparó el efecto del NaCl y del PEG sobre la población de RILs, se observó que todas las variables de crecimiento y desarrollo calculadas tuvieron un rango de valores similares en las tres condiciones (Figura 14).

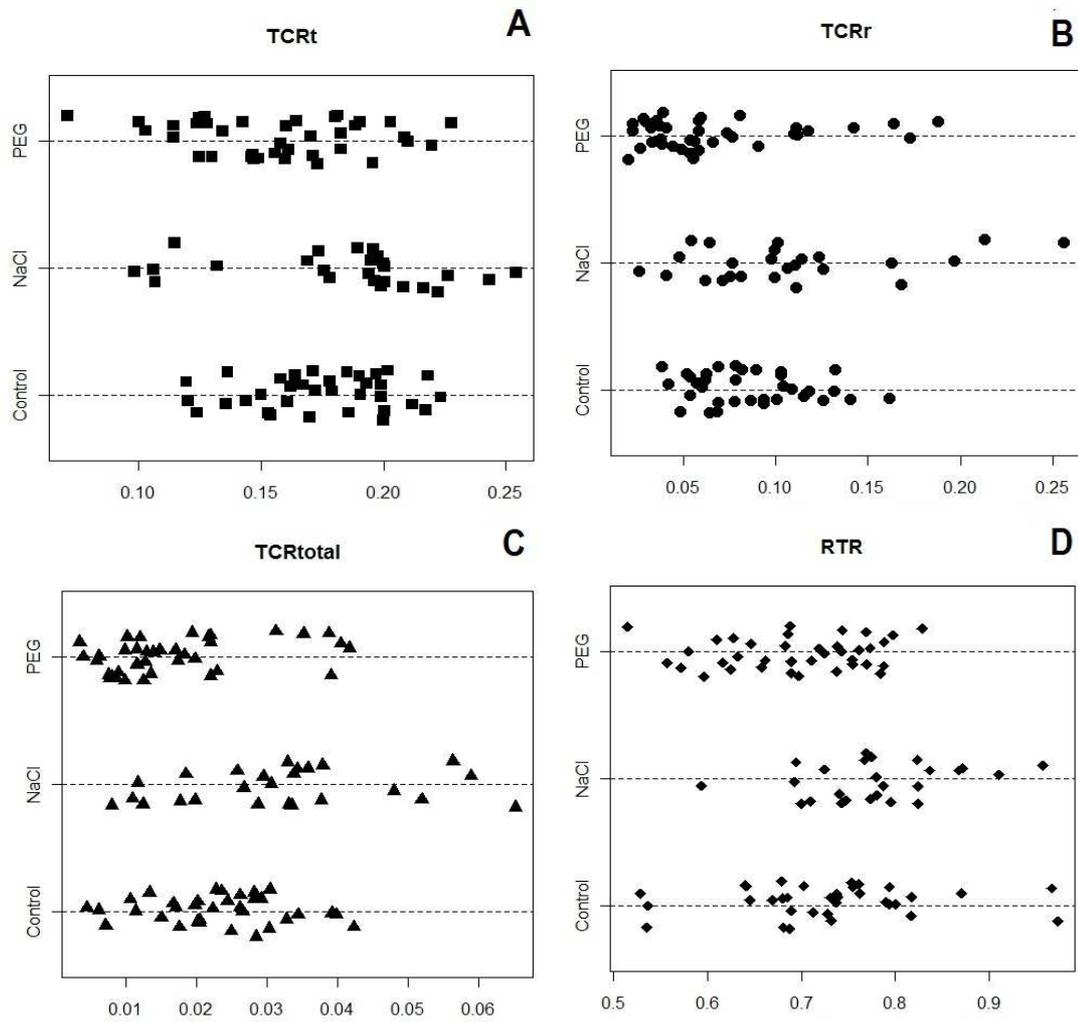


Figura 14. Evaluación de los parámetros de crecimiento y desarrollo de la población RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*) en hidroponía. Condición control (solo medio B&D), NaCl (medio B&D +150 mM de NaCl) y PEG (medio B&D + 15 % de PEG). A) TCRt: tasa de crecimiento relativo de tallo, B) TCRr: tasa de crecimiento relativo de raíz, C) TCRtotal: tasa de crecimiento relativo total, D) RTR: Relación Tallo/Raíz.

Sin embargo, las distribuciones de frecuencia de estos parámetros fueron diferentes según la condición experimental analizada (Figura 15). En la condición control la TCRt tuvo una distribución aparentemente normal (Figura 15A), que no se afectó por el PEG (Figura 15C), pero con NaCl esta distribución de frecuencia se modificó hacia una de tipo aparentemente bimodal (Figura 15B).

Para la TCRr y la TCRtotal se observó que tuvieron una distribución de frecuencia aparentemente normal en condición control y en NaCl, que se afectó por el PEG, y se visualizó como un cambio hacia una distribución del tipo aparentemente bimodal (Figura 15C).

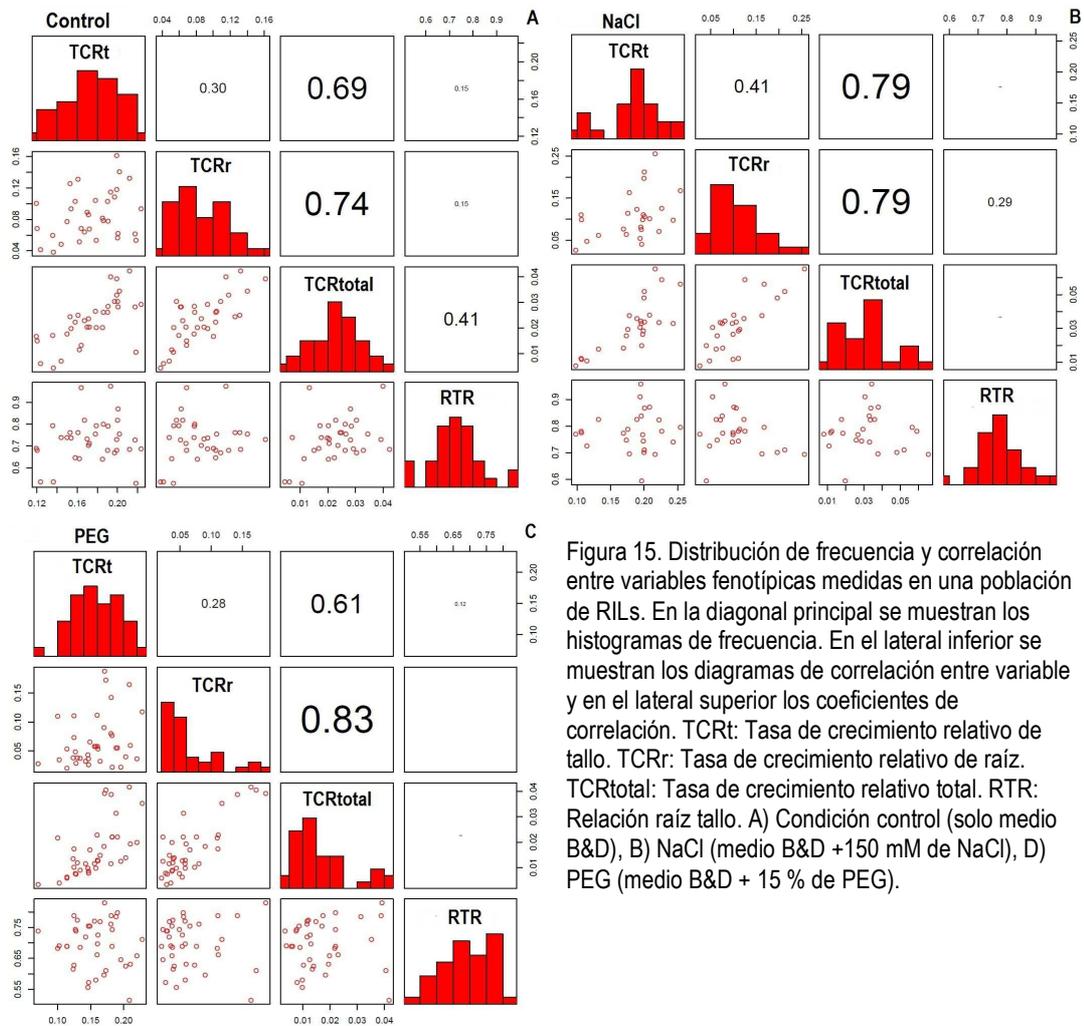


Figura 15. Distribución de frecuencia y correlación entre variables fenotípicas medidas en una población de RILs. En la diagonal principal se muestran los histogramas de frecuencia. En el lateral inferior se muestran los diagramas de correlación entre variable y en el lateral superior los coeficientes de correlación. TCRt: Tasa de crecimiento relativo de tallo. TCRr: Tasa de crecimiento relativo de raíz. TCRtotal: Tasa de crecimiento relativo total. RTR: Relación raíz tallo. A) Condición control (solo medio B&D), B) NaCl (medio B&D +150 mM de NaCl), D) PEG (medio B&D + 15 % de PEG).

El coeficiente de correlación entre variables fue similar en todas las condiciones evaluadas, salvo para la correlación observada entre la TCRtotal y la RTR, dónde la correlación encontrada en la condición control, no se observó en las otras dos condiciones (Figura 15A).

3.3.2 Chequeo de datos genotípicos

Como material de base para la identificación de QTLs se trabajó sobre un mapa genético consistente en seis grupos de ligamiento, que corresponden a los seis cromosomas de *Lotus japonicus*, según lo descrito por Sandal *et al.* (2002) y Pedrosa *et al.* (2002). El mapa de ligamiento y la información de los marcadores moleculares está disponible en el sitio Web <http://www.kasuzo.or.jp/lotus/>. En este trabajo se analizó la integridad de estos datos genotípicos y se verificó la posición de los marcadores en el mapa de ligamiento.

3.3.2.1 Datos genotípicos faltantes

Como primer diagnóstico se realizó un análisis de la proporción de información faltante en el genotipado de los marcadores disponibles para la población de mapeo. En la matriz de genotipos original, conformada por 166 individuos y 88 marcadores, se detectaron cinco marcadores sin datos genotípicos en más del 30 % de la población (puntos negros en columnas Figura 16A), también se identificaron 19 individuos con más de 50 % de información faltante en el genotipo de sus marcadores (punto negro en línea Figura 16A).

