

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE AGRONOMIA**

**MARCADORES BIOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS DE RESPUESTA A
ESTRÉS HÍDRICO EN *Lotus uliginosus*.**

por

Florencia FERRES JAUNSOLO

**TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2008**

Tesis aprobada por:

Director: _____
Dr. Jorge Monza

Ing. Agr. Omar Borsani

Ing. Agr. Mónica Rebuffo

Fecha: _____
29 de mayo de 2008

Autor: _____
M^a Florencia Ferrés Jaunsolo

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Jorge Monza, director de mi tesis, por el asesoramiento brindado en cada etapa de este trabajo.
- A Pedro Díaz por su invaluable dedicación y colaboración constante.
- A Omar Borsani, por el apoyo brindado en todo momento.
- A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de bioquímica, en especial a la Ing. Agr. Mariana Sotelo, a la Lic. Marta Sainz y a la Lic. Verónica Berriel por su apoyo profesional y estímulo constante.
- A la Ing. Agr. Mónica Rebuffo, por su disposición a participar en el tribunal.
- A mi familia, amigos y a Marcelo, por su apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACION.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCION</u>	1
2. <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	3
2.1 IMPORTANCIA DEL GENERO LOTUS.....	3
2.2 PRINCIPALES CARACTERISTICAS AGRONOMICAS DE LA ESPECIE EVALUADA.....	3
2.2.1 Lotus “Grasslands Maku”.....	3
2.3 EL ESTRÉS EN LAS PLANTAS.....	6
2.4 ESTRÉS HIDRICO.....	7
2.4.1 <u>Resistencia a la sequía</u>	7
2.4.2 <u>Potencial hídrico</u>	8
2.5 ESTRÉS OSMOTICO.....	8
2.5.1 <u>Ajuste osmótico en respuesta al estrés</u>	9
2.6 ESTRÉS OXIDATIVO.....	10
2.7 ACUMULACIÓN DE PROLINA EN LAS PLANTAS.....	11
2.7.1 <u>Metabolismo de la prolina</u>	12
2.7.2 <u>Prolina como defensa antioxidante no enzimática</u>	14
2.8 EMISION DE FLUORESCENCIA DEL PSII COMO PARÁMETRO PARA EVALUAR LA RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO.....	14
2.9 EFICIENCIA DEL USO DEL AGUA O EFICIENCIA TRANSPIRATORIA.....	16
3. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	18
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	18
3.2 CULTIVO DE PLANTAS.....	18
3.2.1 <u>Esterilización y germinación de semillas</u>	18
3.2.2 <u>Condiciones de cultivo y cosecha</u>	18
3.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	19
3.3.1 <u>Prolina y pigmentos fotosintéticos</u>	19
3.3.2 <u>Peroxidación de lípidos de membrana</u>	19
3.4 DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	20
3.4.1 <u>Cuantificación de prolina</u>	20
3.4.2 <u>Cuantificación de pigmentos fotosintéticos</u>	20
3.4.3 <u>Contenido relativo de agua</u>	20
3.4.4 <u>Eficiencia transpiratoria mediante discriminación isotópica del ¹³C</u>	21

3.4.5 <u>Determinación de parámetros de fluorescencia del PSII...</u>	22
3.4.6 <u>Pérdida de agua de las hojas</u>	22
3.5 <u>DISEÑO EXPERIMENTAL</u>	22
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	23
4.1 <u>CONTENIDO RELATIVO DE AGUA</u>	23
4.2 <u>ACUMULACION DE PROLINA</u>	24
4.3 <u>EVALUACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO MEDIANTE TBARS</u>	27
4.4 <u>CONTENIDO DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS</u>	28
4.5 <u>EMISIÓN DE FLURESCENCIA DEL PSII</u>	31
4.6 <u>PÉRDIDA DE AGUA DE LAS HOJAS</u>	32
4.7 <u>EFICIENCIA EN EL USO DEL AGUA</u>	34
5. <u>CONCLUSIONES</u>	36
6. <u>RESUMEN</u>	37
7. <u>SUMMARY</u>	38
8. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	39

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Valores de discriminación isotópica del ^{13}C en plantas de <i>L. corniculatus</i> y <i>L. uliginosus</i>	34
Figura No.	
1. Vía de síntesis y oxidación de la prolina.....	13
2. Emisión de fluorescencia de una hoja adaptada a la oscuridad (efecto Kautsky).....	15
3. Contenido relativo de agua en hojas de plantas de <i>L. corniculatus</i> y <i>L. uliginosus</i>	24
4. Evolución de la concentración de prolina en hojas de plantas de <i>L. corniculatus</i> y <i>L. uliginosus</i>	25
5. Concentración de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico en hojas de plantas de <i>L. corniculatus</i> y <i>L. uliginosus</i>	28
6. Concentración de pigmentos en hojas de plantas de <i>L. corniculatus</i> y <i>L. uliginosus</i> . (6A: clorofila a, 6B: clorofila b, 6C: carotenoides).....	30
7. Rendimiento fotoquímico máximo del PSII.....	32
8. Pérdida de agua de hojas de plantas de <i>L. corniculatus</i> y <i>L. uliginosus</i>	33

1. INTRODUCCION

A nivel nacional, los sistemas de producción ganaderos se basan en las siguientes alternativas forrajeras: pasturas naturales, praderas cultivadas mezcla de gramíneas y leguminosas y pasturas mejoradas. El potencial de producción del campo natural, está limitado principalmente por la baja disponibilidad de nutrientes especialmente N y P (Del Pino y Hernández, 2002).

Es así que el mejoramiento de campo natural, se basa en la fertilización fosfatada y siembra de leguminosas inoculadas, teniendo como ventaja el aumento de la productividad y menores modificaciones al ecosistema que la sustitución total de la vegetación nativa por una pastura cultivada. No obstante, los verdeos y pasturas cultivadas son una herramienta productiva fundamental en zonas agrícolas – ganaderas y lecheras, así como en situaciones específicas de intensificación creciente de predios ganaderos.

Una leguminosa forrajera de gran interés en la actualidad es el cultivar Grasslands Maku perteneciente a la especie: *Lotus uliginosus Schkuhr*, material pionero de la especie a nivel comercial, liberado en Nueva Zelanda en 1975. En la década del 80 INIA comenzó la evaluación de este material en Uruguay en mejoramientos en cobertura de campo natural, en la región del Cristalino del centro del país; extendiendo el análisis en la década del 90 a las zonas de sierras y lomadas de la región este. Los ensayos realizados mostraron el buen comportamiento de este cultivar, debido fundamentalmente a su aporte invernal, y a su adaptación a suelos con características limitantes (Biassini y De Maio, 2005).

El bajo contenido de agua de los suelos durante el verano constituye uno de los problemas frecuentes que afectan dramáticamente el crecimiento vegetal y la productividad de algunas áreas de pasturas. El conocimiento de las estrategias que diferentes especies vegetales tienen para sobrevivir en condiciones adversas es importante para seleccionar, mejorar e introducir nuevas especies vegetales en un ambiente diferente de forma de obtener mejores rendimientos (Borsani et al., 1999).

El déficit hídrico provocado por períodos prolongados de sequía, genera un descenso en la disponibilidad de agua requerida para diferentes procesos lo que genera, entre otros, cambios en la concentración de muchos metabolitos, seguido de alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos y de los aminoácidos. La aclimatación a la sequía requiere de respuestas que permitan que las reacciones esenciales del metabolismo primario continúen y la planta pueda tolerar el déficit hídrico (Brewitz et al. 1996, Foyer et al. 1998).

Las respuestas de las plantas tendientes a evitar los daños generados por la disminución del potencial hídrico celular son variadas. El mantenimiento del potencial hídrico y de la integridad de las estructuras celulares, son estrategias para sobrellevar el déficit hídrico. Por esto, el conocimiento de estas respuestas puede ayudar a comprender la tolerancia a distintos tipos de estrés.

El objetivo de este trabajo fue evaluar posibles marcadores bioquímicos y fisiológicos de respuesta a déficit hídrico en *L. uliginosus*, en relación con *L. corniculatus*, especie que ha sido estudiada en nuestro medio.

Para esto se plantearon los siguientes objetivos específicos centrados en conocer:

1. La acumulación de prolina en folíolos.
2. El daño oxidativo de membranas.
3. El comportamiento de parámetros fotosintéticos.

2. REVISION BIBILOGRAFICA

2.1 IMPORTANCIA DEL GENERO LOTUS

El género Lotus incluye más de 180 especies que se encuentran distribuidas prácticamente en todo el mundo, y cuatro de ellas, *Lotus corniculatus*, *Lotus uliginosus*, *Lotus glaber* y *Lotus subbiflorus* han sido domesticadas y mejoradas. A su vez, *Lotus japonicus*, otra especie del género relacionada taxonómicamente con las mencionadas anteriormente, es una leguminosa modelo, como *Medicago truncatula*. Información sobre aspectos genéticos, bioquímicos y fisiológicos obtenidos a partir de esta leguminosa modelo permiten profundizar en el conocimiento de las especies de uso agronómico.

Las principales regiones del mundo en que las especies del género Lotus han sido sembradas las constituyen América del Sur, América del Norte y Europa con 1.85, 1.39 y 1.38 millones de hectáreas respectivamente (Díaz et al., 2005b).

Las especies de este género tienen un uso potencial debido a su habilidad para crecer tanto en suelos ácidos como en suelos con baja fertilidad, y por su tolerancia al aluminio, manganeso y cloruro de sodio. *Lotus corniculatus* es la especie del género de mayor distribución e importancia agronómica, además de ser utilizada como biorremediador en suelos contaminados con boro y selenio (Díaz et al., 2005b).

Una de las características más atractivas del género es la presencia de taninos condensados en sus tejidos, que en el rumen (pH 5 - 7) forman con las proteínas de las leguminosas un complejo insoluble, que se vuelve soluble en el duodeno (pH 2 - 3). Esto disminuye o evita el meteorismo, lo que se traduce no solo en una menor incidencia de la “hinchazón de panza”, y por lo tanto menos dificultades en el manejo de los animales en pastoreo, sino que además promueve un mayor potencial nutricional, reduciendo la pérdida de nitrógeno en el rumen e incrementando la digestibilidad a nivel intestinal (Carámbula, 2003).

2.2 PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS DEL CULTIVAR “GRASSLAND MAKU”

El *Lotus uliginosus* cv. Grasslands Maku, fue introducido al país durante los primeros años de la década del `80. Se trata de un cultivar tetraploide originario de Nueva Zelanda; que se logró mediante cruzamientos entre materiales seleccionados en ese país con una línea portuguesa de buen crecimiento invernal.

A partir de su introducción en el Uruguay ha sido incluida en múltiples ensayos de evaluación y caracterización. Carámbula et al. (1994), la describen como material

promisorio para el país por su alta capacidad productiva y su importante contribución invernal.

Las principales características del *Lotus uliginosus* se resumen en la ficha técnica “Lotus rizomatoso” (Carámbula, 2003).

FICHA TÉCNICA: Lotus rizomatoso

Lotus pedunculatus = *Lotus uliginosus* = *Lotus major*

- Perenne estival.
- Prospera en suelos ácidos muy variados, con humedad excesiva pero no es muy tolerante a la sequía.
- Utiliza eficientemente el fósforo, condición satisfactoria para situaciones de producción extensivas.
- Ofrece un elevado potencial de producción primavera-estivo-otoño, y es el lotus perenne que produce más en invierno.
- Requiere manejo cuidadoso mediante pastoreos rotativos, pero admite pastoreos intensos que dejen rastrojos bajos.
- Posee elevado valor nutritivo similar a otras leguminosas de reconocida capacidad para mejorar el comportamiento animal.
- Contiene niveles relativamente altos de taninos condensados que le otorgan ventajas adicionales importantes.
- Muestra habilidad especial para propagarse vegetativamente.
- Densidad de siembra pura: 2-3 kg/ha.
- Cultivares disponibles en el país: cv. Grasslands Maku (tetraploide), cv. Grasslands Sunrise (diploide).

Las plantas del cultivar Grasslands Maku poseen un sistema complejo de tallos y raíces. A partir de una corona surge una raíz principal o pivotante y una densa red de rizomas que se extiende horizontalmente por debajo de la superficie del suelo.

También existe crecimiento horizontal sobre la superficie por parte de estolones y los tallos aéreos crecen desde los nudos de los rizomas o a partir de la corona y se pueden presentar como erectos o postrados según la densidad y altura del tapiz acompañante. El entramado que origina este sistema otorga a la especie buena habilidad colonizadora del tapiz y estabilizadora de suelos (Carámbula et al., 1994).

Si bien lotus Grasslands Maku puede utilizarse en distintos tipos de suelo, se adapta muy bien a suelos ácidos y/o húmedos. Soporta inundaciones durante los meses de invierno y es capaz de producir satisfactoriamente con pH entre 4 y 5.5, estando el rango óptimo para su nodulación entre 5 y 5.5 (Langer, 1973). Esta especie es capaz de fijar nitrógeno a tasas similares a las del trébol blanco, e incluso superarlas, si ambas son

sometidas a condiciones de baja fertilidad, elevada acidez y/o alta concentración de aluminio. El rizobio utilizado como inoculante es tolerante a la acidez del suelo y muy específico, por lo que resulta esencial realizar una correcta inoculación para lograr una buena implantación de esta leguminosa (Carámbula et al., 1994).

Lotus Grasslands Maku es más eficiente que el trébol blanco para utilizar el fósforo disponible del suelo, pero de todas formas requiere de fertilización fosfatada, aunque sea en bajas dosis, para facilitar su nodulación, implantación y persistencia productiva (Carámbula et al., 1994). Es así que Ferrés et al. (2003) en un mejoramiento de campo de segundo año, encontraron incrementos de 38.9 kg/ha de materia seca de lotus Maku por cada kg de P_2O_5 /ha agregado.

La tolerancia a la sequía de *L. uliginosus* Grasslands Maku es inferior a la de *L. corniculatus*, el más tolerante de los lotus perennes al déficit hídrico. Sin embargo el lotus Maku presenta una buena capacidad de recuperación luego de ocurrido el estrés (Carámbula et al., 1994), relacionada a la presencia de rizomas, como se verá más adelante.

Otra característica del lotus Maku es poseer semilla pequeña y ser de lento establecimiento. Este cultivar tiene una importante respuesta a la disminución de la competencia del tapiz natural al momento de la siembra (Ayala et al., 2001). Además la germinación es más lenta que otras leguminosas, por lo que la siembra debe realizarse temprano en el otoño (Lancashire et al., 1980). Para lograr un buen establecimiento se deben utilizar altas densidades de siembra a efectos de obtener altas densidades de plántulas, y en ese año se debe utilizar la pastura con pastoreos leves y no frecuentes (Arrillaga y Coduri, 1997).

La colonización se da principalmente por la emisión horizontal de rizomas y estolones y en segundo lugar puede cobrar mayor importancia en determinadas situaciones la producción de semilla (Carámbula et al., 1994). Los rizomas y estolones constituyen el mecanismo básico de persistencia de la especie, por lo tanto se debe prestar atención a la etapa de implantación, hasta que se logre una buena fijación de nitrógeno y buen desarrollo de la raíz pivotante. Esto ocurriría aproximadamente transcurrido un año y medio a dos luego de la siembra (Carámbula, 2001).

L. uliginosus presenta una producción anual de forraje mayor que *L. corniculatus* (Carámbula et al., 1994), con una importante contribución invernal (Formoso et al., 2001). En cuanto a la distribución estacional del forraje, Arrillaga y Coduri (1997), en una evaluación realizada durante 3 años, encontraron un pico máximo en primavera, otro de menor magnitud en otoño y baja producción en verano e invierno.

Cuando se maneja con defoliaciones controladas, éstas no solo son muy favorables para los rendimientos en materia seca y su distribución estacional, sino que presentan

producciones crecientes a medida que aumenta la edad del mejoramiento (Carámbula, 2001).

En este sentido, Castaño y Menéndez (1998), en un experimento en el cual compararon siete accesiones distintas de *Lotus uliginosus* diploides en comparación con Grasslands Maku, determinaron rendimientos superiores a 4.000 kg MS /ha en el año de siembra, y hasta más de 6.000 kg MS/ha en el tercer año.

En cuanto al manejo del pastoreo, se debe tener presente que *L. uliginosus* posee un lento rebrote. Esto se debe a que la mayor proporción de rebrotes corresponde a tallos aéreos que crecen desde las yemas de la corona y de los nudos de los rizomas. Estas estructuras tardan más en crecer y formar hojas que los tallos que crecen en las yemas presentes en tallos del rastrojo (Carámbula, 2001).

De esta manera, la velocidad de rebrote dependerá de las condiciones en las que se encuentre la población de tallos del material remanente. La clave del manejo para lograr un rebrote bastante inmediato es mantener las plantas con un buen nivel de reservas. Carámbula et al. (1994) sugieren pastoreos rotativos o aliviados e intensos alternados a modo de lograr un equilibrio entre la utilización eficiente de la masa de forraje producida y la búsqueda de un rebrote rápido para recuperarla.

2.3 EL ESTRÉS EN LAS PLANTAS

Las plantas están sometidas frecuentemente a situaciones ambientales desfavorables generadoras de estrés que pueden ocasionar perturbaciones en el crecimiento y desarrollo de las mismas (Díaz, 2005a).

Levitt (1980), define el estrés ambiental como un cambio en las condiciones del medio que reduce el crecimiento. El estrés medioambiental provoca en las plantas respuestas complejas y constituye un problema fundamental para la agricultura, ya que influyen sobre la supervivencia y la productividad de los cultivos.

El estrés puede ser biótico, impuesto por organismos tales como virus, bacterias y hongos, o abiótico debido a un exceso o déficit en algún componente del ambiente. El exceso de agua, la sequía, la salinidad excesiva del suelo, las temperaturas extremas, los nutrientes minerales inadecuados o insuficientes en el suelo, y altos o bajos grados de radiación lumínica se encuentran entre las condiciones ambientales que generan este tipo de estrés y causan daño (Bray et al., 2000).

La duración y severidad a la cual se impone el estrés, determina la respuesta de la planta. De esta forma, las respuestas que generan las plantas en situaciones de estrés dependen si la imposición es lenta o rápida, de la duración y del estado de desarrollo en que se encuentre (Bray et al., 2000).

El conocimiento de las estrategias que las diferentes especies poseen para sobrevivir bajo condiciones de estrés, es una herramienta importante para mejorar, seleccionar e introducir nuevas especies de plantas en diferentes ambientes con el fin de obtener mejores rendimientos (Borsani et al., 1999).

2.4 ESTRÉS HÍDRICO

A medida que la cantidad de agua disponible en un suelo para las plantas se reduce, se afecta el estado hídrico interno de las mismas, lo que provoca modificaciones en los procesos metabólicos dando lugar a lo que se denomina estrés hídrico. Estas modificaciones afectan distintos procesos relacionados con el crecimiento de la planta y el grado de la alteración está relacionado, como se dijo, con la intensidad y duración del estrés, y la sensibilidad relativa presentada por la especie o variedad en cuestión.

El déficit hídrico, uno de los factores de estrés ambiental más generalizado, tiene lugar cuando la tasa de transpiración de la parte aérea excede a la de absorción de agua por el sistema radicular (Bray, 1997).

El régimen de precipitaciones establecido en el Uruguay, determina que durante los meses de verano las plantas se enfrenten con baja disponibilidad de agua en el suelo, situación que limita la producción y el buen rendimiento de los cultivos.

El bajo contenido de agua en el suelo durante los meses de verano constituye un problema frecuente que afecta en gran medida la productividad de muchas áreas de pasturas (Borsani et al., 1999). En días calurosos y soleados puede ocurrir que las plantas presenten déficit hídrico, debido a que la velocidad de transpiración es mayor que la de absorción de agua. Esta situación genera un déficit hídrico que se conoce como sequía no aparente. Por otro lado, las sequías a largo plazo son provocadas por una disminución en la disponibilidad de agua en el suelo (Díaz, 2005a).

La sequía, las elevadas concentraciones salinas y las temperaturas extremas son causantes frecuentes de déficit hídrico en las plantas. Estas situaciones llevan a un incremento en la concentración de solutos, a cambios en el volumen y la forma celular por alteración del potencial hídrico; así como pérdida de la integridad de la membrana celular y desnaturalización de proteínas, entre otras consecuencias (Bray, 2002).

2.4.1 Resistencia a la sequía

La resistencia a la sequía es la capacidad que tienen las plantas de sobrellevar el estrés hídrico, para lo que cuentan con diferentes formas de protección. Algunas de ellas corresponden a adaptaciones a nivel de órganos particulares como hojas, o modificaciones en el sistema radical, y otras a nivel celular como el ajuste osmótico y la

tolerancia a la desecación (Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 1993). Si bien las adaptaciones morfológicas no son comunes entre distintas especies de plantas, las respuestas celulares básicas sí parecen serlo, y algunas de ellas serían comunes a nivel de diferentes grupos vegetales (Zhu et al., 1997).

A diferencia de la resistencia frente a factores bióticos, la resistencia a la sequía y a otros factores abióticos, pese a ser claramente genética, no es consecuencia de la acción de un gen específico (Zhu et al., 1997). La capacidad de las plantas de soportar el estrés hídrico es una característica multigénica y las rutas bioquímicas responsables de productos o procesos que mejoran la resistencia actúan en general aditivamente, y es posible que también sinérgicamente (Bohnert et al., 1995).

2.4.2 Potencial hídrico

El concepto de potencial hídrico (Ψ) ayuda a comprender los movimientos de agua dentro y fuera de la planta: el agua se mueve desde una región de mayor a otra de menor Ψ . De esta forma, el Ψ de la raíz es mayor que en el tallo, y disminuye progresivamente hacia las hojas, que a su vez tendrán un Ψ mayor que el de la atmósfera, lo que favorece la transpiración (Sánchez – Díaz y Aguirreolea, 1993).

A medida que el suelo se seca, su potencial hídrico se hace más negativo, por lo que las plantas deben disminuir su potencial hídrico con el fin de mantener el gradiente necesario para la absorción de agua. Esto puede ocurrir de dos maneras: por disminución del potencial osmótico mediante acumulación de solutos, o por reducción de la turgencia por deshidratación. En los suelos sometidos a sequía, el mecanismo más importante es la disminución del potencial osmótico, mediado por una estimulación de la acumulación de iones inorgánicos, o por aumento de solutos orgánicos de diferente naturaleza química (Bray, 1993).

Si bien en las distintas especies de plantas se dan variaciones en su sensibilidad y en las respuestas frente a la disminución del Ψ causado por la sequía, todas tienen la información genética necesaria para percibir y responder al estrés hídrico (Bonerth et al., 1995).

2.5 ESTRÉS OSMÓTICO

Uno de los estreses abióticos más importantes para la productividad de los cultivos se relaciona con la deshidratación vegetal bajo condiciones de alta salinidad, sequía y condiciones de bajas temperaturas. Cada uno de estos factores genera estrés osmótico, caracterizado por el incremento en la concentración de solutos en la célula y el descenso en la presión de turgencia por pérdida de agua (Zyalalov, 2004).

Las plantas responden a dicho estrés a nivel morfológico, anatómico, celular y molecular. Adaptaciones morfológicas particulares pueden ser vitales en determinadas especies vegetales, pero no son comunes en las plantas en general. Por el contrario, como se vio, las respuestas celulares al estrés hídrico están conservadas en las plantas. El ajuste osmótico, por ejemplo, es común incluso en organismos unicelulares (Zhang et al., 1999).

El estrés osmótico provocado por el bajo Ψ en el suelo, reduce los rendimientos de una amplia variedad de cultivos en el mundo ya que desencadena el cierre estomático lo que disminuye la acumulación de materia seca de las plantas (Zhu, 2003).

2.5.1 Ajuste osmótico en respuesta al estrés

El ajuste osmótico mantiene el contenido celular de agua cuando se presenta una reducción en el potencial osmótico como consecuencia de la acumulación de solutos orgánicos en el citoplasma y en la vacuola en situaciones de estrés osmótico.

Los solutos compatibles que se acumulan durante el proceso de ajuste osmótico son metabolitos hidrofílicos, entre los que se destacan azúcares (sacarosa y fructosa), aminoácidos (prolina y betaína), glicerol, manitol y otros metabolitos de bajo peso molecular (Díaz, 2005a).

Dichos compuestos no interfieren con el metabolismo normal de las células; se acumulan en el citoplasma y en la vacuola en altas concentraciones bajo situaciones de estrés osmótico, y tienen un papel primario en el mantenimiento de la disminución del potencial osmótico en el citosol. Además se ha visto que están involucrados en la estabilidad de proteínas y estructuras celulares (Zhu, 2003). Estudios *in vitro* han demostrado que las moléculas que funcionan como osmolitos pueden proteger a proteínas de la desnaturalización, y son capaces de estabilizar los fosfolípidos de membrana (Díaz, 2005a).

La acumulación de solutos compatibles en el citoplasma se acompaña de la disminución de otros solutos menos compatibles, como el potasio y el glutamato, que son transportados hacia la vacuola (Bohnert et al. 1995, Samaras et al. 1995).

El incremento de azúcares solubles como respuesta al estrés hídrico se ha observado en una gran variedad de especies de plantas (Ingram y Bartels, 1996) y la acumulación puede resultar de un aumento de la conversión de almidón en azúcares solubles, o de una baja utilización de estos (Irigoyen et al., 1992).

También se ha observado como respuesta al estrés osmótico, inducido por altas concentraciones de NaCl o por falta de agua, la acumulación de moléculas nitrogenadas pequeñas. Entre estas moléculas, las que presentan una amplia distribución en plantas

son prolina, 4-hidroxiprolinbetaína, betaína, glicín-betaína y glicín-prolina (Hare et al., 1998).