Para el posterior análisis de los datos genotípicos, aquellos individuos y marcadores que presentaban las restricciones antes mencionadas fueron removidos de la matriz de datos. El patrón de datos faltantes de la matriz de genotipos corregida, 147 individuos y 83 marcadores, se muestra en la Figura 16B.

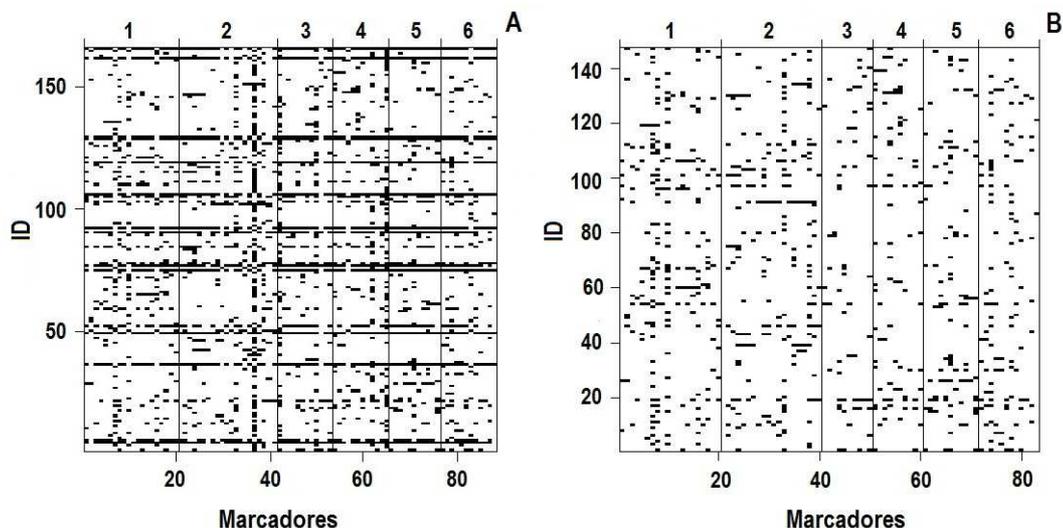


Figura 16. Patrón de información faltante de la población RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*). Los cuadrados negros representan datos faltantes. En la parte superior se identifican los cromosomas del 1 al 6, en la parte inferior se ubica la posición, en centimorgans (cM) de cada marcador dentro del respectivo cromosoma. Sobre el eje vertical se ordenan los individuos de la población según su identificación (ID). A) Matriz de datos genotípicos original. B) Matriz de datos genotípicos corregida.

3.3.2.2 Frecuencia alélica

El análisis de la frecuencia alélica de los marcadores moleculares mostró que las frecuencias alélicas de cada parental fueron similares entre los marcadores de cada cromosoma (Figura 17). Por otra parte, el número individuos con marcadores en heterocigosis fue del 2,5 % en todo el genoma de la población, sin embargo se observó que la mayoría de los individuos de la población mostraron homocigosis para el parental *Lj. Gifu* en los marcadores del cromosoma 2 (Figura 17).

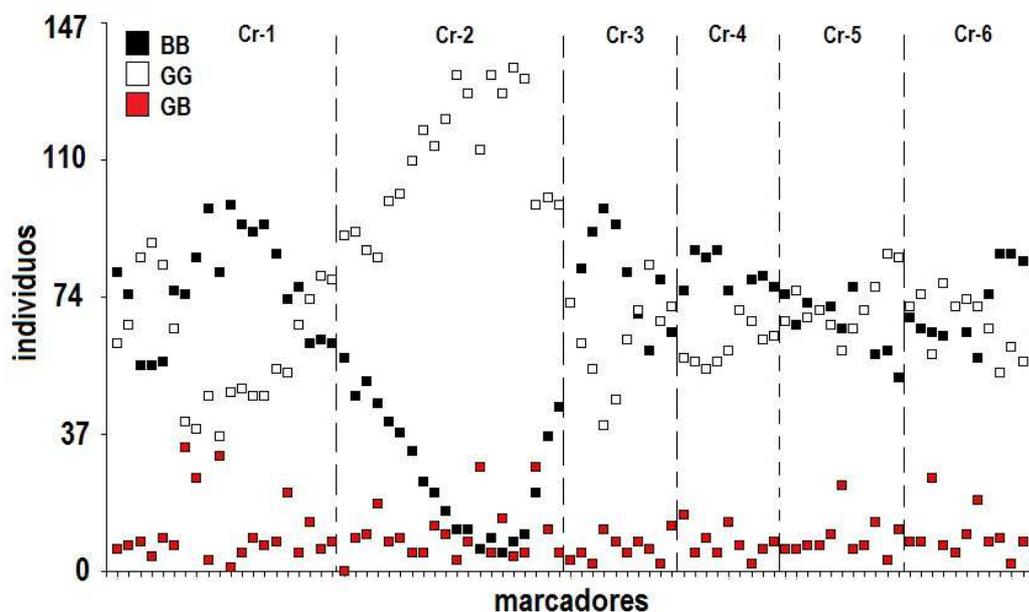


Figura 17. Frecuencia alélica de los marcadores moleculares identificados en la población de RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*). El genotipo de los marcadores es: BB homocigota para *L. burttii*, GG: homocigota para *L. japonicus* Gifu, GB: heterocigota. En la parte superior se indican los cromosomas del 1 al 6 (Cr-1, Cr-2, Cr-3, Cr-4, Cr-5, Cr-6, respectivamente).

3.3.2.3 Dobles *crossovers*

Una forma de detectar posibles errores en el genotipado de los marcadores es la identificación de dobles *crossovers* en regiones muy cercanas del genoma. Para cada marcador en cada cromosoma se calculó la probabilidad (LOD score) de que el marcador tenga el genotipo incorrecto versus la probabilidad que tenga el genotipo correcto. A su vez, esta probabilidad se comparó con la probabilidad de error en el genotipado de los otros marcadores dentro del cromosoma, este LOD score se utilizó para detección de doble *crossover* muy cercanos.

En la matriz de datos analizada sólo se detectaron errores (LODscore > 5) en los cromosomas 1 y 2, en cinco y dos marcadores respectivamente (Figura 18A y B). También se pudo establecer que el número mínimo de *crossover* requeridos para explicar los datos observados fue en promedio de 8,5 por cada genotipo de la población de mapeo (Figura 18C).

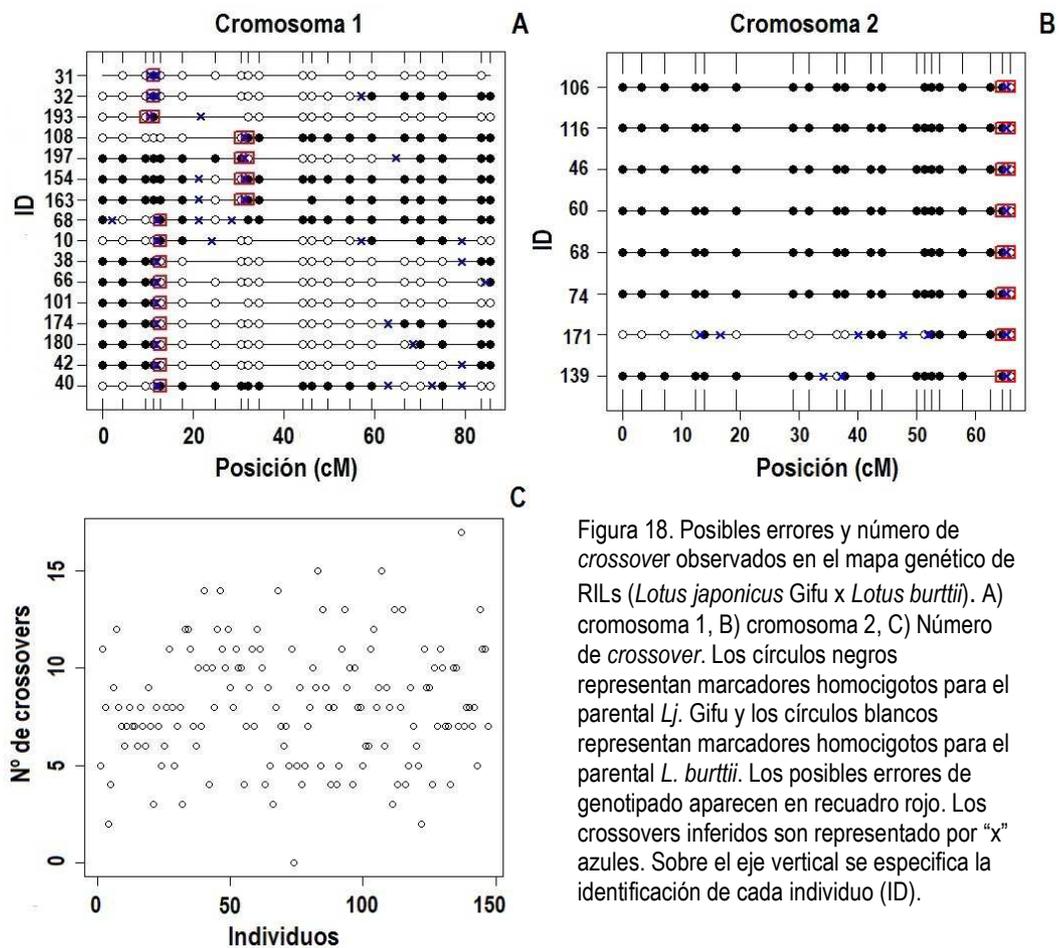


Figura 18. Posibles errores y número de *crossover* observados en el mapa genético de RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burtii*). A) cromosoma 1, B) cromosoma 2, C) Número de *crossover*. Los círculos negros representan marcadores homocigotos para el parental *Lj.* Gifu y los círculos blancos representan marcadores homocigotos para el parental *L. burtii*. Los posibles errores de genotipado aparecen en recuadro rojo. Los *crossovers* inferidos son representado por "x" azules. Sobre el eje vertical se especifica la identificación de cada individuo (ID).

3.3.2.4 Fracción de recombinación estimada

Luego de examinar el patrón de datos faltantes y corregir la matriz de genotipos original, se estimó para cada par de marcadores la fracción de recombinación entre ellos (r) y se calculó la probabilidad (LOD score) para el test de $r = \frac{1}{2}$. La r estimada entre los marcadores se encuentra en parte superior de la diagonal y el LODscore en la parte inferior de la diagonal. Los puntos rojos indican marcadores ligados y los puntos azules indican marcadores no ligados (Figura 19).