La acumulación de prolina es una respuesta a estrés común en diferentes organismos, y es probable que esta estrategia haya permanecido conservada debido a las funciones de esta molécula relacionadas con la protección frente al estrés (Samaras et al., 1995).

El incremento en la osmolaridad celular como resultado de la acumulación de estos compuestos se acompaña de la entrada de agua a las células, o al menos de una reducción en la salida de la misma, lo que permite el mantenimiento de la turgencia necesaria para continuar con la expansión celular, y por ende con el crecimiento.

La osmoregulación le confiere a las plantas la capacidad de tolerar condiciones de escasez de agua y salinidad elevadas, con la expresión de mecanismos adaptativos que evitan la disminución de la fotosíntesis, las alteraciones en la traslocación y la distribución de fotoasimilados y las pérdidas en rendimientos; hechos que tienen trascendencia significativa en el funcionamiento normal de las plantas y en la productividad de los cultivos.

2.6 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es el resultado de condiciones de estrés ambiental que promueven la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO), moléculas que causan daños sobre lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, alterando el metabolismo y promoviendo la muerte celular. El estrés oxidativo se da cuando los procesos generadores de ERO, superan a la capacidad de las defensas antioxidantes (Cadenas, 1985).

Varios factores ambientales son capaces de inducir la generación de ERO, y como consecuencia pueden producir daño oxidativo. Estos factores incluyen contaminantes atmosféricos, herbicidas, daños post-anoxia, congelamiento, temperaturas extremas y sequía (Borsani, 1997). La sequía, asociada a alta intensidad lumínica, favorece la generación de ERO y el desencadenamiento de estrés oxidativo (Kenis et al. 1994, Gorgocena et al. 1995), que acelera los procesos de senescencia.

Cassano et al. (1994), han demostrado que a medida que los órganos de una planta envejecen pierden la capacidad de responder ante el estrés oxidativo, lo que aceleraría su senescencia.

Para sobrevivir al estrés oxidativo, las plantas exhiben dos sistemas de protección antioxidante: el enzimático, conformado por proteínas catalizadoras de las reacciones de desintoxicación de las ERO, y el no enzimático, constituido por una serie de diversos metabolitos que reaccionen directamente con las ERO.

Las defensas antioxidantes enzimáticas incluye enzimas, como las superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT), peroxidasas (PER), y vitaminas como la E, C Y A (Cadenas, 1985). Por otro lado, existe un amplio rango de compuestos que conforman la defensa antioxidante no enzimática como los flavonoides, azúcares, polioles, poliaminas y prolina, que actúan como capturadores de radicales libres.

El incremento de las actividades de enzimas antioxidantes durante el estrés ha sido identificado en muchos organismos y permite suponer que esta respuesta puede involucrar una ventaja adicional ante el estrés (Borsani, 1997). También compuestos que participan en la defensa antioxidante no enzimática, principalmente los azúcares, polioles y prolina, incrementan su concentración en diferentes tejidos como consecuencia del déficit hídrico (Bonhert y Shevelva, 1998).

El mantenimiento de ambos tipos de defensas antioxidantes haría posible que el órgano - tejido vegetal fuera funcional durante mayor tiempo, lo que contribuiría a incrementar la producción de materia seca por planta.

2.7 ACUMULACIÓN DE PROLINA EN LAS PLANTAS

La acumulación de prolina por plantas sometidas a estrés se la ha considerado clave para el mantenimiento del potencial osmótico de la célula (Chiang y Dandekar, 1995). Sin embargo, el potencial osmótico teórico que generarían las concentraciones de prolina encontradas en folíolos de *L. corniculatus* no serían suficientes para preservar el estado hídrico de la célula (Díaz, 2005a).

En tejidos de plantas que se encuentran en condiciones de estrés osmótico, se da una acumulación activa de solutos, interpretada como una respuesta para la sobrevivencia (Attipalli et al., 2004). Uno de los solutos que más se acumula es la prolina, cuya función ha sido asociada al mantenimiento de la turgencia de los tejidos (Ramanjulu y Sudhakar, 2000). Se ha sugerido que la prolina, en hojas estresadas por sequía, actúa como agente osmótico protegiendo a la planta contra la desecación (Harsh, 2003). También se la relaciona con la reserva de nitrógeno que sería utilizado durante la rehidratación y la defensa antioxidante no enzimática (Díaz, 2005a).

A la prolina se le considera uno de los osmoprotectores relacionados con la tolerancia de las plantas a condiciones de sequía y salinidad (McCue y Hanson, 1990), y su síntesis en estas condiciones parece provenir de los carbohidratos, por vía del glutamato.

Las evidencias con que se cuenta parecen indicar que el aumento en la síntesis de prolina en condiciones de estrés se debe a la inducción y activación de enzimas implicadas en su biosíntesis, y disminución de su oxidación mediante un mecanismo de retroinhibición (Samaras et al., 1995). Por otra parte, se han identificado transportadores

de prolina que se expresan en condiciones de estrés osmótico (Rentsch et al. 1996, Schwacke et al. 1999) que también pueden contribuir a su acumulación.

En un tejido turgente la oxidación de prolina es muy rápida, mientras que, bajo condiciones de déficit hídrico se inhibe la oxidación de prolina, lo que contribuye a mantener niveles altos de prolina. Su acumulación bajo el estrés hídrico se incrementa entre 10 y 100 veces a la concentración en la que se encuentra cuando la célula está turgente. En lotus en condiciones de estrés hídrico de imposición rápida, la concentración aumenta 15 veces, mientras que en condiciones de estrés lento la concentración de prolina se incrementa 20 veces. Se cuenta con evidencias experimentales que indican que la acumulación de prolina se debe a su síntesis de novo (Díaz et al., 2005b).

La capacidad de acumular y utilizar prolina se relaciona en algunos casos con genotipos tolerantes a sequía (Al-Sulaiti et al., 1990). Sin embargo, aún no existen evidencias directas que demuestren que una planta que acumula más prolina sea más tolerante al estrés hídrico (Samaras et al., 1995). Por otro lado, la aplicación de prolina exógena a plantas de arroz reduce el efecto inhibitorio que ejerce sobre el crecimiento el exceso de NaCl o la falta de agua (Kavi Kishor, 1989).

2.7.1 Metabolismo de la prolina

En las plantas superiores la síntesis de prolina es semejante a la de bacterias. En plantas, estudios in vivo en los que se usaron moléculas marcadas, sugieren que el glutamato es el precursor principal en la síntesis de prolina estimulada por estrés osmótico, y que el estrés osmótico lleva a un aumento en la velocidad de su biosíntesis (Rhodes et al. 1986, Samaras et al. 1995).

La acumulación de prolina en respuesta al estrés es conocida desde hace tiempo pero es relativamente reciente la información acerca de la inducción de genes específicos así como de la variación de la actividad de ciertas enzimas relacionadas al metabolismo de la prolina en respuesta al estrés osmótico (Kiyouse et al., 1996).

En la vía de síntesis de prolina a partir de glutamato (figura 1), éste es reducido por la enzima P5C sintetasa a glutamato semialdehído (GSA), que se cicla espontáneamente formando P5C, que es reducido a prolina por la enzima P5C reductasa (Díaz, 2005a).

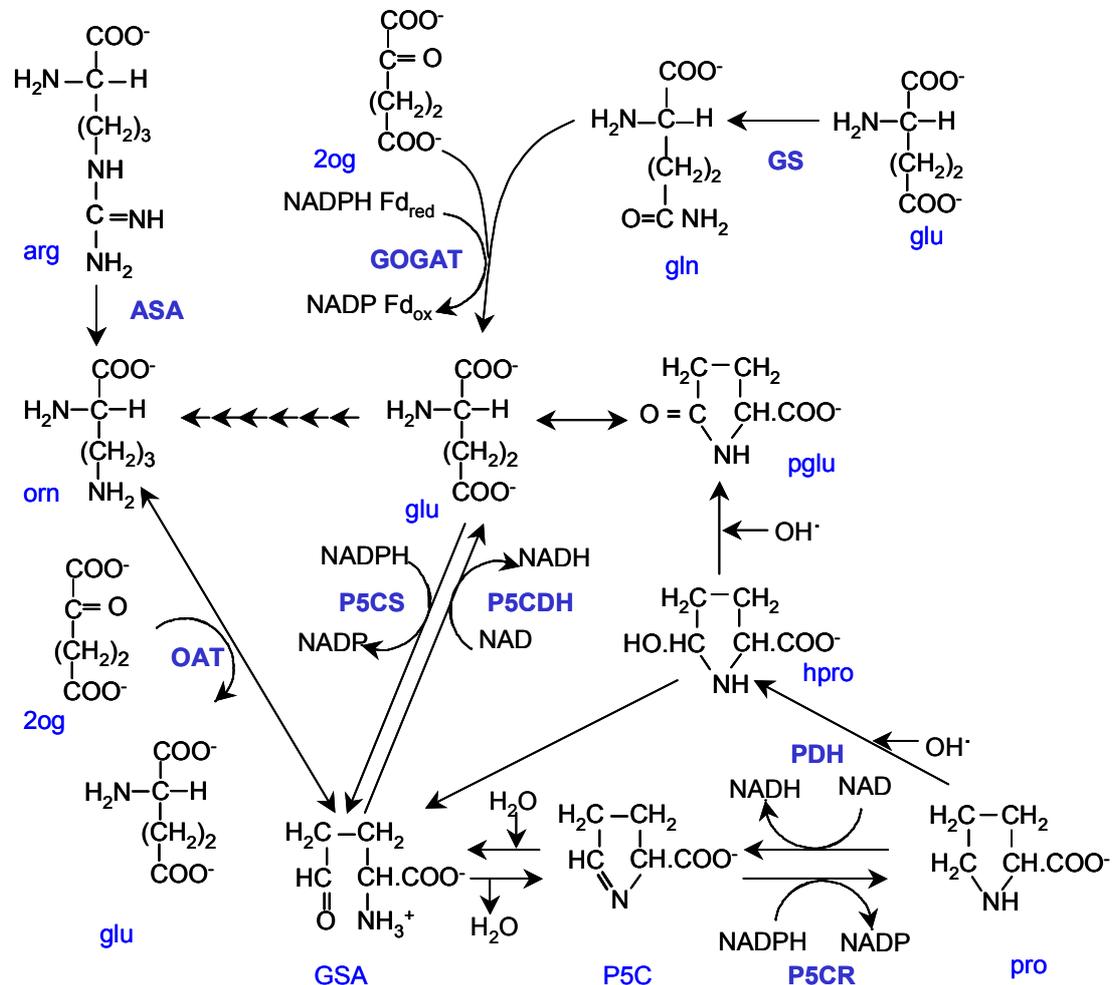


Figura 1. Vía de síntesis y oxidación de la prolina. Se incluyen los mecanismos de reacción no enzimática con $\text{OH}\cdot$. (Fuente: tomado de Díaz et al., 1999).

La prolina también puede ser sintetizada a partir de un aminoácido no proteico, la ornitina, a través de una vía poco conocida en plantas (Verslues y Sharp, 1999). La ornitina es transformada por acción de la ornitina en GSA que se cicla espontáneamente formando P5C (figura 1).

Otro factor que controla los niveles de prolina es su catabolismo, proceso menos conocido que el de síntesis. La vía de degradación se inicia con la formación de P5C, reacción catalizada por la enzima prolina oxidasa y/o prolina deshidrogenada (Borsani, 1997). La oxidación de prolina a glutamato se inhibe en situaciones de estrés hídrico, pero se activa una vez que las plantas son hidratadas (Kiyosue et al., 1996). La

utilización de esta molécula una vez restablecido el potencial hídrico se ha asociado a su utilización como fuente de carbono y nitrógeno luego de restablecido el potencial hídrico (Rayapati y Stewart, 1991).

Toda la información que hasta el momento se ha obtenido sobre el metabolismo de la prolina durante el estrés osmótico demuestra que esta molécula incrementa su concentración como una respuesta regulada y dirigida para tolerar el estrés (Borsani, 1997)

2.7.2 Prolina como defensa antioxidante no enzimática

La prolina es un eficiente capturador del radical $\cdot\text{OH}$ y del $^1\text{O}_2$. El hecho que las concentraciones de prolina en el citoplasma en condiciones de estrés osmótico lleguen a 200 mM contribuye a apoyar la hipótesis sobre el rol de esta molécula en la defensa antioxidante no enzimática. El radical OH , altamente reactivo, puede reaccionar con la prolina y evitar así el daño de proteínas y fosfolípidos (Díaz, 2005a).

2.8 EMISIÓN DE FLUORESCENCIA DEL PSII COMO PARÁMETRO PARA EVALUAR LA RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO

La medición de la fluorescencia emitida por hojas de plantas intactas es una técnica útil cuando se quiere obtener información cualitativa y cuantitativa sobre la fotosíntesis y evaluar el estado fisiológico de la planta (Krause y Weis, 1991). Como la emisión de fluorescencia de la clorofila de las hojas está determinada por el estado fisiológico de la planta, se utiliza como un indicador de tolerancia de las plantas al estrés.