Los puntos rojos por fuera de la diagonal principal en los cromosomas 1 y 2 indican que algunos marcadores asignados a esos cromosomas podrían estar ligados con marcadores

asignados a otros grupos de ligamiento. Sin embargo, el análisis muestra que asignación de los marcadores en el mapa de ligamiento es adecuada y por lo tanto éste es confiable para lograr los objetivos planteados.

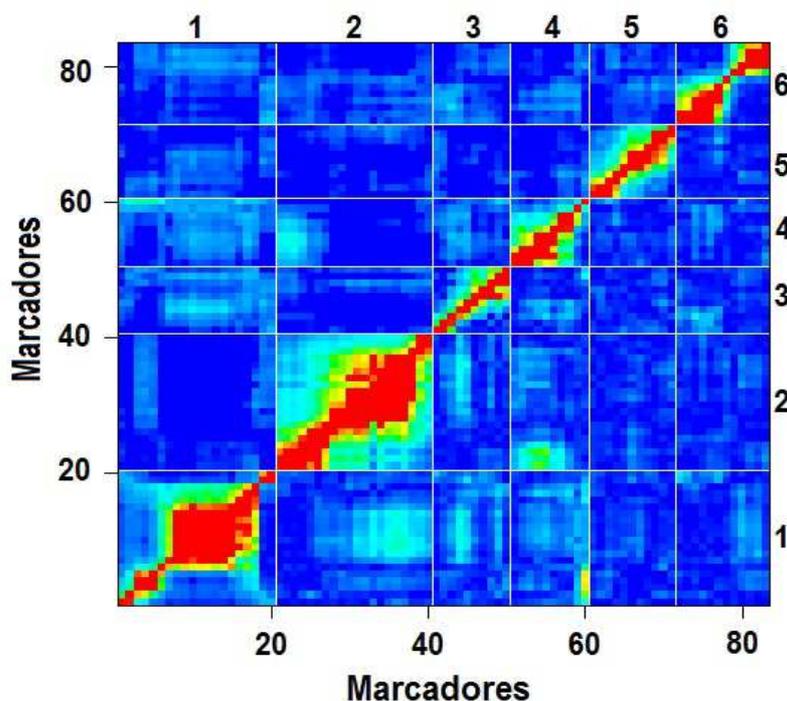


Figura 19. Fracción de recombinación estimada para todos los pares de marcadores de la población de líneas recombinantes puras (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*). La fracción de recombinación (r) se dibujó en la parte superior de la diagonal principal y la probabilidad (LODscore) para el test $H_0: r=1/2$ en la parte inferior de la diagonal. Los puntos rojos indican pares de marcadores que parecen estar ligados (r pequeñas o LODscore grandes). Los puntos azules indican pares de marcadores que parecen no estar ligados (r grandes o LODscore pequeños)

3.3.2.5 Mapa de ligamiento

Para verificar la posición de los marcadores dentro de cada grupo de ligamiento, se estimó la distancia entre marcadores a partir de los datos genotípicos observados. Cuando se compararon estas distancias con las distancias originales, se observó que el mapa estimado es ligeramente mayor al mapa original. La mayor diferencia se observó en el cromosoma 1 (Figura 20).

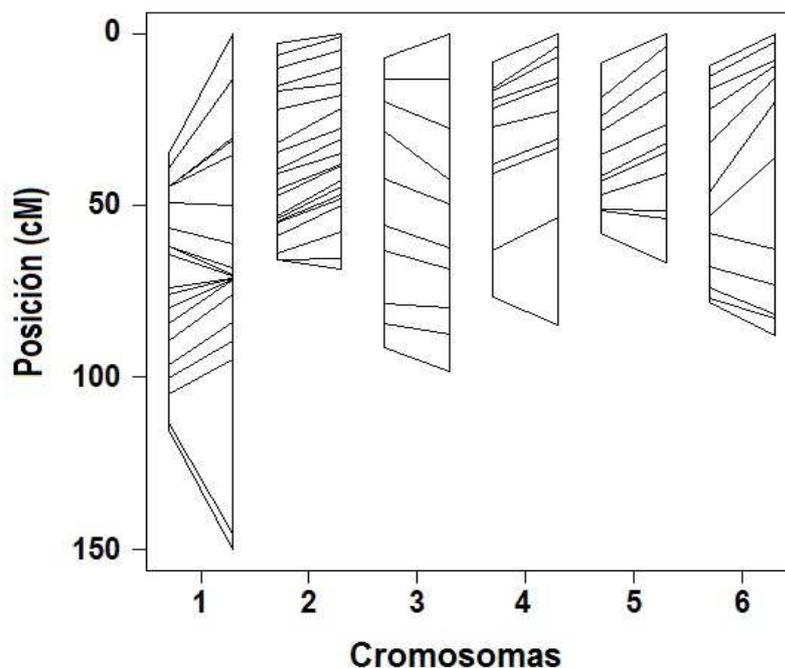


Figura 20. Mapa genético de la población RILs *Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*, comparado con el mapa estimado a partir de los genotípicos. Para cada cromosoma la línea de la izquierda es el mapa original de los datos, la línea de la derecha es el mapa estimado a partir de los datos originales. Las líneas entre los segmentos conectan las posiciones de cada marcador.

3.3.3 Análisis de QTLs

El análisis de QTLs se hizo mediante el análisis de intervalo compuesto (CIM). Además, para cada variable fenotípica medida se analizó la interacción genotipo x ambiente (GEI). Por convención se estableció que QTLs con efectos positivos marcan superioridad del alelo *L. burttii* mientras que QTLs con efectos negativos marcan superioridad del alelo *Lj. Gifu*.

En total se detectaron cinco posibles QTLs ($-\log_{10} > 1,3$) para la variable TCRt. En la Figura 21A se muestra la posición de los QTLs, y los marcadores moleculares asociados. En el cromosoma 5 se identificaron dos marcadores, TM0186 y TM0299, asociados al mismo QTL.

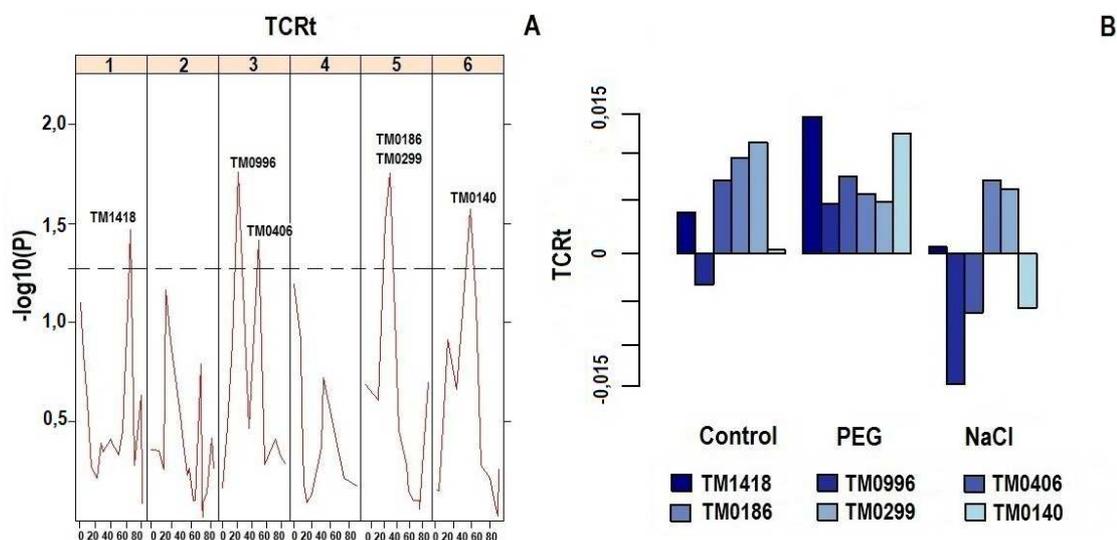


Figura 21. Resultado del análisis de QTLs para la variable tasa de crecimiento relativo de tallo (TCRt) en la población de RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*). En A se muestra la ubicación de los QTLs. Los resultados se muestran como un perfil de valores P (en escala $-\log_{10}$) en el que cada pico que excede la línea horizontal ($-\log_{10} > 1,3$) muestra una asociación significativa para el rasgo cualitativo analizado. En B se muestra la magnitud del efecto del QTL en cada uno de los ambientes. El efecto positivo indica superioridad del alelo del parental *L. burttii*.

El alelo del parental *L. burttii* fue superior en el tratamiento de PEG en todos los QTLs detectados, mientras que en NaCl la superioridad del alelo del parental *L. burttii* se observó solo en la mitad de los QTLs. En la condición control el alelo del parental *Lj. Gifu* fue superior solo en el QTL asociado al marcador TM0996 del cromosoma 3. Este fue el único QTL donde el alelo del parental *Lj. Gifu* fue superior tanto en control como en NaCl (Figura 21B).

Para la variable TCRr se detectaron tres posibles QTLs ($-\log_{10} > 1,3$). La posición de los QTLs y los marcadores moleculares asociados se muestran en la Figura 22A. En la condición control el alelo del parental *L. burttii* fue superior solo en el QTL asociado al marcador TM0324 (Figura 22B), mientras que en PEG la superioridad del parental *L. burttii* se observó en los QTLs asociados a los marcadores TM0324 y TM0058. Por el contrario, el efecto superior sobre estos QTLs (TM0324 y TM0058) en NaCl fue del parental *Lj. Gifu* (Figura 22B).