La energía lumínica absorbida por la molécula de clorofila puede tener tres destinos: ser usada para la fotosíntesis, disipada como calor o reemitida como luz, evento conocido como fluorescencia de las clorofilas (Maxwell y Johnson, 2000). Si bien la emisión de fluorescencia por el PS II es una vía minoritaria como forma de disipar energía, compite con las otras vías de disipación energética más importantes cuantitativamente. Por tanto, cambios en la fotoquímica o en las dos rutas no fotoquímicas (transferencia energética y emisión de calor) provocan cambios en el rendimiento de fluorescencia de las clorofilas del PS II.

En los experimentos de fluorescencia, se pueden inducir dos estados del aparato fotosintético: a) el estado adaptado a la oscuridad (DAS por dark-adapted state), que se alcanza cuando todos los procesos de transporte electrónico en los tilacoides se encuentran detenidos; y b) el estado adaptado a la luz (LAS por light-adapted state), estado estacionario de la fotosíntesis, que se alcanza cuando los procesos fotosintéticos estén activos y balanceados, luego de una irradiación suficientemente prolongada de luz actínica, resultando en la síntesis de NADPH y ATP (Glison, 2008).

Al transferir la hoja de la oscuridad a la luz, ocurre un incremento en la fluorescencia. Esto es conocido como “Efecto Kausky” (Kausky et al., 1960). Luego, a medida que transcurre el tiempo, la fluorescencia describe una cinética característica, conocida como cinética de la fluorescencia de las clorofilas (figura 2).

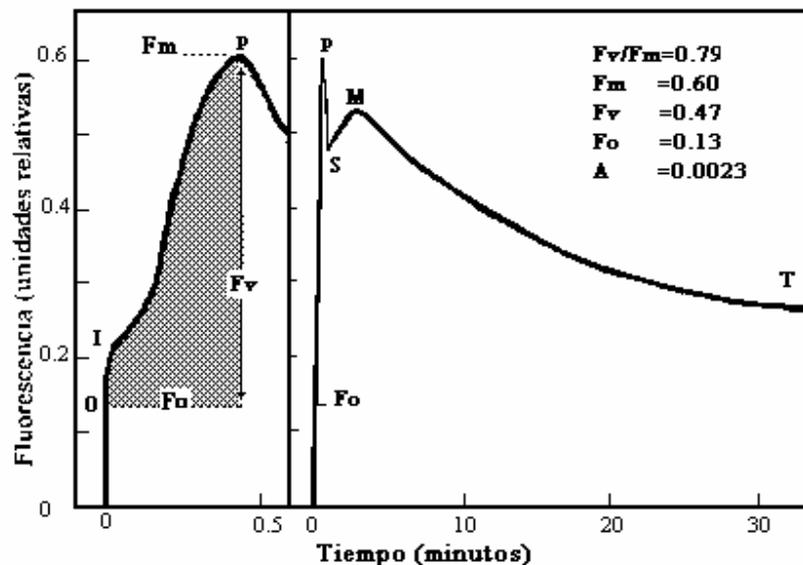


Figura 2: Efecto Kautsky, emisión de fluorescencia desde una hoja adaptada a la oscuridad. F_o : fluorescencia mínima, F_m : fluorescencia máxima, F_v : fluorescencia variable (Fuente: tomado de Kautsky et al., 1960).

Las curvas de fluorescencia emitidas por hojas previamente adaptadas a la oscuridad, muestran que la emisión de fluorescencia varía en función del tiempo de manera bastante compleja (figura 2). En el momento de la iluminación, la fluorescencia aumenta casi instantáneamente hasta un nivel inicial (llamado F_o) luego aumenta rápidamente hasta un nivel máximo (F_m). Finalmente la emisión de fluorescencia disminuye lentamente hasta un estado estacionario (T) después de haber pasado por un segundo máximo (M). Estos cambios transitorios de la intensidad de la fluorescencia observados durante la transición oscuridad/luz son función de la activación de una serie de procesos fotosintéticos.

El “rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica del PSII” o relación F_v/F_m , se considera un parámetro importante y fácilmente medible del estado fisiológico del aparato fotosintético en hojas de plantas intactas (Krause y Weis, 1991). Su valor máximo es prácticamente constante para varias especies de plantas si se los mide bajo condiciones controladas, y es igual a $0,832 \pm 0,004$ (Glison, 2008) y en plantas

estresadas o dañadas, F_V/F_M se reduce. Por esto, este parámetro puede servir como un indicador de fotoinhibición u otra clase de daño del PSII.

2.9 EFICIENCIA DEL USO DEL AGUA O EFICIENCIA TRANPIRATORIA

La eficiencia en el uso del agua (EUA) relaciona la capacidad de la planta de acumular materia seca por agua evapotranspirada. De esta forma, las plantas con mayor eficiencia transpiratoria tienen un uso más eficiente del agua.

Una forma de medir la eficiencia transpiratoria es a través del análisis de espectrometría de masas de la relación de abundancia molar relativa de ^{13}C y ^{12}C en hojas adultas. La discriminación isotópica del ^{13}C (Δ) proporciona una medida indirecta de la eficiencia transpiratoria y puede ser utilizada como criterio de selección en programas de fitomejoramiento (Farquhar, 1991).

El CO_2 atmosférico contiene isótopos estables de carbono que existen naturalmente ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C en las proporciones 98.9%, 1.1% y 10% respectivamente. Las propiedades químicas del $^{13}\text{CO}_2$ son idénticas a las del $^{12}\text{CO}_2$, pero debido a una leve diferencia en la masa (2.3%) la mayoría de las plantas asimilan menos $^{13}\text{CO}_2$ que $^{12}\text{CO}_2$. En otras palabras las plantas, concretamente la enzima Rubisco, discrimina en contra del isótopo pesado, y por eso hay menor relación de ^{13}C respecto a ^{12}C .

Se ha constatado que cuando los estomas están abiertos presentan una mayor discriminación isotópica en contra del ^{13}C que cuando existe una limitación difusiva frente a la asimilación de CO_2 por cierre estomático (Berriél, 2005).

Entre los cambios fisiológicos que se producen en una planta estresada por sequía, se destaca el cierre estomático que evita la pérdida de agua por transpiración. El cierre estomático evita en buena medida, las consecuencias negativas derivadas del estrés hídrico. Por lo tanto, como el déficit hídrico origina el cierre estomático, existe un aumento en la eficiencia transpiratoria y se encontrará una mayor abundancia de ^{13}C en las hojas, es decir que habrá una menor discriminación del isótopo pesado del carbono (Robinson et al., 2000).

La técnica de discriminación isotópica del carbono se basa entonces en una propiedad de la primera enzima que participa en la fijación de CO_2 en especies C_3 . La Rubisco, discrimina fuertemente en contra del isótopo pesado del CO_2 ($^{13}\text{CO}_2$) comparado con el isótopo más abundante: el $^{12}\text{CO}_2$ y experimentalmente se ha encontrado una relación lineal y negativa entre Δ y eficiencia transpiratoria (Berriél, 2005).

Utilizando la discriminación isotópica de carbono para estimar la EUA en plantas C_3 , se ha demostrado que la EUA y el potencial hídrico estaban negativamente relacionados;

es decir, aumentos en la EUA están asociados con aumentos de estrés hídrico (potencial hídrico mas negativo).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Como material vegetal se usó *Lotus corniculatus* cv San Gabriel y *Lotus uliginosus* cv Grasslands Maku, suministrado por la Ing. Agr. Mónica Rebuffo, INIA La Estanzuela, Colonia.

3.2. CULTIVO DE PLANTAS

3.2.1 Esterilización y germinación de semillas

Las semillas fueron esterilizadas superficialmente sumergiéndolas en etanol 96° GL durante 1 min, se eliminó el alcohol con un lavado con agua destilada estéril y luego permanecieron 2 min en NaClO comercial. Seguidamente se lavaron tres veces con H₂O estéril. Para eliminar una mayor cantidad de taninos de la cubierta de las semillas y mejorar la germinación y el desarrollo de las plántulas, una vez esterilizadas, las semillas se dejaron en H₂O estéril durante 3 h antes de ser transferidas a placas de Petri que contenían agar-agua 1.5% (p/v) estéril.

La germinación se realizó a temperatura ambiente hasta un largo de radícula de 2-5 mm (1-2 días) y las plántulas se sembraron a razón de diez por maceta de 12 x 10 cm. Se utilizó como sustrato una mezcla arena-vermiculita (1:1). A las tres semanas de haberse realizado la siembra, las macetas se ralearon para dejar siete plantas en cada una.

3.2.2. Condiciones de cultivo y cosecha

Las plantas se cultivaron durante 30 días en cámara de crecimiento bajo las siguientes condiciones: 250 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica (lámparas de halogenuro metálico frío de 5000 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), fotoperíodo de 16/8 h (luz/oscuridad), 22°C de temperatura y 50% de humedad relativa.

Para el riego de las plantas se utilizó solución nutritiva Hornum (Handberg y Stougaard, 1992) modificada que contenía, en mM: MgSO₄·7H₂O, 1.2; CaCl₂·2H₂O, 1.4; NaH₂PO₄·2H₂O, 0.7; KNO₃, 8,0; y en μM : Fe-NaEDTA, 54.0; H₃BO₃, 19.4; MnSO₄·4H₂O, 5.4; CuSO₄·5H₂O, 1.6; ZnSO₄·7H₂O, 1.4; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.3.

Para establecer el estrés hídrico, impuesto a los 30 días de crecimiento, se interrumpió el riego durante 7 días y se realizó la cosecha de folíolos, que se maceraron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C.

3.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

3.3.1. Prolina y pigmentos fotosintéticos

La extracción de prolina de las hojas se realizó según Charest y Phan (1990), según el siguiente procedimiento:

- Se maceraron 0.2 g de muestra en 2 mL de una mezcla de metanol-cloroformo-agua (MCA) 12:5:1.
- El homogenado se centrifugó a 5000 g durante 2 min a temperatura ambiente.
- Se recogió el sobrenadante, y al precipitado se le adicionaron 2 mL de MCA.
- Se agitó durante 1 min, se centrifugó nuevamente a 5000 g durante 2 min y el sobrenadante se juntó con el sobrenadante anterior.
- Seguidamente se adicionó 1 mL de cloroformo, 1.5 mL de agua y se centrifugó a 5000 g por 1 min. La fase superior (acuosa) se utilizó para la determinación de prolina y la fase inferior (clorofórmica) para la determinación de pigmentos fotosintéticos.

3.3.2. Peroxidación de lípidos de membrana

La peroxidación de lípidos se estimó según Iturbe-Ormaetxe et al. (1998) a través de la medida del contenido de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Los peróxidos de lípidos se extrajeron a partir del siguiente procedimiento:

- Se homogenizaron 0.5 g de tejido con 2.5 mL de tampón fosfato de sodio 0.2 M pH 7,6, Triton X-100 1 % (v/v) y 1 % butilhidroxitolueno (BHT) (p/v).
- El homogenado se centrifugó a 13000 g durante 20 min a 4° C.
- Posteriormente 150 µL de sobrenadante se mezclaron con 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % (p/v) y se hirvieron durante 20 min.
- La mezcla se centrifugó a 13000 g durante 2 min y el sobrenadante se mezcló en vortex con 150 µL de SDS 3% (p/v), 250 µL de ácido 2-tiobarbitúrico 3 % (p/v) y 250 µL de HCl 25% (v/v).
- La mezcla se calentó a 80° C durante 20 min y se enfrió en hielo. Los peróxidos de lípidos se expresaron como nmol de malonaldehído formado $\epsilon 532 = 156 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.4.1. Cuantificación de prolina

La prolina se cuantificó según Troll y Lindsley (1955):

- A la fase acuosa que contenía la prolina (ítem 3.3.1.) se le agregaron 4 mL de ácido acético y 4 mL de reactivo de ninhidrina ácida consistente en H_3PO_4 6 M; ácido acético 12.6 M y ninhidrina 0.14 M.
- Se usaron tubos con tapón de rosca que se calentaron en baño de agua a $90^\circ C$ durante 1 h y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.
- A cada tubo se le adicionó 4 mL de tolueno, se agitó vigorosamente durante 5 min y se dejó decantar hasta la formación de dos fases (aproximadamente 12 h).
- Para cuantificar la prolina se tomaron muestras de la fase superior y se leyó la absorbancia a 515 nm. Como estándar se usó L-prolina.