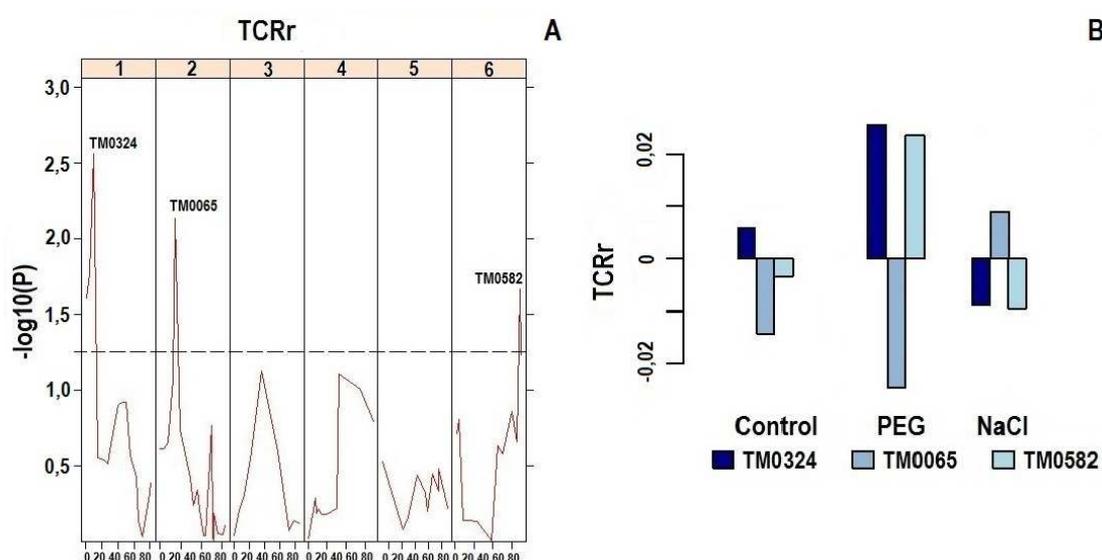


Figura 22. Resultado del análisis de QTLs para la variable tasa de crecimiento relativo de raíz (TCRr) en la población RILs (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*). En A se muestra la ubicación de los QTLs. Los resultados se muestran como un perfil de valores P (en escala $-\log_{10}$) en el que cada pico que excede la línea horizontal ($-\log_{10} > 1,3$) muestra una asociación significativa para el rasgo cualitativo analizado. En B se muestra la magnitud del efecto del QTL en cada uno de los ambientes. El efecto positivo indica superioridad del alelo del parental *L. burttii*.

Para la variable TCRtotal se detectaron cinco posibles QTLs ($-\log_{10} > 1,3$). La posición de los QTLs en cada cromosoma y los marcadores moleculares asociados, así como los efectos de cada uno de ellos se muestran en la Figura 23A y B. En la condición control el alelo del parental *L. burttii* fue superior en tres de los cinco QTLs detectados. Sin embargo para estos mismos QTLs se observó una superioridad del parental *Lj. Gifu* en NaCl. Los marcadores asociados a estos QTLs fueron TM0002, TM0803 y TM0406 (Figura 23A). En PEG se observó una superioridad del alelo del parental *L. burttii* para cuatro de los cinco QTLs detectados.

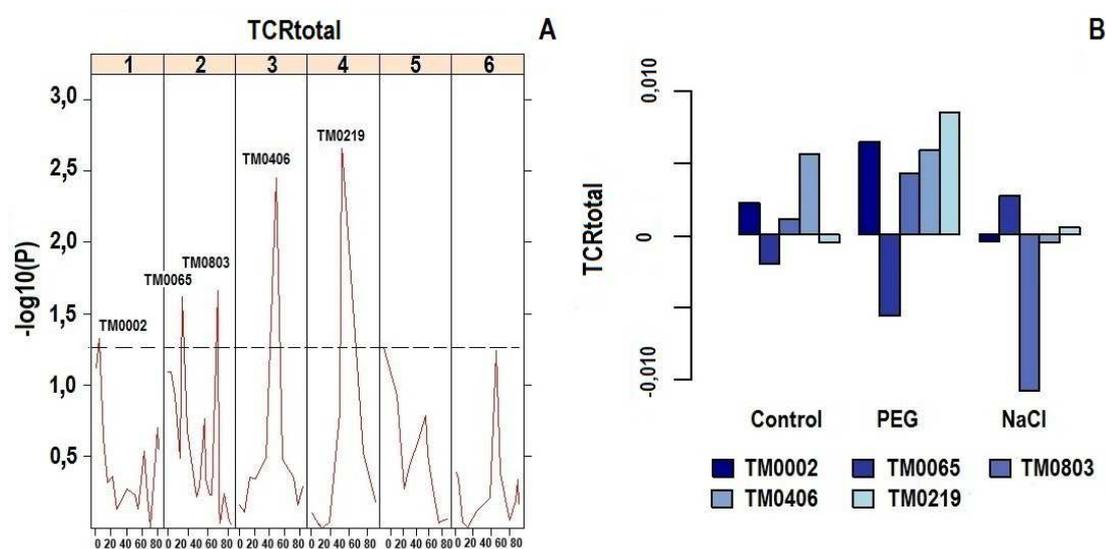


Figura 23. Resultado del análisis de QTLs para la variable tasa de crecimiento relativo de total (TCRtotal) en la población líneas recombinantes puras (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*). En A se muestra la ubicación de los QTLs. Los resultados se muestran como un perfil de valores P (en escala $-\log_{10}$) en el que cada pico que excede la línea horizontal ($-\log_{10} > 1,3$) muestra una asociación significativa para el rasgo cualitativo analizado. En B se muestra la magnitud del efecto del QTL en cada uno de los ambientes. El efecto positivo indica superioridad del alelo del parental *L. burttii*.

Para la variable RTR se detectaron cuatro posibles QTLs ($-\log_{10} > 1,3$) tres de los cuales se ubican en el cromosoma 3. La posición de los QTLs en cada cromosoma y los marcadores moleculares asociados, así como los efectos de cada uno de ellos se muestran en la Figura 24A y B. Los QTLs asociados a los marcadores TM0049 y TM0616, tuvieron un efecto similar en las tres condiciones, con superioridad del alelo del parental *L. burttii* sobre el alelo del parental *Lj. Gifu*. En el QTL asociado al marcador TM0859 se una superioridad del alelo del parental *Lj. Gifu* en las tres condiciones... En NaCl las superioridad del alelo del parental *Lj. Gifu* sólo se observó en el QTL asociado al marcador TM0859 (Figura 24B).

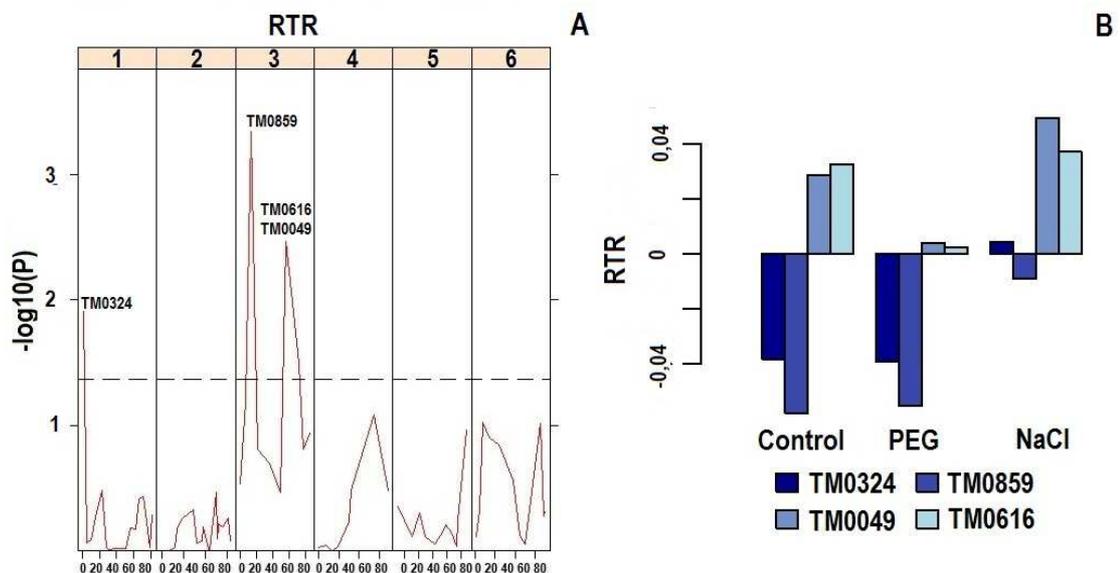


Figura 24. Resultado del análisis de QTLs para la variable relación tallo raíz (RTR) en la población líneas recombinantes puras (*Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*). En A se muestra la ubicación de los QTLs. Los resultados se muestran como un perfil de valores P (en escala $-\log_{10}$) en el que cada pico que excede la línea horizontal ($-\log_{10} > 1,3$) muestra una asociación significativa para el rasgo cualitativo analizado. En B se muestra la magnitud del efecto del QTL en cada uno de los ambientes. El efecto positivo indica superioridad del alelo del parental *L. burttii*.

Del total de dieciocho QTLs detectados, cuatro fueron ubicados en el cromosoma 1, tres en el cromosoma 2, seis en el cromosoma 3, uno en el cromosoma 4, dos en el 5 y dos en el cromosoma 6 (Figura 25). Los QTLs tuvieron efectos distintos según la condición experimental ensayada.

El QTL asociado al marcador TM0859 en el cromosoma 3, fue el único con superioridad del alelo del parental *Lj. Gifu* en las tres condiciones experimentales (control, PEG y NaCl), solo para la variable RTR, mientras que la superioridad del alelo del parental *L. burttii* en las tres condiciones se observó en cinco marcadores, tres para la variables TCRt (TM1418, TM0186 y TM0299) y dos para la variable RTR (TM0049, TM0616)(Cuadro 18).

Se observaron seis QTLs, donde el alelo del parental *Lj. Gifu* fue superior solo en NaCl, en tanto que en la condición control y PEG el alelo superior fue el del parental *L. burttii*. Los marcadores asociados fueron TM0406 y TM0140 para la variable TCRt, el marcador TM0324 para la variable TCRr y los marcadores TM0002, TM0406 y TM0803 para la variable TCRtotal (Cuadro 18).

Tres QTLs fueron detectados para más de una variable. En primer lugar el QTL asociado al marcador TM0406 se detectó para las variable TCRt y TCRtotal, en ambas variables el alelo del parental *L. burttii* fue superior en la condición control y PEG en tanto que en NaCl, el alelo del parental *Lj. Gifu* fue superior al alelo del parental *L. burttii* (Cuadro 18). En segundo lugar, el QTL asociado al marcador TM0324 fue detectado para las variables TCRr y RTR. Para la TCRr el alelo del parental *L. burttii* fue superior en control y PEG, mientras que en NaCl fue superior el alelo del parental *Lj. Gifu*. Para la RTR el comportamiento observado fue el inverso, *Lj. Gifu* fue superior en control y PEG mientras que en NaCl el alelo superior fue el del parental *L. burttii*.

En tercer lugar para la TCRr y TCRtotal, se detectó un QTL asociado al marcador TM0065. En ambas variables el alelo del parental *Lj. Gifu* fue superior en control y PEG, en tanto que el alelo del parental *L. burttii* fue superior en NaCl (Cuadro 18).