3.4.2. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos se determinaron según Wellburn (1994), en la fase clorofórmica (ítem 3.3.1). Muestras de 1 mL, diluidas en cloroformo hasta una concentración adecuada, se leyeron a 665.6 nm (clorofila a), 647.6 nm (clorofila b) y 480.0 nm (carotenos). Para calcular la concentración de los pigmentos se aplicaron las siguientes fórmulas, y posteriormente se corrigieron por el factor de dilución utilizado.

$$\begin{aligned} \text{Clorofila a (ca)} &= 11.47 \times (\text{Abs } 665.6) - 2 \times (\text{Abs } 647.6) \\ \text{Clorofila b (cb)} &= 21.85 \times (\text{Abs } 647.6) - 4.53 \times (\text{Abs } 665.6) \\ \text{Carotenos} &= (1000 \times (\text{Abs } 480.0) - (1.33 \times \text{ca}) - (23.93 \times \text{cb})) / 202 \end{aligned}$$

3.4.3. Contenido relativo de agua

El contenido relativo de agua (CRA) se determinó según Antolín et al. (1995). Se pesó 0.1 g de peso fresco de hojas (PF) que se colocaron en placas de Petri con agua destilada a temperatura ambiente durante 12 h, y se volvió a pesar considerando esta medida como peso turgente (PT). Posteriormente las muestras se secaron en estufa a $80^\circ C$ hasta peso constante y se determinó el peso seco (PS). El CRA se calculó a partir de la fórmula:

$$\text{CRA (\%)} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PT} - \text{PS}) \times 100$$

3.4.4 Eficiencia transpiratoria mediante discriminación isotópica del ^{13}C

Las plantas fueron cosechadas e inmediatamente secadas en estufa a 60°C hasta peso constante, y el material vegetal seco fue molido en mortero de ágata hasta lograr un polvo fino. Antes de pesar las muestras se las volvió a secar, para eliminar la humedad absorbida y se realizaron pesadas de 1.5 mg de material vegetal que se colocaron en cápsulas de estaño. Estas cápsulas fueron introducidas en un analizador elemental (Flash EA, 1112 series) acoplado a un espectrómetro de masa de relaciones isotópicas (Termo Finnigan Delta Plus). La fuente del espectrómetro de masa se mantuvo a una presión de 1×10^{-6} mbar (en modo continuous flow) y un voltaje de 3 kV. La columna del cromatógrafo de gases del analizador elemental de 6.4 mm de diámetro y 2 m de largo, con Poropack-Q, se mantuvo a 60°C con helio como carrier con flujo de 90 mL / min. Tubos de acero inoxidable de 2 mm de diámetro condujeron los efluentes de la columna cromatográfica del analizador elemental a la interfase CONFLO III (en modo open split), los que entraron a través de un tubo de vidrio de 6 mm. Por un tubo de 2 mm de diámetro, interno al de 6 mm, se introdujo una segunda fuente de He y varios gases de calibración se introdujeron en la corriente del carrier. Los gases de calibración, o los efluentes del analizador elemental pasaron a un tubo capilar de 0.32 mm de diámetro, el cual estaba unido a la fuente del espectrómetro de masa. Durante el análisis se utilizaron gases de calibración, y atropina como material de referencia. Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ fueron obtenidos a través de la comparación de las abundancias $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de las muestras contra el estándar Pee Dee Belemnite (PDB) según la fórmula:

$$\delta (\%) = \frac{(R \text{ muestra} - R \text{ estándar}) * 1000}{R \text{ estándar}}$$

R corresponde a la relación de abundancias entre $^{45}\text{CO}_2/^{46}\text{CO}_2$.

Para obtener los valores de discriminación (Δ) se utilizó la ecuación de (Farquhar et al., 1982):

$$\Delta = \frac{\delta^{13}\text{C}_p - \delta^{13}\text{C}_a}{1 + \delta^{13}\text{C}_p / 1000}$$

$^{13}\text{C}_p$ corresponde a la relación isotópica del carbono de la planta, y $^{13}\text{C}_a$ es la relación isotópica del CO_2 en la atmósfera. Se tomó último valor como -0.008 ó -8% .

El análisis lo realizó la Lic. Verónica Berriel (MSc), en el Laboratorio de Isótopos Estables de Facultad de Agronomía.

3.4.5 Determinación de parámetros de fluorescencia del PS II

La adaptación a oscuridad se realizó durante 20 min mediante la colocación de una pinza que permite la exclusión de la luz en la superficie de la hoja. La fluorescencia de la clorofila fue medida usando un espectrómetro de fluorescencia portátil (Hansatech Instruments) equipado con diodo emisor de luz, un detector de fluorescencia y un registrador. La fluorescencia mínima (F_o) fue medida durante un flash de luz modulada de $440 \mu\text{moles/m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ durante 60 ms. Para las medidas de fluorescencia máxima (F_m) se aplicó un flash de luz actínica de $900 \mu\text{moles/m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ durante 1 min. La fluorescencia variable (F_v) fue calculada como la diferencia entre F_m y F_o . Se calculó la relación F_v/F_m que estima el rendimiento cuántico máximo del PS II. La relación F_v/F_o estima el rendimiento primario máximo fotoquímico del PS II y provee una estimación de la capacidad fotosintética.

3.4.6 Pérdida de agua de las hojas

Para establecer la magnitud de la pérdida de agua a través de los estomas en ambas especies, se arrancaron hojas de plantas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* que permanecieron en cámaras de crecimiento con 45% y 90% de HR el día en que se realizó el ensayo. Este consistió en arrancar las hojas después de 4h de encendida la luz y establecidas las HR y pesarlas a cada hora, durante 3 h en las que permanecieron a humedad relativa ambiente de 45%. Una vez sometidas a humedad relativa ambiente, se procedió a registrar el peso fresco inicial en forma individual. Luego, se continuó registrando el peso fresco de las hojas transcurrido un intervalo de tiempo del último registro, lo que se tradujo como pérdida de agua.

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental consistió en las dos especies de Lotus, tratamiento con riego (control) y sin riego para los tiempos 5 y 7 (días de supresión de riego), totalizando 6 tratamientos. Cada tratamiento tenía 5 repeticiones, a razón de 5 macetas por tratamiento. De cada maceta se utilizaron folíolos para la determinación de la fluorescencia y pérdida de agua. El resto de los folíolos se maceraron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su utilización en las determinaciones de prolina, pigmentos fotosintéticos, TBARs etc. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza y las medias se contrastaron con el test de Duncan.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 CONTENIDO RELATIVO DE AGUA

El estrés por sequía ocurre, bien cuando se reduce el agua disponible del suelo y las condiciones atmosféricas ocasionan una pérdida continua de agua por transpiración y evaporación, o cuando la tasa de evapotranspiración supera a la de absorción de agua. Así, la sequía ejerce efectos sobre el crecimiento, el rendimiento y la calidad de las plantas. El primer efecto es la pérdida de turgencia, la que afecta la elongación del tallo, la expansión foliar, la apertura estomática y finalmente una disminución en la tasa de crecimiento (Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 1993).

Un parámetro que permite determinar el estado hídrico de una planta es el CRA, que estima la cantidad de agua que los tejidos tienen almacenada, en relación con la máxima cantidad que pueden almacenar.

El estrés hídrico inducido mediante la supresión de riego a plantas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* que se cultivaron sin limitación de agua durante 35 días, produjo un descenso del CRA después de suspendido el riego de 85% a 45% y 35% a los 5 y 7 días respectivamente. El CRA de los folíolos de ambas especies no presentó diferencias significativas en los tiempos ensayados, pero sí respecto al tiempo 0 (figura 3).

Borsani (1997), encontró que las plantas de *L. corniculatus* sometidas a estrés rápido, los folíolos presentaban una disminución del CRA de 90% a 70%. La forma usada para imponer ese estrés fue diferente a la definida para esta tesis, en la que se usó una forma menos drástica de imposición, lo que conlleva a una mayor respuesta adaptativa, dado que permite la puesta en marcha de diferentes mecanismos bioquímicos y fisiológicos para el ajuste a esa situación.

El CRA ha sido considerado como un indicador de la tolerancia a la desecación en cultivos como soja y trigo (Shonfeld et al., 1988). Carter (1989), considera que este parámetro es una integración de los componentes aéreos y subterráneos que le confieren a la planta la capacidad de tolerar el déficit hídrico. En este sentido Schonfeld et al. (1988) han logrado confirmar una relación directa entre el CRA y la tolerancia a la sequía en trigo.

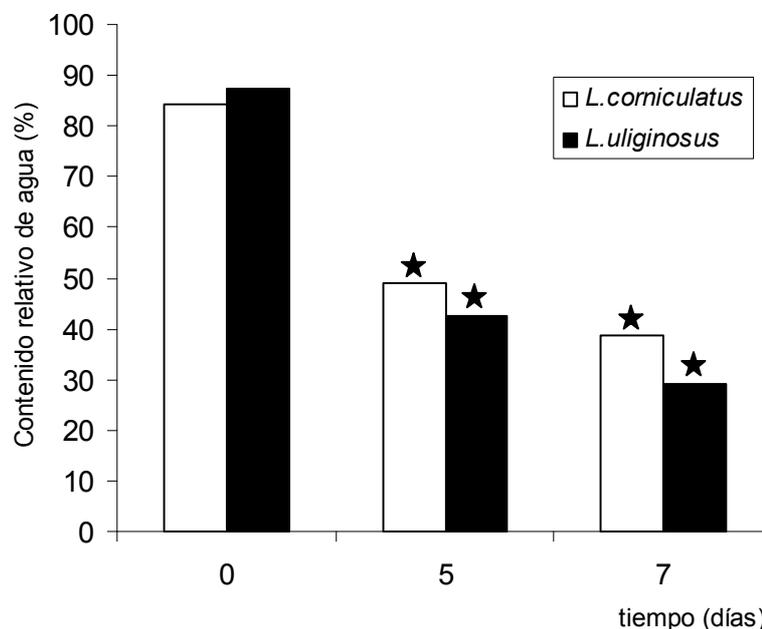


Figura 3. Contenido relativo de agua (CRA) en hojas de plantas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* privadas de riego durante 7 días. El * indica diferencias significativas menores al 5% según el test de Duncan entre el control con riego (tiempo 0) y plantas privadas de riego (5 y 7 días).

4.2 ACUMULACION DE PROLINA

La acumulación de prolina en plantas sometidas a diferentes tipos de estrés es una respuesta metabólica común (Samaras et al., 1995), y se ha propuesto que esta molécula puede actuar como agente osmótico (Harsh, 2003), como reserva de N y C para utilizarse durante la rehidratación (Ramanjulu y Sudhakar, 2000), en la defensa antioxidante no enzimática (Díaz, 2005a) y en la inducción de genes relacionados con las respuestas a estrés hídrico (Maggio et al., 2002).

La concentración de prolina en folíolos de *L. uliginosus* y de *L. corniculatus* se incrementó respecto al tiempo 0, 10 veces a los 5 días de suspendido el riego, y mas de 20 veces dos días después, es decir, a los 7 días de suspendido el riego (figura 4). La concentración de prolina fue la misma en ambas especies en los distintos tiempos. La variación de la concentración de prolina encontrada en los tratamientos estresados indica que esta molécula, si bien participa en la respuesta a estrés hídrico en ambos genotipos, no puede usarse como criterio para diferenciarlos.

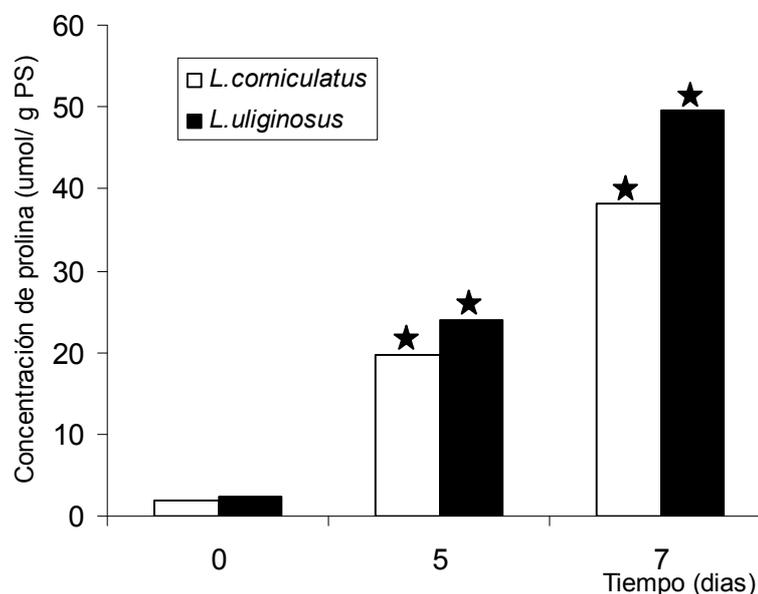


Figura 4. Evolución de la concentración de prolina en hojas de plantas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* privadas de riego. El * indica diferencias significativas menores al 5% según el test de Duncan entre el control con riego (tiempo 0) y plantas privadas de riego (5 y 7 días).

Tanto las plantas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* sometidas a estrés hídrico, presentaron una disminución en el CRA de las hojas, que se relacionó negativamente con la acumulación de prolina en las mismas (figuras 3 y 4). Hay evidencias experimentales que indican que la acumulación de prolina se debe a su síntesis de novo, y mayoritariamente en hojas (Díaz et al., 2005b).

Borsani (1997), encontró que en *L. corniculatus* en condiciones de estrés de imposición rápida, el contenido de prolina en hojas de plantas estresadas se incrementa cinco veces respecto al control. Si bien la forma de imposición del estrés que se usó en esta tesis es más lenta, de todas formas es más drástica que la que ocurre en condiciones de campo. En general, cuando se someten plantas a situaciones de estrés hídrico en laboratorio, se utilizan condiciones más severas que las que enfrentan en condiciones de campo. Esto se debe a la necesidad de producir efectos repetibles, y en realidad no siempre es necesario alcanzar esa severidad para desencadenar las respuestas a estrés (Zhu et al., 1997).

El hecho que se acumule más prolina en plantas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* sometidas a estrés lento, se debe a que con este tipo de imposición del estrés la vía de síntesis está activa durante más tiempo, mientras la planta está sometida a esa condición. La síntesis de prolina es una respuesta temprana ante el déficit hídrico, que ocurre a lo

largo del período de estrés. La síntesis temprana puede hacer pensar que primero esta molécula actúe como señal, además de participar de las funciones enumeradas antes.

La acumulación de prolina es común en el género *Lotus*. Díaz (2005a) encontró que la concentración de prolina se correlacionó negativamente con el CRA en folíolos de cinco especies del género, independientemente que las plantas hubieran sido cultivadas con nitrato o amonio. En *L. corniculatus* y *L. japonicus* se constató la misma correlación entre CRA y concentración de prolina en plantas noduladas (Borsani et al., 1999) y en plantas cultivadas con nitrato o con amonio (Díaz, 2005a).

Hanson et al. (1994) observaron que en condiciones de estrés osmótico las plantas pueden acumular diferentes moléculas nitrogenadas como betaína y glicina betaína, entre otras. De acuerdo a los resultados obtenidos, *L. uliginosus* es una leguminosa que corresponde al grupo de plantas que acumulan prolina en respuesta a la disminución del potencial hídrico, pero en esta tesis no se evaluó en esta especie la respuesta a estrés hídrico mediada por otras moléculas nitrogenadas.

A pesar de la información acumulada, no hay evidencias que permitan concluir que los genotipos tolerantes a estrés hídrico acumulen más prolina que los genotipos sensibles. Sin embargo, estudios en plantas transgénicas tendientes a dilucidar la contribución de prolina durante el estrés hídrico, indican que plantas que sobreexpresan genes relacionados con enzimas de la vía de síntesis de prolina son más tolerantes a la disminución del contenido hídrico celular (Borsani, 1997).

El contenido de prolina en hojas varía entre las diferentes especies y puede ser usado como un indicador del déficit hídrico al cual ha sido sometida una planta. Para mantener alta la concentración de prolina en tejidos estresados se debe inhibir su oxidación, mientras que en tejidos turgentes su oxidación es rápida. En plantas de *L. corniculatus* se encontró que la actividad PDH, responsable de la oxidación de prolina, se inhibe en condiciones de estrés hídrico, lo que contribuye al aumento de la concentración de prolina (Borsani et al., 1999). De todas formas en condiciones de estrés, la síntesis contribuye más a la acumulación de prolina que la inhibición de su oxidación, y su acumulación resulta de su síntesis de novo (Díaz, 2005a).

Díaz (2005a), encontró que la actividad proteolítica en hojas de *Lotus* es la misma en plantas normales y estresadas, lo que indica que en esta leguminosa el estrés hídrico no induce proteólisis como ha sido encontrado en tomate (Bauer et al., 1997), *Phaseolus vulgaris* y *Vigna unguiculata* (Roy-Macauley et al., 1992). El incremento de esta actividad determinaría el aumento de la concentración de aminoácidos totales, lo que no fue observado por Díaz et al. (2005b) en *L. corniculatus*.

El incremento de un osmolito compatible está determinado por la disponibilidad de sus precursores al momento de imposición del estrés (Hare et al., 1998), y el glutamato

puede actuar como factor que promueve la sobreproducción de prolina en condiciones de estrés hídrico o salino en plantas mutantes de tabaco. Por otro lado, en plantas de *Brasica napus* se encontró que bajos niveles de glutamato se relacionaron con una baja acumulación de prolina en condiciones de estrés hídrico (Díaz, 2005a).

4.3 EVALUACION DEL DAÑO OXIDATIVO MEDIANTE TBARS

El estrés oxidativo ocurre cuando los procesos generadores de especies reactivas del oxígeno (ERO), superan a la capacidad de las defensas antioxidantes celulares (Díaz, 2005a). Estas moléculas pueden dañar a lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, y llevar a alternaciones del metabolismo que conducen o promueven la muerte celular.

La sequía y la alta radiación lumínica, entre otros agentes, favorecen la generación de ERO y así el desencadenamiento de estrés oxidativo, que también acelera los procesos de senescencia. El estrés oxidativo, consecuencia del déficit hídrico al cual se ve sometida una planta en diferentes momentos de su ciclo de vida, es un hecho conocido. Sin embargo la habilidad de las plantas para contrarrestar los efectos de dicho estrés es un aspecto menos comprendido (Borsani, 1997).

El daño oxidativo se evaluó a través de la peroxidación de lípidos de membrana, que son sustancias que pueden reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). La concentración de TBARS en hojas de ambas especies fue la misma en los diferentes tiempos. Sin embargo en *L. corniculatus* la concentración de TBARS se incrementó 3 y 5 veces a los 5 y 7 días respectivamente de impuesto el estrés hídrico (figura 5). En *L. uliginosus* no se observó daño oxidativo evaluado a través de TBARS, lo que indicaría alguna diferencia entre ambas especies en la capacidad de contrarrestar la generación de ERO.

Borsani (1997), en un trabajo en el que usó estrés hídrico con imposición rápida, encontró que la peroxidación de lípidos de membrana en hojas de *L. corniculatus* ya era evidente evaluada mediante TBARS a las 4 h de suprimido el suministro de agua, pero se hizo significativamente diferente recién a las 24 h, cuando los síntomas de estrés eran severos y evidentes.

Durante la situación de estrés hídrico, se producen daños de membrana debido a la peroxidación de fosfolípidos de membrana (Sminorff, 1993). A pesar de la existencia de un sistema de defensa antioxidante, los lípidos de membrana son peroxidados por el radical hidroxilo, que aumenta su generación en a las membranas fotosintéticas y mitocondriales debido a los activos procesos redox que ocurren en ellas (Borsani, 1997).

Adam et al. (1989), mostraron que las ERO tienen una tasa de reacción del orden de nano y microsegundos, sin embargo la evidencia del daño oxidativo medido por TBARS aparece después de varias horas. De esta forma, desde la iniciación del

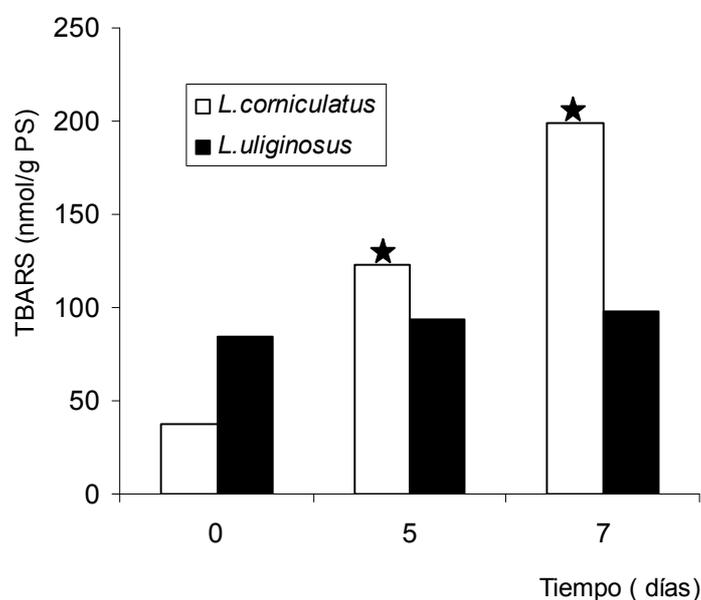


Figura 5. Concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hojas de plantas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* privadas de riego durante 7 días. El * indica diferencias significativas menores al 5% según el test de Duncan entre el control con riego (tiempo 0) y plantas privadas de riego (5 y 7 días).

proceso de peroxidación, y durante la propagación de este, no es posible determinar daños de membrana con la técnica usada. La utilización de técnicas como la determinación de dienos conjugados y desaparición de tocoferol y carotenos, permitiría evidenciar daños de membrana previos a la aparición de los síntomas (Shewfelt y Purvis, 1995).

4.4 CONTENIDO DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

Los pigmentos fotosintéticos son moléculas capaces de captar energía lumínica y participar de las etapas iniciales de la transformación de energía lumínica en energía química. La gran variedad de sustancias que responden a la categoría de pigmentos se diferencian en su composición y estructura molecular, diferencias que son la causa de sus distintas propiedades. Los diferentes tipos de clorofilas presentes en los distintos organismos fotosintéticos tienen pequeñas diferencias, que desde su aparición marcan su capacidad para aprovechar la energía lumínica en ambientes muy diferentes.

En las plantas, además de las clorofilas también hay otros pigmentos como los carotenoides que son de color rojo, anaranjado, o amarillo, que en las hojas verdes están

enmascarados por las clorofilas, pero son más abundantes que estas, y juegan un rol muy importante en la defensa antioxidante.

Las plantas de *L. corniculatus* no mostraron cambios significativos en los contenidos de clorofila a y b, ni en el contenido de carotenos como consecuencia del déficit hídrico (figura 6A, 6B y 6C). Estos resultados indican que en *L. corniculatus* en las condiciones del ensayo definidas, los pigmentos no son afectados por las ERO, como ocurre en otras especies frente a diferentes tipos de estrés. Díaz et al. (2005b), tampoco encontraron variación significativa en el contenido de pigmentos fotosintéticos en *L. corniculatus*. Sin embargo en *L. uliginosus* se encontró un descenso de los contenidos de clorofilas a y b como consecuencia del déficit hídrico (figura 6A y 6B). El contenido de carotenos, al igual que lo encontrado en *L. corniculatus*, no presentó diferencias entre tratamientos (figura 6C).

En *L. uliginosus* la concentración de clorofila a descendió después de 5 días de privación de riego y se mantuvo en la misma concentración hasta el día 7. Sin embargo, en *L. corniculatus* la concentración de clorofila a no varió a lo largo del periodo en que las plantas permanecieron con privación de agua, lo que pone de manifiesto una diferencia entre estas especies. La mayor estabilidad de la clorofila a de *L. corniculatus* en condiciones de déficit hídrico encontrada en esta tesis, podría estar relacionada con la mayor tolerancia al estrés hídrico de esta especie Díaz et al. (2005b).

En *L. corniculatus* la concentración de clorofila b no varió durante los 7 días en que las plantas se privaron de agua (figura 6B). Cuando se analizó la concentración de clorofila b en *L. uliginosus* se encontró el mismo comportamiento que el observado para la clorofila a, al día 5 la concentración de clorofila b descendió aproximadamente el 50%, y se mantuvo constante hasta el día 7.

A diferencia de lo ocurrido con las clorofilas a y b, los carotenos no variaron su concentración durante los 7 días de supresión de riego. Los carotenos participan en la captación de ERO, pero en estas condiciones no parecen estar involucrados en la defensa antioxidante no enzimática.

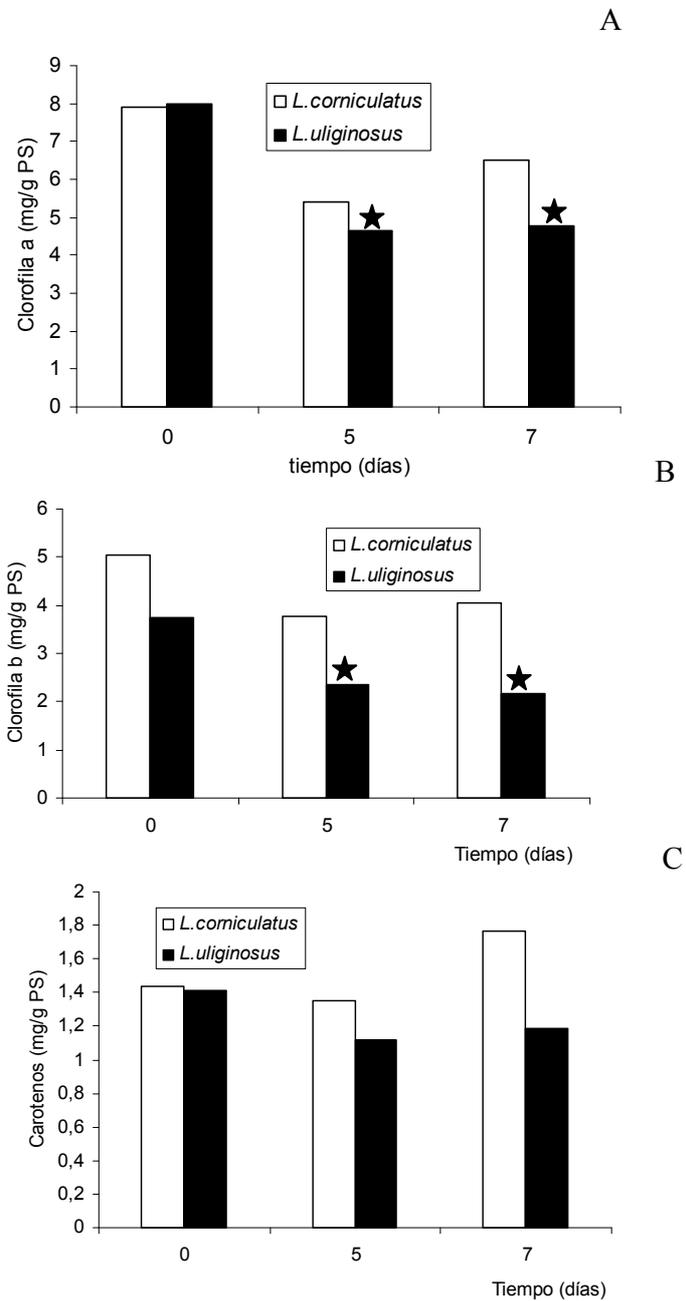


Figura 6. Concentración de pigmentos en hojas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* privadas de riego durante 7 días. A: concentración de clorofila a; B: concentración de clorofila b y C: concentración de carotenos. El * indica diferencias significativas menores al 5 % según el test de Duncan entre el control (tiempo 0) y las plantas privadas de riego (5 y 7 días).