El QTL asociado al marcador TM0996 para la variable TCRt, y el QTL asociado al marcador TM0582 para la variable TCRr. Son los únicos QTLs en los cuales la superioridad del alelo del parental *L. burttii* se observó solo en PEG, para estos QTLs el alelo del parental *Lj. Gifu* fue superior en control y NaCl (Cuadro 18). El QTL asociado al marcador TM0219 detectado para la variable TCRtotal fue el único QTL en la cual la superioridad del alelo del parental *Lj. Gifu* se observó solo en la condición control (Cuadro 18).

Cuadro 18. Marcadores moleculares asociados a variables de crecimiento en tres condiciones experimentales. Se muestran los alelos favorables en cada condición experimental.

Variable	Cromosoma	Marcador	Condición experimental		
			Control	PEG	NaCl
TCRt	1	TM1418	BB	BB	BB
	3	TM0996	GG	BB	GG
	3	TM0406	BB	BB	GG
	5	TM0186	BB	BB	BB
	5	TM0299	BB	BB	BB
	6	TM0140	BB	BB	GG
TCRr	1	TM0324	BB	BB	GG
	2	TM0065	GG	GG	BB
	6	TM0582	GG	BB	GG
TCRtotal	1	TM0002	BB	BB	GG
	2	TM0065	GG	GG	BB
	2	TM0803	BB	BB	GG
	3	TM0406	BB	BB	GG
	4	TM0219	GG	BB	BB
RTR	1	TM0324	GG	GG	BB
	3	TM0859	GG	GG	GG
	3	TM0049	BB	BB	BB
	3	TM0616	BB	BB	BB

TCRt: Tasa de crecimiento relativo de tallo. TCRr: Tasa de crecimiento relativo de raíz. TCRtotal: Tasa de crecimiento relativo total. RTR: Relación raíz tallo. Control (solo medio B&D), NaCl (medio B&D +150 mM de NaCl), D) PEG (medio B&D + 15 % de PEG). La condición NaCl y PEG imponen la misma presión osmótica (-0,85 MPa)... BB: alelo en homocigosis para el parental *L. burttii*. GG: alelo en homocigosis para el parental *Lj. Gifu*.

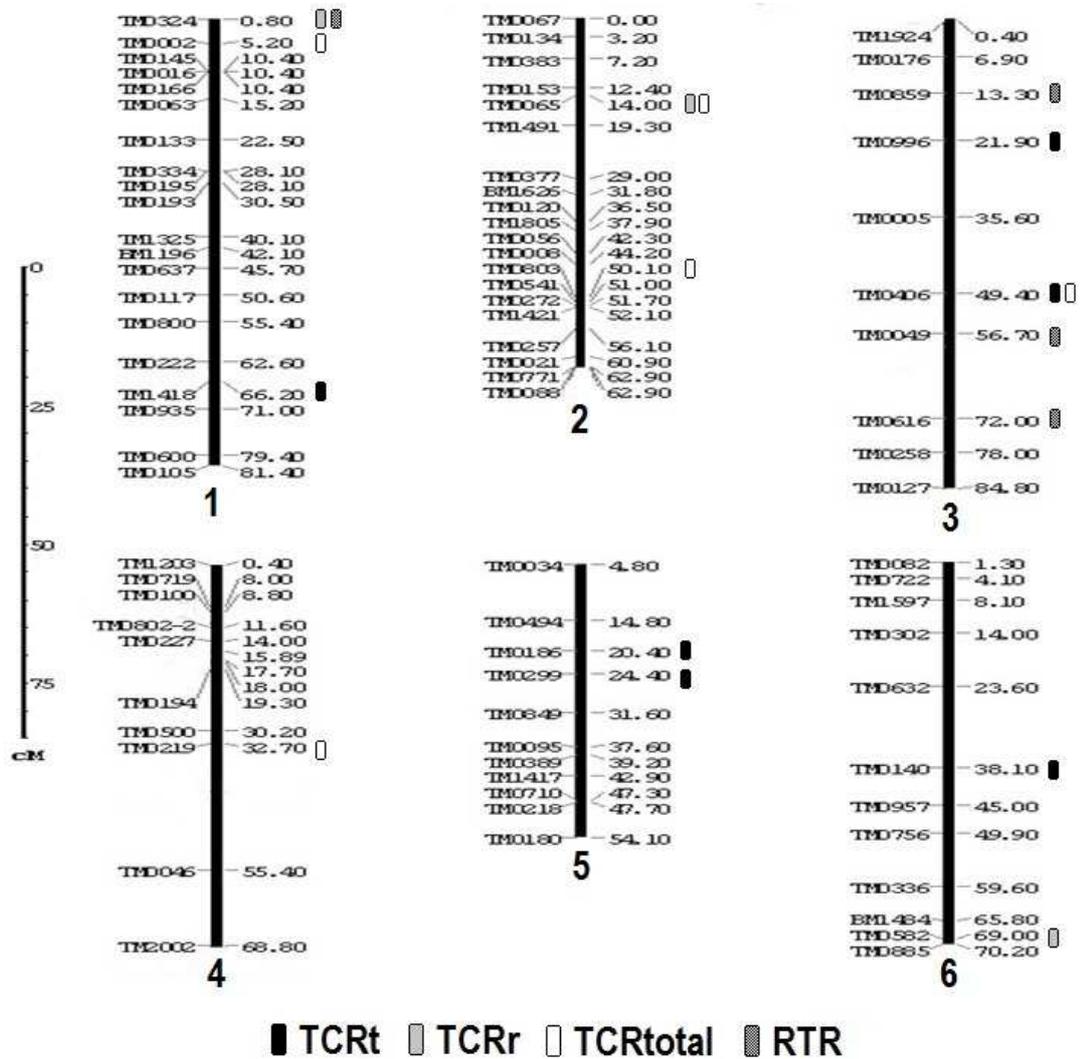


Figura 25: Posición sobre mapa genético de todos los QTLs detectados de la población RILs Lj. Gifu x L. burttii. Las variables analizadas fueron Tasa de crecimiento relativo de tallo, raíz y total (TCRt, TCRr y TCRtotal respectivamente) y la relación tallo raíz (RTR).

4 DISCUSIÓN

El fenotipo de una planta a lo largo de su desarrollo resulta de la interacción de su genoma con diferentes condiciones ambientales. Esto involucra complejos procesos de regulación génica a nivel transcripcional post-transcripcional, traduccional y postraduccional. (Mazzucotelli *et al.*, 2008 Ansins, 2002, Tuberosa *et al.*, 2002). La determinación del fenotipo es de fundamental importancia, ya que el mismo expresa la productividad de las plantas y por ende de alimentos. En el actual contexto de crecimiento demográfico y cambio climático global la producción sustentable de alimentos es un objetivo principal de la biología vegetal.

En los últimos años el gran esfuerzo puesto en estudios genómico/genéticos, incrementó enormemente la generación de información de recursos genéticos en amplio rango de especies (Mifflin, 2000). Inicialmente, las investigaciones se enfocaron en el estudio de la función de cada gen en particular, utilizando abordajes de genética directa y genética reversa, desarrollándose para esto métodos de transgénesis para sobreexpresión, silenciamiento de genes y bancos de mutantes obtenidos de diferentes formas. Asimismo, en los últimos años se ha revalorizado el aporte de la genética cuantitativa asistida por marcadores moleculares en el estudio de determinantes de caracteres complejos de la productividad bajo condiciones adversas (Mackay *et al.*, 2009).

Sin embargo, todo este esfuerzo puesto en la genómica no se correspondió con similares esfuerzos en el entendimiento del fenotipo correspondiente, lo cual ha llevado a incrementar, lo que se conoce como *phenotype gap* (Versaules *et al.*, 2006, Mifflin, 2000). Por lo que, contar con sistemas de fenotipado robustos y confiables, que permitan realizar caracterizaciones de parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos frente a diferentes condiciones ambientales es de crucial importancia para el aprovechamiento de las diferentes herramientas genéticas y genómicas (Melchiorre *et al.*, 2009). Esto permitirá establecer las correlaciones entre variables genotípicas y fenotípicas tendientes a identificar los determinantes de las respuestas de interés.

En este contexto, la utilización de plantas modelos ha sido de fundamental importancia. Inicialmente, dentro de leguminosas las plantas modelo fueron *Lotus sp.* y *Medicago truncatula* (Udvardi *et al.*, 2005). En Lotus un mejor entendimiento de las especies modelos diploides del género aportaran valiosa información a los programas de mejoramiento de las especies tetraploides de Lotus como cultivo forrajero (Hougaard *et al.*, 2008, Kawaguchi *et al.*, 2005, Flowers, 2004, Sandal *et al.*, 2002). En este sentido, hay comparativamente poca información sobre la caracterización fisiológica bajo estrés salino y osmótico en los Lotus modelos (Sánchez *et al.*, 2010, Melchiorre *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se llevó a cabo el fenotipado, caracterizando parámetros de crecimiento y desarrollo, de tres genotipos de Lotus: *Lotus japonicus* (MG20 y GIFU) y *Lotus burttii* y de una población de RILs producto del cruzamiento interespecífico de *Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii* frente a condiciones de estrés salino y osmótico.

4.1 COMPARACION DE DIFERENTES SISTEMAS DE FENOTIPADO EN ESTRÉS SALINO

Con el objetivo de realizar un estudio comparativo de diferentes sistemas de cultivo para el fenotipado de *Lotus spp.* frente a diferentes condiciones se analizaron variables de crecimiento y desarrollo de *Lotus japonicus* (MG20 y Gifu) y *Lotus burttii* cultivado en placas de petri agarisada, *pouches*, hidroponía y macetas con vermiculita, conteniendo todos los sistemas la misma solución mineral nutritiva en presencia o no de NaCl.

Los resultados de este estudio comparativo mostraron que los patrones de respuestas de la planta, a condiciones control y de estrés, fueron similares en los distintos sistemas, obteniéndose cambios relativos en parámetros de crecimiento y desarrollo similares entre los diferentes sistemas de cultivo ensayados.

Cada sistema de cultivo tuvo efectos diferenciales sobre los crecimientos absolutos de raíz, tallo y planta entera. Particularmente en macetas el tamaño final alcanzado fue mayor al que se logró en cualquiera de los otros sistemas. Esto permite suponer que la maceta es el sistema que menos condicionantes impone al crecimiento de la planta.

Los sistemas de placas, *pouches* e hidroponía, en contraposición al sistema de macetas, permiten realizar muestreos no destructivos de parámetros de crecimiento y desarrollo. Esto posibilita obtener cinéticas de crecimiento frente a diferentes estreses; pudiéndose así determinar condiciones discriminantes de intensidad, dadas por el tiempo y el nivel de estrés, en las cuales los genotipos evaluados muestran las máximas diferencias en los parámetros de respuesta seleccionados. Estos estudios cinéticos permiten definir la etapa del desarrollo de la planta que es más sensible a la condición de estrés, que es lo que se conoce como periodo crítico, el que en forrajas estaría dado por la etapa de crecimiento vegetativo exponencial. Esto es importante ya que las respuestas de la planta al estrés abiótico, como sequía y salinidad, están directamente relacionadas con la intensidad de estrés y el estado de desarrollo de la planta (Khan *et al.*, 2010, Munns, 2009, Melchiorre *et al.*, 2009, Versuales *et al.*, 2006).

Por otro lado los distintos sistemas imponen limitaciones en el número de plantas que se pueden evaluar por “recipiente” y por ensayo. Esto es determinante al momento de elegir el diseño experimental y el análisis estadístico más adecuado para la validación de los datos obtenidos. En nuestra experiencia, luego de experimentar con distintos sistemas de fenotipado, concluimos que el sistema de hidroponía aporta ventajas en este punto, ya que se pueden cultivar simultáneamente un número elevado de plantas/genotipos, en un espacio relativamente reducido, lo que permite disminuir considerablemente las variaciones dadas por el error experimental del sistema y la varianza genética sobre las variables de respuestas estudiadas.

Estas características del sistema de hidroponía, permite aplicar diseños experimentales más complejos, que aquellos que se pueden aplicar en los otros sistemas de cultivo, pudiéndose utilizar modelos lineales mixtos que permiten determinar los efectos de cada tratamiento en el contexto de los diseños experimentales de cada ensayo. Otra de las ventajas del sistema de hidroponía para fenotipado frente a condiciones de estrés salino y osmótico; es que permite tener concentraciones de sales y presiones osmóticas exactas del medio.

Todas estas características nos permiten postular al sistema de hidroponía como un sistema óptimo para la caracterización de las respuestas frente a condiciones de estrés salino y osmótico de genotipos parentales, líneas puras y poblaciones de mapeo como las RILs.

4.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE DOS GENOTIPOS DIPLOIDES DE LOTUS: *Lotus japonicus* GIFU y *Lotus burttii* EN ESTRÉS SALINO Y OSMÓTICO

Cuantificar el estrés en especies muy relacionadas es particularmente difícil, sobretodo porque el efecto del estrés sobre el crecimiento cambia según el tiempo en el cual las plantas estuvieron sometidas a la condición de estrés (Munns, 2002).

En todos los sistemas ensayados el NaCl inhibió el crecimiento del tallo tanto en *Lotus japonicus* Gifu como en *Lotus burttii*. Sin embargo, salvo en placas, el crecimiento del tallo de *Lj. Gifu* fue mayor a *L. burttii*. La respuesta en estrés osmótico fue inversa, observándose las menores tasas de crecimiento de tallo en *Lj. Gifu* que en *L. burttii*.

Según Munns (2009) el NaCl impone un estrés osmótico y iónico. En este sentido la respuesta de tolerancia al NaCl observada en *Lj. Gifu* podría estar asociada a una tolerancia iónica ya que en estrés osmótico, este genotipo mostró menores tasas de crecimiento del tallo. Por otra parte la TDF aumentó en *Lj. Gifu* y disminuyó en *L. burttii*, lo cual sugiere un efecto diferencial de la salinidad sobre el desarrollo de estos dos genotipos.

En la evaluación de las respuestas al estrés es importante considerar la escala temporal ya que los mecanismos que controlan el crecimiento en cada especie pueden ser diferentes (Munns, 2002). En este sentido se observó que en ensayos a largo plazo el NaCl tuvo un efecto inductor sobre el crecimiento de la raíz y total de *Lj. Gifu*, en tanto que en *L. burttii* el efecto del NaCl fue inhibitorio. En este ensayo a largo plazo, se observó una alta RTR en *Lj. Gifu* en tanto que el *L. burttii* esta relación fue menor a uno. La alta RTR observada en *Lj. Gifu* indica que la estrategia de tolerancia al NaCl de este genotipo puede estar asociada con la homeostasis iónica en tallos hojas y raíces (Yamaguchi y Blumwald, 2005). Estos resultados coinciden con lo reportado por Melchiorre *et al.* (2009) donde se muestra que el genotipo *Lj. Gifu* acumula

significativamente más cantidad de iones Na^+ en tallo de los que acumula *L. burttii*, sin embargo, también mostró menores relaciones sodio potasio y una mayor proporción del Na^+ total en raíz.

Asimismo, en *L. burttii* el estrés salino indujo cambios redox tempranos que podrían estar implicados con la señalización e inducción de la actividad del sistema antioxidante en tratamientos de larga duración (Melchiorre *et al.*, 2009). En la actualidad está ampliamente aceptado que el mantenimiento de altas relaciones está directamente relacionado con la tolerancia a la salinidad (Munns y Tester, 2008, Shabala y Cuin, 2007). La relación K^+/Na^+ mantiene una homeostasis iónica que permite la actividad de enzimas citosólicas, el potencial de membrana plasmática y condiciones osmóticas implicadas en la regulación del volumen celular (Yamaguchi y Blumwald, 2005, Munns *et al.*, 2002)

Los niveles de K^+ citoplasmico pueden ser mantenidos evitando la salida inducida por NaCl a través del incremento de la actividad de las H^+/ATP asas, lo que regula los canales voltaje dependientes de salida de K^+ , esto mantiene el potencial de membrana necesario para el transporte activo secundario de iones y facilitando la extrusión de Na^+ del citoplasma al apoplasto por antitransporte de Na^+/H^+ (Shabala y Cuin, 2007).

Las respuestas frente a estrés osmótico de estos genotipos fueron opuestas a las observadas frente a estrés salino. El estrés osmótico indujo las tasas crecimiento tanto de tallo como raíz de *L. burttii*, mientras que no tuvo efecto sobre el crecimiento de tallo, pero si afecto negativamente el crecimiento de raíz de *Lj. Gifu*. Estos efectos diferenciales sobre los crecimientos de raíz y tallo, determina que: a) la tasa de crecimiento total de *L. burttii* aumente mientras que la *Lj. Gifu* disminuya, y b) que la RTR de *L. burttii* no se afecte y que la de *Lj. Gifu* disminuya frente a estrés osmótico. Por otra parte la TDF incremento en ambos genotipos bajo estrés osmótico, siendo mayores los valores observados en *Lj. Gifu*. La aceleración de la fenología parece ser una respuesta común de *Lj. Gifu* frente a condiciones de estrés osmótico y salino.

Este conjunto de resultados sugerirían que *Lj. Gifu* tendría mayor nivel de tolerancia a estrés salino, mientras que *L. burttii* sería un genotipo con mayor tolerancia al estrés osmótico.

4.3 MAPEO DE QTLs ASOCIADOS A LA TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO Y OSMÓTICO EN UNA POBLACION DE LINEAS RECOMBINANTES PURAS DE *Lotus japonicus* Gifu x *Lotus burttii*.

El éxito en el mapeo de QTLs requiere una alta calidad en los datos tanto genotípicos como fenotípicos, para ello se deben identificar y corregir errores en los datos antes de comenzar con la búsqueda de QTLs.

Identificar la información faltante en genoma de la población de mapeo puede ayudarnos a detectar regiones donde futuros marcadores deben ser etiquetados. Asimismo, la falta de información genotípica en algunas regiones puede generar evidencias de ligamiento falsos por tanto la evaluación del patrón de datos faltantes permite identificar posibles problemas en la detección de QTLs (Broman y Sen, 2009).

Luego de remover los marcadores e individuos con un porcentaje muy alto de datos faltantes (más de 30 y 50 % respectivamente), se observó un patrón aleatorio en la distribución de datos faltantes en la matriz de datos genotípicos, este es un punto crítico en el mapeo de QTLs (Broman y Sen, 2009).

Otro punto importante en el chequeo de la información genotípica es verificar la segregación de todos los marcadores, es decir que el genotipo de los marcadores aparezca en la proporción esperada (1:1 para una población RIL), distorsión en la frecuencia de segregación esperada puede indicar errores en el genotipado de los marcadores (Broman y Sen, 2009, Broman, 2005).

El último paso en el chequeo de los datos genotípicos es verificar la posición de los marcadores dentro de cada grupo de ligamiento, para ello se usan funciones (Haldane y

Kosambi) (Margarido *et al.*, 2007) que convierten el frecuencias de recombinación observadas en distancias entre los marcadores en cada cromosoma.

Una vez realizados todos los chequeos antes mencionados se pudo constatar que el mapa de ligamiento, que surge a partir de los datos genotípicos, puede ser utilizado en estudios exploratorios de mapeo de QTLs.

Cuando se analizó la respuesta fenotípica de la población RILs, en la condición control se observó una distribución de frecuencia del tipo normal, mientras que en estrés salino la Tasa de Crecimiento Relativo de tallo (TCRt) mostro una distribución de frecuencia del tipo binodal. En el caso del estrés osmótico este comportamiento se observó para la Tasa de crecimiento de raíz (TCRr). Este resultado es interesante ya que como cada RIL es un genotipo individual, este comportamiento puede ser asociado a una característica genética particular (Collard *et al.* 2005, Tuberosa *et al.*, 2002, Tanksley, 1993).

Si los efectos de los distintos alelos de un QTL difieren en su magnitud o sentido (+/-) en diferentes *backgrounds* genéticos, entonces el efecto del QTL es dependiente del contexto (Mackay *et al.*, 2009). Sin embargo pocos trabajos se han dedicado a la incorporación de la interacción genotipo ambiente (GEI) en los métodos de detección de QTL (Malosetti *et al.*, 2004).

Dentro de los modelos utilizados para la detección de QTLs, los modelos mixtos son particularmente adecuados en el caso de situaciones complejas como es el modelado de la GEI (Malosetti *et al.*, 2011). En esta tesis el uso de modelos mixtos permitió identificar los efectos específicos de cada QTLs en cada una de las condiciones experimentales ensayadas.

Así en algunas condiciones el alelo del parental *Lj. Gifu* confiere una ventaja sobre el alelo del parental *L. burttii* y en otros el alelo de *L. burttii* fue superior al alelo de *Lj. Gifu*. Por lo tanto se puede suponer que la mejor constitución genotípica es condición dependiente. Un ejemplo de esto sería la región del cromosoma 1 cercana al marcador TM0324 (0,8 cM). En esta región se observó que si el QTL asociado a este marcador tiene el alelo del parental femenino *Lj. Gifu* la raíz crece menos en control y estrés osmótico, sin embargo crece más en estrés salino.

En cambio si el marcador tiene el alelo del parental *L. burtii* el comportamiento es el inverso, crece más en control y estrés osmótico y menos en estrés salino. Estos efectos se comprobaron para las variables TCRr y RTR. Por lo tanto, para buscar genes asociados al comportamiento de la raíz en estrés iónico y osmótico la región cercana al marcador TM0324 se presenta como una región a ser investigada con más detalle.

En términos generales, se podría establecer que *L. burtii* aporta alelos que explican mayoritariamente las respuestas a estrés osmótico mientras que los alelos de *Lj. Gifu* aportan a explicar las respuestas a estrés salino. En este contexto, de los 18 QTLs identificados, 14 son superiores para el alelo del parental *L. burtii* en las respuestas a estrés osmótico, mientras que 9 muestran una superioridad del alelo del parental de *Lj. Gifu* en las respuestas a estrés salino.

Este aporte diferencial de los alelos de *L. burtii* y *Lj. Gifu* en QTLs relacionados a estrés osmótico y salino, respectivamente, es coherente con los resultados obtenidos en la caracterización de estos genotipos parentales en estos estreses.

Las condiciones estrés osmótico/hídrico inhiben el crecimiento celular por elongación, la tasa fotosintética y aumentan en la generación de especies activas del oxígeno y el daño oxidativo asociados a las mismas. Las respuestas de las plantas a estas condiciones implican repuestas de evitación escape y tolerancia aumentos de ABA, cierre estomático, osmorregulación, aumento de la defensa antioxidante y retardo de procesos asociados a la senescencia (Khan *et al.*, 2010, Ashraf y Foolad, 2007).

Estas repuestas están moduladas por los diferentes niveles de regulación génica. En la actualidad existen varios estudios de transcriptómica, proteómica y metabolómica asociados a la respuesta a estrés hídrico (Mazzucotelli *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2003).

Trabajos del grupo de Dr. Monza muestran plantas de *Lotus japonicus* sometidas a estrés hídrico mostraron aumentos del daño oxidativo, expresado por la peroxidación lipídica, y de la actividad de algunas enzimas antioxidantes. Asimismo, demostraron que tanto el estrés hídrico

como el salino inducen la acumulación de prolina (Díaz *et al.*, 2005) respuesta que también ocurre *Lj. burttii* con *Lj. Gifu* bajo estrés hídrico (datos no mostrados).

En estudios previos de caracterización de estos genotipos frente a estrés salino, donde se determinaron niveles de Na⁺, K⁺ y sus relaciones; *Lj. Gifu* mostró mayores niveles de Na⁺ y mayores relaciones K⁺/Na⁺ tanto en raíz como en tallo (Melchiorre *et al.*, 2009). Asimismo, *Lj. Gifu* fue el único genotipo que mostró diferencias en la relación glutatión reducido glutatión oxidado en ensayos de corta duración (Melchiorre *et al.*, 2009). Esta dupla redox es un determinante principal del estado redox celular, el cual modula diversas respuestas de aclimatación y tolerancia a condiciones de estrés (Maggio *et al.*, 2007, Cuartero *et al.*, 2006). Relacionado con esto en los ensayos de larga duración en estrés salino, se pudo observar que *Lj. Gifu* fue el que mostró los mayores niveles de actividad de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa, glutatión reductasa y ascorbato peroxidasa (Melchiorre *et al.*, 2009).

Todos estos resultados parecen sugerir que *Lj. Gifu* desarrollaría un proceso de aclimatación frente a estrés salino, sustentado en parte en la osmorregulación por acumulación de iones (Na⁺ y K⁺), presumiblemente en vacuola, y acumulación de prolina en citoplasma; y por otra parte en el sensado de cambios redox tempranos e inducción de la defensa antioxidante. En consecuencia una de las perspectivas que surgen de este trabajo es ver si los QTLs asociados a la tolerancia a la salinidad aportado por alelos de *Lj. Gifu*, estarían relacionados con la osmorregulación, la homeostasis iónicas y con eventos de señalización redox y defensa antioxidante. En tanto que la superioridad de los alelos del parental *L. burttii* puede deberse a una mayor producción de compuestos osmocompatibles y síntesis de proteínas de protección, como las dehidrinas y proteínas LEA (*late-embryogenesis-abundant*) (Khan *et al.*, 2010, Ashraf y Foolad, 2007).

Como perspectiva general de este trabajo surge la necesidad de identificar, los genes codificados en los QTLs asociados a la tolerancia al estrés osmótico y salino. Inicialmente se plantea una identificación *in silico* de estos genes que posteriormente posibiliten el estudio de su función por genética reversa y directa. En tal sentido, en esta tesis se establecieron las condiciones experimentales y las estrategias de análisis que permitirán seguir las perspectivas planteadas.

5 BIBLIOGRAFÍA

- Agbicodo, E. M.; Fatokun, C. A.; Muranaka, S.; Visser, R. G. F.; Linden van der, C. G. 2009. Breeding drought tolerant cowpea: constraints, accomplishments, and future prospects. *Euphytica*. 167: 353-370.
- Apse, M. P.; Blumwald, E. 2007. Na⁺ transport in plants. *FEBS Letters*. 581: 2247-2254.
- Ashraf, M. 2010. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnology Advances*. 28:169-183.
- Ashraf, M.; Foolad, M. R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*. 59: 206-216.
- Asíns, M. J. 2002. Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding*. 121: 281-291.
- Athar, H. R.; Ashraf, M. 2009. Strategies for Crop Improvement Against Salinity and Drought Stress: An Overview. En: Ashraf, M.; Ozturk, M.Ñ.; Athar, H. R. eds. *Salinity and Water Stress Improving Crop Efficiency*. Osnabrueck, Germany, Springer. pp. 1-16.
- Borsani, O.; Valpuesta, V.; Botella, M. A. 2003. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 73: 101-115.
- Borsani, O.; Cuartero, J.; Fernández, J. A.; Valpuesta, V.; Botella, M. A. 2001. Identification of Two Loci in Tomato Reveals Distinct Mechanisms for Salt Tolerance. *The Plant Cell*. 13: 873-887.
- Botella, M.A, Rosado, A.; Bressan R.A.; Hasegawa, P.M. 2005. Plant adaptive responses to salinity stress. En: Matthew. A. ed. *Plant abiotic Stress*. Oxford, Blackwell Publishing. pp38-62.
- Broman, K. W.; Sen, S. 2009. *A Guide to QTL Mapping with R/qtl*. New York, Springer. pp 1-177.
- Broman, K. W. 2005. The Genomes of Recombinant Inbred Lines. *Genetics*. 169: 1133-1146.
- Broman, K.W., Sen, W. H., S, Churchill, G.A. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*. 19:889-890.
- Broughton W.J. and Dilworth M.J. 1971. Control of leghemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem. Journ*. 125: 1075-1080.

- Collard, B. C. Y.; Jahufer, M. Z. Z.; Brouwer, J. B.; Pang, E. C. K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*. 142: 169-196.
- Cuartero, J.; Bolarín, M. C.; Asíns, M. J.; Moreno, V. 2006. Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany*. 57: 1045-1058.
- Díaz, P.; Monza, J.; Márquez, A. 2005. Drought and saline stress in *Lotus japonicus*. En: Márquez, A. J. ed. *Lotus japonicus Handbook*. Dordrecht, The Netherlands, Springer. pp 39-50.
- Doerge, R. C. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat. Rev. Genet.* 3: 43-52.
- Doyle, J. J.; Luckow, M. A. 2003. The Rest of the Iceberg. Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context. *Plant Physiology*. 131: 900-910.
- Flowers, T. J. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of experimental botany*. 55:307-19.
- Gondo, T.; Sato, S.; Okumura, K.; Tabata, S.; Akashi, R.; Sachiko, I. 2007. Quantitative trait locus analysis of multiple agronomic traits in the model legume *Lotus japonicus*. *Genome*. 50: 627-637.
- Gong, Z.; Koiwa, H.; Cushman, M. A.; Ray, A.; Bufford, D.; Kore-eda, S.; Matsumoto, T. K.; Zhu, J.; Cushman, J. C.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. 2001. Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (sos) mutants. *Plant Physiology*. 126: 363-375.
- Graham, P. H.; Vance, C. P. 2003. Legumes : Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*. 131: 872-877.
- Hageman, J. A.; Malosetti, M.; Van Eeuwijk, F. A. Two-mode clustering of genotype by trait and genotype by environment data. *Euphytica_Online First*TM. 18 August 2010
- Handberg, K.; Stougaard, J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*. 2:487-496.
- Hasegawa, P. M.; Bressan, R. A.; Zhu, J.K.; Bohnert, H. J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.
- Hougaard, B. K.; Madsen, L. H.; Sandal, N.; Moretzsohn, M. D. C.; Fredslund, J.; Schauser, L.; Nielsen, A. M.; Rohde, T.; Sato, S.; Tabata, S.; Bertioli, D. J.; Stougaard, J. 2008. Legume Anchor Markers Link Syntenic Regions Between *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* and *Arachis*. *Genetics*. 179: 2299-2312.

- Jansen, R.C. and Stam, P. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics*. 136: 1447–1455.
- Jiang, Q.; Gresshoff, P. M. 1997. Classical and Molecular Genetics of the Model Legume *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10: 59-68.
- Jones, N.; Ougham, H.; Howard, T. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytol.* 137: 165-177.
- Kawaguchi, M.; Pedrosa-Harand, A.; Yano, K.; Hayashi, M.; Murooka, Y.; Saito, K.; Nagata, T.; Namai, K.; Nishida, H.; Shibata, D.; Sato, S.; Tabata, S.; Hayashi, M.; Harada, K.; Sandal, N.; Stougaard, J.; Bachmair, A.; Grant, W. F. 2005. *Lotus burttii* Takes a Position of the Third Corner in the Lotus. *DNA Research*. 12: 69-77.
- Kawaguchi, M. 2000. *Lotus japonicus* "Miyakojima" MG-20: An early flowering accession suitable for indoor handling. *J. Plant Res.* 113:507-509.
- Khan, H. R.; Paull, J. G.; Siddique, K. H. M.; Stoddard, F. L. 2010. *Faba bean* breeding for drought-affected environments: A physiological and agronomic perspective. *Field Crops Research*. 115: 279-286.
- Mackay, T. F. C. 2001. The Genetic Architecture of Quantitative Trait. *Annu. Rev. Genet.* 35: 303-339.
- Mackay, T. F. C.; Stone, E. A.; Ayroles, J. F. 2009. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nature reviews. Genetics*. 10: 565-77.
- Maggio, A.; Raimond, I. G.; Martino, A.; De Pascale, S. 2007. Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environmental and Experimental Botany*. 59: 276-282.
- Malosetti, M.; Van Eeuwijk, F. A.; Boer, M. P.; Casas, A. M.; Elía, M.; Moralejo, M.; Bhat, P. R.; Ramsay, L.; Molina-Cano, J.L. 2011. Gene and QTL detection in a three-way barley cross under selection by a mixed model with kinship information using SNPs. *Theoretical and applied genetics*. 122: 1605-16.
- Malosetti, M.; Voltas, J.; Romagosa, I.; Ullrich, S. E.; Van Eeuwijk, F. A. 2004. Mixed models including environmental covariables for studying QTL by environment interaction. *Euphytica*. 137: 139-145.
- Margarido, G.R.A.; Souza, A.P.; Garcia, A.A.F. 2007. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas*. 144: 78-79.

- Mazzucotelli, E.; Mastrangelo, A.; Crosatti, C.; Guerra, D.; Stanca, A.; Cattivelli, L. 2008. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Science*. 174: 420-431.
- Melchiorre, M.; Quero, G. E.; Parola, R.; Racca, R.; Trippi, V. S.; Lascano, R. 2009. Physiological characterization of four model *Lotus* diploid genotypes: *L. japonicus* (MG20 and Gifu), *L. filicaulis*, and *L. burttii* under salt stress. *Plant Science*. 177: 618-628.
- Miflin, B. 2000. Crop improvement in the 21st century. *J. Exp. Bot.* 51: 1-8.
- Mitra, J. 2001. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Science*. 80: 758-763.
- Munns, R. 2009. Strategies for Crop Improvement in Saline Soils. En: Ashraf, M.; Ozturk, M.Ñ.; Athar, H. R. eds. *Salinity and Water Stress Improving Crop Efficiency*. Osnabrueck, Germany, Springer. pp 99-110.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25: 239-250.
- Munns, R.; Tester, M. 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 651-81.
- Munns, R.; Husain, S.; Rivelli, A. R.; James, R. A.; Condon, A. G.; Lindsay, M. P.; Lagudah, E. S.; Schachtman, D. P.; Hare, R. A. 2002. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant and Soil*. 247:93-105.
- Nelson, M. N.; Moolhuijzen, P. M.; Boersma, J. G.; Chudy, M.; Wolko, B.; Lesniewska, K.; Bellgard, M.; Oliver, R. P.; Swiecicki, W.; Cowling, W. A.; Ellwood, S. R. 2010. Aligning a New Reference Genetic Map of *Lupinus angustifolius* with the Genome Sequence of the Model Legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research*. 17: 73-83.
- O'Donoghue, L.S.; Raelson, J.V.; Grant, W.F. 1990. A morphological study of interspecific hybrids in the genus *Lotus* (Fabaceae). *Can. J Bot.* 68: 803-812.
- Ohmido, N.; Ishimaru, A.; Kato, S.; Sato, S.; Tabata, S.; Fukui, K. 2010. Integration of cytogenetic and genetic linkage maps of *Lotus japonicus*, a model plant for legumes. *Chromosome Research*. 18: 287-299.
- Pajuelo, E.; Stougaard, J. 2005. *Lotus japonicus* as a model system. En: Márquez, A. J. ed. *Lotus japonicus Handbook*. Dordrecht, The Netherlands, Springer. pp 3-24.
- Pedrosa, A.; Sandal, N.; Stougaard, J.; Schweizer, D.; Bachmair, A. 2002. Chromosomal Map of the Model Legume *Lotus japonicus*. *Genetics*. 161: 1661-1672.

- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2011.
- Sánchez, D. H.; Szymanski, J.; Erban, A.; Udvardi, M. K.; Kopka, J. 2010. Mining for robust transcriptional and metabolic responses to long-term salt stress: a case study on the model legume *Lotus japonicus*. *Plant, cell & environment* 33: 468-80.
- Sandal, N.; Petersen, T. R.; Murray, J.; Umehara, Y.; Karas B.; Yano, K.; Kumagai, H.; Yoshikawa, M.; Saito, K.; Hayashi, M.; Murakami, Y.; Wang, X.; Hakoyama, T.; Imaizumi-Anraku, H.; Sato, S.; Kato, T.; Chen, W.; Hossain, M. S.; Shibata, S.; Wang, T. L.; Yokota, K.; Larsen, K.; Kanamori, N.; Madsen, E.; Radutoiu, S.; Madsen, L. H.; Radu, T. G.; Krusell, L.; Ooki, Y.; Banba, M.; Betti, M.; Rispail, N.; Skøt, L.; Tuck, E.; Perry, J.; Yoshida, S.; Vickers, K.; Pike, J.; Mulder, L.; Charpentier, M.; Müller, J.; Ohtomo, R.; Kojima, T.; Ando, S.; Marquez, A. J.; Gresshoff, P. M.; Harada, K.; Webb, J.; Hata, S.; Sukanuma, N.; Kouchi, H.; Kawasaki, S.; Tabata, S.; Hayashi, M.; Parniske, M.; Szczyglowski, K.; Kawaguchi, M.; Stougaard, J. 2006. Genetics of Symbiosis in *Lotus japonicus*: Recombinant Inbred Lines, Comparative Genetic Maps, and Map Position of 35 Symbiotic Loci. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19:80-91.
- Sandal, N.; Krusell, L.; Radutoiu, S.; Olbryt, M.; Pedrosa, A.; Bachmair, A.; Ketelsen, T.; Stracke, S.; Sato, S.; Kato, T.; Parniske, M.; Tabata, S.; Stougaard, J. 2002. A Genetic Linkage Map of the Model Legume *Lotus japonicus* and Strategies for Fast Mapping of New Loci. *Genetics*. 161: 1673-1683.
- Salekdeh, G. H., Reynolds, M., Bennett, J., Boyer, J. 2009. Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding. *Trends in Plant Science* 14: 488-496.
- Sato, S.; Nakamura, Y.; Kaneko, T.; Asamizu, E.; Kato, T.; Nakao, M.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Ono, A.; Kawashima, K.; Fujishiro, T.; Katoh, M.; Kohara, M.; Kishida, Y.; Minami, C.; Nakayama, S.; Nakazaki, N.; Shimizu, Y.; Shinpo, S.; Takahashi, C.; Wada, T.; Yamada, M.; Ohmido, N.; Hayashi, M.; Fukui, K.; Baba, T.; Nakamichi, T.; Mori, H.; Tabata, S. 2008. Genome Structure of the Legume. *Lotus japonicus*. *Dna Research*. 1-13.
- Sato, S.; Tabata, S. 2006. *Lotus japonicus* as a platform for legume research. *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 128-132.
- Schneider, K. 2005. Mapping Populations and Principles of Genetic Mapping. En: Meksem, K.; Kahl, G. eds. *The Handbook of Plant Genome Mapping. Genetic and Physical Mapping*. Weinheim, wiley-vch. pp 3-20.
- Shabala, S., Cuin, T. A. 2007. Potassium transport and plant salt tolerance, *Physiologia Plantarum*. 133: 651-669.

- Sharp, R. E.; Poroyko, V.; Hejlek, L. G.; Spollen, W. G.; Springer, G. K.; Bohnert, H. J.; Nguyen, H. T. 2004. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of experimental botany*. 55: 2343-51.
- Singh, R. J.; Chung, G. H.; Nelson, R. L. 2007. Landmark research in legumes. *Genome*. 50: 525-537.
- Stougaard, J. and Beuselinck, P.R. 1996. Registration of GIFU B-129-S9 *Lotus japonicus* germplasm. *Crop Science*. 36: 476
- Szczyglowski, K.; Stougaard, J. 2008. *Lotus* genome: pod of gold for legume research. *Trends in Plant Science*. 13: 515-517.
- Tanksley, S. D. 1993. Mapping Polygenes. *Annu. Rev. Genet.* 27:205-233.
- Thoday, J. M. 1961. Location of polygenes. *Nature*. 19:1 368–370.
- Tsubokura, Y.; Onda, R.; Sato, S.; Xia, Z.; Hayashi, M.; Fukushima, Y.; Tabata, S.; Harada, K. 2008. Characterization of soybean genome based on synteny analysis with *Lotus japonicus*. *Breeding Science*. 58: 157-167.
- Tuberosa, R.; Salvi, S.; Sanguineti, M. C.; Landi, P.; Maccaferri, M.; Conti, S. 2002. Mapping QTLs Regulating Morpho-physiological Traits and Yield : Case Studies , Shortcomings and Perspectives in Drought-stressed Maize. *Annals of Botany*. 89:941-963.
- Udvardi, M. K.; Tabata, S.; Parniske, M.; Stougaard, J. 2005. *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *Trends in Plant Science*. 10: 222-228.
- Varshney, R. K.; Marcel, T. C.; Ramsay, L.; Russell, J.; Röder, M. S.; Stein, N.; Waugh, R.; Langridge, P.; Niks, R. E.; Graner, A. 2007. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theoretical and applied genetics*. 114: 1091-103.
- Verslues, P. E.; Agarwal, M.; Katiyar-Agarwal, S.; Zhu, J.; Zhu, J.K. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*. 45: 523-539.
- Wang, C.; Zhang, L.; Huang, R. 2011. Cytoskeleton and plant salt stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*. 6: 29-31.
- Wang, W.; Vinocur, B.; Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*. 218: 1-14.
- Wang, Y.; Li, X. 2008. Salt stress-induced cell reprogramming, cell fate switch and adaptive plasticity during root hair development in *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior* 3: 436-8.

- Yamaguchi, T.; Blumwald, E. 2005. Developing salt-tolerant crop plants : challenges and opportunities. *Trends in Plant Science*. 10: 615-620.
- Zhang, H. X.; Hodson, J. N.; Williams, J. P.; Blumwald, E. 2001. Engineering salt-tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *PNAS*. 98:12832-6.
- Zhu, H.; Choi, H.K.; Cook, D. R.; Shoemaker, R. C. 2005. Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. *Plant Physiology*. 137: 1189-1196.
- Zhu, J.K. 2001. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biology*. 4: 401-406.

6 ANEXO