4.5 EMISION DE FLUORESENCIA DEL PSII

La fluorescencia de la clorofila puede medirse fácilmente y servir como marcador del funcionamiento fotosintético. La medición de la fluorescencia emitida por las clorofilas es una técnica útil cuando se quiere obtener información cualitativa y cuantitativa sobre la fotosíntesis y juzgar el estado fisiológico de la planta (Krause y Weis, 1991). El análisis de la fluorescencia de las clorofilas permite un estudio rápido y no invasivo de aspectos claves de la captura de luz y transporte electrónico fotosintético.

En este trabajo se utilizó el rendimiento cuántico máximo del PSII (F_V/F_M) para evaluar la respuesta al déficit hídrico en plantas de las dos especies de Lotus. La relación F_V/F_M , es un parámetro fácilmente medible, que da información sobre el estado funcional del aparato fotosintético en hojas de plantas intactas (Krause y Weis, 1991).

En plantas de *L. uliginosus* estresadas, la relación F_V/F_M se redujo un 50% a los 7 días de privación de riego (figura 7). De esta forma, si bien este parámetro puede servir como indicador de fotoinhibición o de algún tipo de daño en los fotosistemas causado por el déficit hídrico, lo es en estadios tardíos, cuando las plantas ya evidencian síntomas de marchites. El uso del parámetro F_V/F_M en algunas especies evidencia el daño o alteración en etapas tempranas, lo que no se observó en estas especies de Lotus. En *L. corniculatus* no se encontraron diferencias significativas en la emisión de fluorescencia en los diferentes tiempos (figura 7).

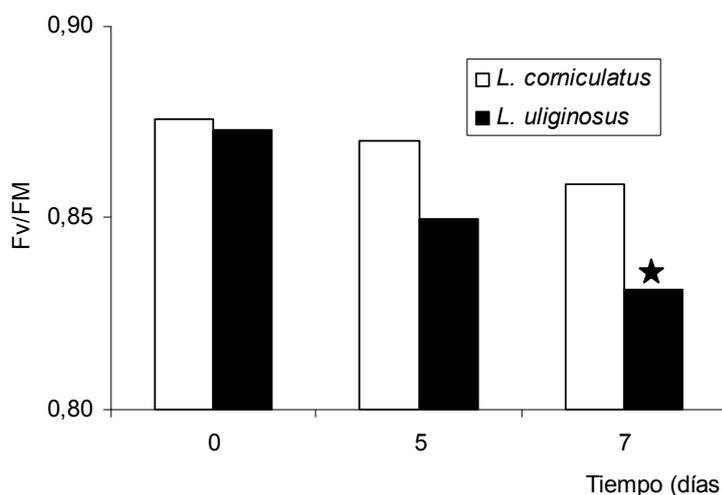


Figura 7. Rendimiento fotoquímico máximo del PSII evaluado como F_V/F_M en hojas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* privadas de riego. El * indica diferencias significativas menores al 5 % según el test de Duncan entre el control con riego (tiempo 0) y plantas privadas de riego durante 7 días.

Los resultados obtenidos en relación a la emisión de fluorescencia del PSII y estado de la clorofila ponen en evidencia que en *L. corniculatus* ninguno de estos parámetros se ve alterado como consecuencia del estrés hídrico, mientras que en *L. uliginosus*, ambos parámetros variaron (figura 6A, 6B y figura 7). Esto pone en evidencia una diferencia interesante con este parámetro, que habrá que estudiarlo como marcador funcional de sensibilidad – tolerancia a estrés hídrico en esta especie.

4.6 PERDIDA DE AGUA POR LAS HOJAS

Los estomas son orificios que se encuentran en la superficie foliar, generalmente más abundantes en la cara abaxial. Su diámetro puede ser regulado por variaciones en la presión de turgencia de las células de guarda, lo que permite regular el intercambio de vapor de agua y CO₂ entre la atmósfera y la planta.

Cuando los estomas están abiertos la planta tienen un mayor intercambio de CO₂. Sin embargo, bajo condiciones de estrés hídrico las plantas cierran los estomas para restringir la pérdida de agua, y a consecuencia se limita el intercambio de otros gases. En condiciones de déficit hídrico las plantas poseen también otros mecanismos adaptativos como cambios en la posición de las hojas, que también contribuyen con una menor absorción de luz, o incluso la pérdida de la hoja.

Para establecer la magnitud de la pérdida de agua a través de los estomas en ambas especies, se arrancaron hojas de plantas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* que permanecieron en cámaras de crecimiento con 45% y 90% de HR el día en que se realizó el ensayo. Este consistió en arrancar las hojas después de 4h de encendida la luz y establecidas las HR y pesarlas a cada hora, durante 3 h en las que permanecieron a humedad relativa ambiente de 45% (figura 8). La pérdida de agua por las hojas separadas no mostró diferencias significativas entre las dos especies estudiadas.

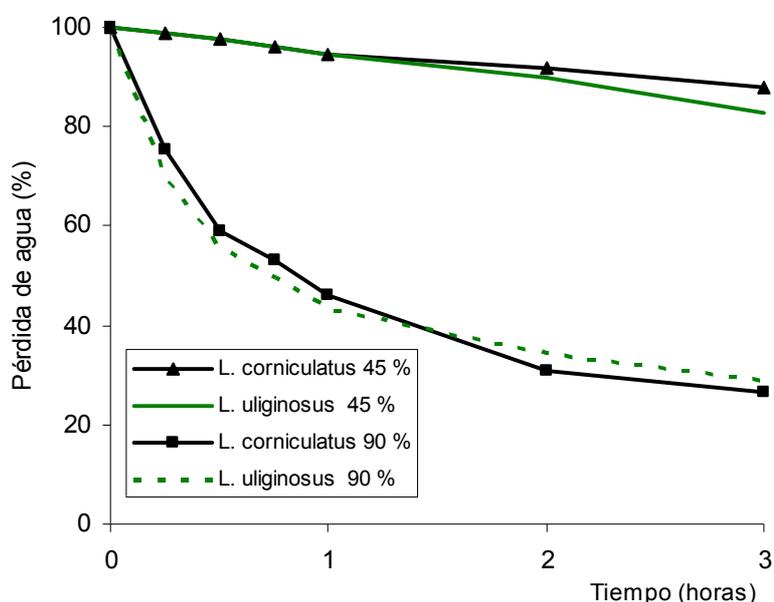


Figura 8. Pérdida de agua (%) de hojas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* mantenidas a 90 y 45 % de HR el día en que se realizó el ensayo, previo a ser arrancadas.

La pérdida de agua por hojas separadas sirve para estimar la apertura/cierre estomático en las condiciones en que se encontraban las plantas en el momento en que las hojas fueron arrancadas. En este caso a 45 y 90 % de HR. En estas condiciones no se encontraron diferencias significativas entre las dos especies estudiadas en cada situación. Las hojas provenientes de plantas de la cámara con 45 % HR tenían los estomas parcialmente cerrados, por eso la pérdida de agua fue más lenta, mientras que las hojas de plantas provenientes de la cámara con 90 % HR tenían los estomas más abiertos.

4.7 EFICIENCIA DEL USO DEL AGUA

El rendimiento de los cultivos en un ambiente con déficit hídrico se relaciona, entre otros factores, con la EUA, que estima la capacidad de la planta para producir materia seca por cantidad de agua evapotranspirada. Así, las plantas con una mayor eficiencia transpiratoria hacen un uso del agua más eficiente.

La dificultad para realizar mediciones directas de eficiencia transpiratoria ha limitado su uso en los programas de mejoramiento genético (Menéndez y Hall, 1996). Sin embargo, la discriminación isotópica del ^{13}C (Δ) proporciona una medida indirecta de la eficiencia transpiratoria, y puede ser utilizada como criterio de selección en programas de fitomejoramiento (Farquhar y Richards, 1984).

El interés en la Δ , reside entre otros factores, en la correlación negativa con la EUA calculada como el cociente de la actividad fotosintética y la conductancia estomática (Farquar et al., 1989), de forma que ligeras variaciones en la conductancia estomática se reflejarán en la Δ . De esta forma, el déficit hídrico genera una disminución de la conductancia estomática, lo que produce un incremento en la EUA y por consiguiente un descenso de la Δ .

La discriminación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, es entonces uno de los parámetros fisiológicos más prometedores por su relación con la EUA y con el metabolismo fotosintético (Farquar et al., 1989). Nosotros encontramos que en plantas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* crecidas durante 30 días, y sin suministro de agua durante 7 días, se generan diferencias en la Δ evaluada a través de espectrometría de relaciones isotópicas. Esto haría a este tipo de estimación una herramienta también aplicable a estas especies para estimar la EUA (Cuadro 1).

Cuadro 1. Valores de discriminación isotópica del ^{13}C en plantas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus*. $t = 0$ corresponden a plantas de 30 días crecidas a capacidad de campo y $t = 7$ a las plantas privadas de riego durante 7 días.

$\Delta^{13}\text{CO}_2/000$		
	<i>L. corniculatus</i>	<i>L. uliginosus</i>
$t = 0$	27.7	26.0
$t = 7$	25.0	24.5

En condiciones de buena disponibilidad de agua ($t = 0$), *L. corniculatus* presentó una mayor discriminación isotópica respecto a *L. uliginosus* (Cuadro 1). Estos valores de Δ indican que *L. uliginosus* en esas condiciones es más eficiente en el uso del agua que *L. corniculatus*, dado que la Δ se relaciona inversamente con el EUA. De todas formas esto podría implicar menor producción de biomasa.

Experimentalmente se ha encontrado una relación lineal y negativa entre Δ y EUA en condiciones de estrés hídrico, y hay evidencias experimentales que confirman esta relación en maní (Hubick et al., 1986), tomate (Martín y Thorstenson, 1988), trigo y cebada (Hubick y Farquar, 1989), en *Vigna umbellata* (Kirchhoff et al., 1989), gramíneas pratenses (Jhonson et al., 1990), y algodón (Hubick y Gibson, 1993).

El fundamento de la teoría, establecido por Farquar y Richards (1984), se basa en las proporciones relativas de los isótopos del carbono. En la naturaleza existen dos isótopos estables del carbono el ^{12}C y el ^{13}C , con proporciones de 98.9% y 1.1% respectivamente. La proporción relativa del ^{13}C en tejidos vegetales normalmente es inferior a la presente

en la atmósfera, lo que indica que existe discriminación isotópica de carbono contra el ^{13}C , en la incorporación de CO_2 en la planta.

Entre los cambios fisiológicos que se producen en una planta estresada por sequía, se destaca el cierre estomático que evita la pérdida de agua por transpiración, y también limita el intercambio de gases en general. El cierre estomático evita entonces en buena medida, las consecuencias negativas derivadas del déficit hídrico. Por lo tanto, como el déficit hídrico origina el cierre estomático, existe un aumento en la eficiencia transpiratoria y se encontrará una mayor abundancia de ^{13}C en las hojas, es decir que habrá una menor discriminación del isótopo pesado del carbono (Robinson et al., 2000).

En condiciones de déficit hídrico ($t = 7$), tanto *L. corniculatus* como *L. uliginosus* discriminan menos el ^{13}C que en la situación control, lo que se debe al cierre estomático y a la menor disponibilidad de ^{12}C . A partir de los datos de Δ y con esta forma de establecer el déficit hídrico (Cuadro 1) *L. corniculatus* en situación de déficit hídrico presenta un cierre estomático mayor que *L. uliginosus*, con un descenso de la Δ de 2.7 frente a 1.5.

La disminución de la transpiración por un cierre parcial de estomas bajo condiciones de estrés hídrico irá asociada a una menor producción de biomasa y rendimiento. Sin embargo que la EUA aumente sustancialmente en condiciones de déficit hídrico le permite soportar mejor esa situación de estrés. Así, como una característica deseable de las especies en estudio es alta producción de biomasa, las plantas con esa capacidad deben tener estomas más abiertos, y por lo tanto menor EUA. Una forma de encontrar un equilibrio razonable entre ambos factores es a través de ajustes estomáticos rápidos, pero no parece ser la mejor estrategia el mantener un cierre estomático parcial en condiciones en las que no hay déficit de agua, como se encontró en *L. uliginosus* (Cuadro 1).

5. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, con las condiciones de ensayo definidas para este trabajo, se puede concluir que en una situación de déficit hídrico:

- a. La concentración de TBARS, el contenido de clorofila a y clorofila b, la emisión de fluorescencia y la discriminación isotópica del ^{13}C son diferentes en *L. corniculatus* y en *L. uliginosus*.
- b. Si bien el CRA y la prolina son indicadores de estrés hídrico en las plantas, no son parámetros adecuados para establecer diferencias entre estas especies.
- c. La discriminación isotópica del ^{13}C parece ser el parámetro mas adecuado para ser usado como marcador funcional de respuesta a estrés hídrico en las especies de Lotus estudiadas.

6. RESUMEN

En este trabajo se buscaron posibles marcadores bioquímicos y fisiológicos de respuesta a déficit hídrico en *L. uliginosus*, para lo que se lo comparó con *L. corniculatus*, especie más estudiada en este sentido. Para esto las plantas crecieron en condiciones controladas y se consideraron como posibles indicadores la acumulación de prolina en folíolos, concentración de pigmentos fotosintéticos, emisión de fluorescencia del PSII (relación F_v/F_M), eficiencia en el uso del agua (EUA), daño oxidativo de membrana (mediante TBARS), pérdida de agua por las hojas y contenido relativo de agua (CRA). La concentración de prolina de las hojas de ambas especies, aumentó 10 y más de 20 veces a los 5 días y 7 días de suprimido el riego, respectivamente. El CRA mostró el mismo comportamiento en ambas especies, y disminuyó de un 85% en el día 0, a un 45 al día 5 y 35% a los 7 días de suprimido el riego. En este período, no varió la concentración de TBARS en *L. uliginosus*, pero en *L. corniculatus* se incrementó 3 y 5 veces a los 5 y 7 días respectivamente. El contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila b y carotenos) en *L. corniculatus* no mostró variaciones entre los tratamientos, sin embargo en *L. uliginosus*, los contenidos de clorofila a y b mostraron una disminución de aproximadamente 50% el 5° día después de suspendido el riego, y se mantuvo en ese orden el día 7. La concentración de carotenos no varió en ninguna de las dos especies. La emisión de fluorescencia del PSII, evaluada mediante el parámetro F_v/F_M , descendió 50% a los 7 días de estrés en *L. uliginosus*, mientras que en *L. corniculatus* dicho parámetro no mostró diferencias entre tratamientos. En condiciones de buena disponibilidad de agua, *L. corniculatus* presentó mayor discriminación isotópica del ^{13}C (Δ) respecto a *L. uliginosus*. En condiciones de déficit hídrico durante 7 días, tanto *L. corniculatus* como *L. uliginosus* presentaron menor Δ respecto a los controles, pero *L. corniculatus* en esa condición tuvo mayor cierre estomático que *L. uliginosus*, con un descenso de Δ de 2.7, frente a 1.5.

Palabras clave: Eficiencia en el uso del agua; Fotosistema II; Prolina; TBARS.

7. SUMMARY

In this work were searched possible biochemical and physiologic markers in response to hydric deficit in *L. uliginosus* for which it was compared to *L. corniculatus*, a more studied species in this sense. For this, the plants grew in controlled conditions and were considered as possible indicators: proline accumulation in folíolos, accumulation of photosynthetic pigments, emission of PSII fluorescence (FV/FM ratio), efficiency in the use of water (EUW), membrane oxidative damage (through TBARS), and loss of water and relative volume of water (RVW). The concentration of proline in the leaves of both species rose 10 and more than 20 times in 5 days and 7 days of suppressing watering, respectively. The RVW showed the same behavior in both species, and dropped from 85% in day 0, to 45 % in day 5 and 35% in 7 days of suppressing watering. In this period, there was no variation of TBARS concentration in *L. uliginosus*, but in *L. corniculatus* it increased 3 and 5 times in 5 and 7 days respectively. The amount of photosynthetic pigments (chlorophyll a, chlorophyll b and carotenes) in *L. corniculatus* did not show variations in treatments, however, in *L. uliginosus*, the amounts of chlorophyll a and b decreased approximately 50 % the 5th day after suppressing watering, and kept that level the 7th day. The concentration of carotenes did not vary in either species. The fluorescence emission of PSII, assessed through the FV/FM parameter, dropped 50 % in 7 days of stress on *L. uliginosus*, while in *L. corniculatus*, such parameter didn't show differences between treatments. In conditions of good availability of water, *L. corniculatus* showed bigger isotopic discrimination of ^{13}C (Δ) than *L. uliginosus*. In conditions of hydric shortage during 7 days, either *L. corniculatus* or *L. uliginosus* showed less Δ related to the controls, but *L. corniculatus* in that condition had bigger estomatic closing than *L. uliginosus*, with a Δ fall of 2.7 the first and 1.5 the other.

Key words: Use of water efficiency; Photosystem II; Proline; TBARS.

8. BIBLIOGRAFIA

1. ADAM, A.; FARKAS, T.; SOMLYAI, G.; HEVESI, M.; KIRALY, Z. 1989. Consequence of O₂ generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco; deterioration of membrane lipids. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 34:13-26.
2. AL-SULAITI, A.; BLACKWELL, R.; LEA, P.; DAVIES, W. 1990. Capacity for proline accumulation during water deficit and its relation with growth of barley photorespiratory mutants. *J. Exp. Bot.* 41:4-14
3. ANTOLÍN, M.; YOLLER, J.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M. 1995. Effects of temporary drought on nitrate-fed and nitrogen-fixing alfalfa plants. *Plant Sci.* 107:159-165
4. ARRILLAGA, I.; CODURI, G. 1997. Manejo de defoliación de *Lotus pedunculatus* cv. Maku. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 70 p.
5. ATTIPALLI, R.R.; KOLLURU, V.C.; MUNUSAMY, V. 2004. Drought- induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* 161: 1189-1202.
6. AYALA, W.; BERMUDEZ, R.; CARÁMBULA, M. 2001. Manejo de implantación de lotus Maku. In: Risso, D. F.; Albicette, M. M. eds. Lotus Maku; manejo, utilización y producción de semillas. Montevideo, INIA. pp. 3-8 (Serie Técnica no. 119).
7. BAUER, D.; BIEHLER, K.; FOCK, H.; CARRAYOL, E.; HIREL, B. MIGGE, A.; BECKER, T. 1997. A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilisation of leaf nitrogen during water stress tomato. *Physiol. Plant.* 99:241-248.
8. BERRIEL, V. 2005. Aislamiento y caracterización de un mutante de *Arabidopsis thaliana* alterado en la sensibilidad a ácido abscísico. Tesis de Maestría. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 86 p.
9. BIASSINI, G. ; DE MAIO, V. 2005. Respuesta a la inoculación de Lotus uliginosus en sitios con y sin antecedentes de Lotus corniculatus. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 92 p.
10. BONHERT, H.; NELSON, D.; JENSEN, R. 1995. Adaptation to environmental stresses. *Plant Cell.* 7:1099-1111.

11. _____.; SHEVELEVA, E. 1998. Plant stress adaptations-making metabolism move. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:267-274.
12. BORSANI, O. 1997. Respuestas bioquímicas inducidas por estrés hídrico en *Lotus corniculatus*. Tesis de Maestría. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 79 p.
13. _____.; DÍAZ, P.; MONZA, J. 1999. Proline is involved in water stress responses of *Lotus corniculatus* nitrogen fixing and nitrate fed plants. *J. Plant Physiol.* 155:269-273.
14. BRAY, E. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103:1035-1040.
15. _____. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2:48-54.
16. _____.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. 2000 Responses to abiotic stresses. *In:* Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. eds. *Biochemistry biology of plants*. s.l., American Society of Plant Physiologists. pp. 1158-1203.
17. _____. 2002. Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*; an analysis using microarray and differential expression data. *Ann. Bot.* 89: 803-811.
18. BREWITZ, E.; LARSSON, C. M.; LARSSON, M. 1996. Response of nitrate assimilation and N translocation in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) to reduced ambient air humidity. *J. Exp. Bot.* 47: 855-861.
19. CADENAS, E. 1985. Oxidative stress and formation of excited species. *In:* Sies, H. ed. *Oxidative stress*. New York, Academic Press. pp. 311-330.
20. CARAMBULA, M.; AYALA, W.; CARRIQUIRY, E. 1994. *Lotus pedunculatus*; adelantos sobre una forrajera que promete. Montevideo, INIA 13 p. (Serie Técnica no. 45).
21. _____. 2001. Manejo de lotus Maku para producción de forraje. *In:* Risso, D. F.; Albicette, M. M. eds. *Lotus Maku; manejo, utilización y producción de semillas*. Montevideo, INIA. pp. 9-21 (Serie Técnica no. 119).
22. _____. 2002. Pasturas y forrajes; potenciales y alternativas para producir forraje. Montevideo, Hemisferio Sur. v. 1, 357 p.

23. CARTER, T. 1989. Breeding for drought tolerance in soybean do we stand? In: World Soybean Conference (4th., 1989, Buenos Aires, Argentina).Proceedings. s.n.t. pp. 55-89.
24. CASSANO, L.; MARTÍN, M.; SABATER, B. 1994. Sensitivity of superoxide dismutase transcripts levels and activities to oxidative stress is lower in mature-senescence than in young barley leaves. *Plant Physiol.* 106:1033-1039.
25. CASTAÑO, J.P.; MENENDEZ, F.G. 1998. Caracterización vegetativa y producción de semillas de Lotus. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 67 p.
26. CHAREST, C.; PHAN, C. 1990. Cold acclimation of wheat (*Triticum aestivum*); Properties of enzymes involved in proline metabolism. *Physiol. Plant.* 80:159-168.
27. CHEN, T.; MURATA, N. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Plant Biol.* 5: 250-257.
28. CHIANG, H.; DANDEKAR, M. 1995. Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during development and in response to desiccation. *Plant Cell Environ.* 18:1280-1290.
29. DEL PINO, A.; HERNANDEZ, J. 2002. Ciclaje de fósforo por animales bajo pastoreo en campo natural y mejoramientos con leguminosas sobre suelos de basalto. *Agrociencia.* 6(2): 47-52.
30. DÍAZ, P.; BORSANI, O.; MONZA, J. 1999. Acumulación de prolina en plantas en respuesta al estrés osmótico. *Agrociencia.* 3:1-10.
31. _____. 2005a. Acumulación de prolina en *Lotus sp* en condiciones de estrés hídrico. Tesis de Maestría. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 76 p.
32. _____.; MONZA, J.; MÁRQUEZ, A. 2005b. Drought and saline stress in *Lotus japonicus*. In: Márquez, A. J. ed. *Lotus japonicus handbook.* s.n.t. pp. 25-37.
33. _____.; BORSANI, O.; MONZA, J. 2005c. Lotus-related species and their agronomic importance. In: Márquez, A. J. ed. *Lotus japonicus handbook.* s.n.t. pp. 35-40.

34. FARQUHAR, G.; O'LEARY, M.H.; BERRY, J.A. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 9: 121-137.
35. _____.; RICHARDS, R.A. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Aust. J. Plant Physiol.* 11: 539-552.
36. _____.; EHLERINGER, J.R.; HUBICK, A.G. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol.* 40: 503-537.
37. _____. 1991. Use of stable isotopes in evaluating plant water-use efficiency. In: International Symposium on the Use of Stable Isotopes in Plant Nutrition, Soil Fertility and Environmental Studies (1991, Viena). Proceedings. Viena, IAEA/FAO. pp. 475-488.
38. FERRES, S.; QUEHEILLE, P.; RIET, I. 2003. Fertilización fosfatada en mejoramientos de campo en la Región Este. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 151 p.
39. FORMOSO, D.; OFICIALDEGUI, R.; NORBIS, R. 2001. Producción y valor nutritivo del campo natural y mejoramientos extensivos con ovinos. Montevideo, SUL. pp. 7-24.
40. FOYER, C. H.; VALADIER, M. H.; MIGGE, A.; BECKER, T. W. 1998. Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiol.* 117: 283-292.
41. GLISON, N. 2008. Respuestas de *Lotus corniculatus* ante el déficit hídrico y nitrogenado; crecimiento, aparato fotosintético tilacoidal y acumulación de prolina. Trabajo especial. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. 25 p.
42. GORGOCENA, Y.; ITURBE-ORMAETXE, I.; ESCUREDO, P.; BECANA, M. 1995. Antioxidant defenses against activated oxygen in pea nodules subjected to water stress. *Plant Physiol.* 108:753-759.
43. HANDBERG, K.; STOUGAARD, J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J.* 2:487-496.

44. HANSON, A. ; RATHIANASABAPATHI, B. ; RIVOAL, J. ; BURNET, M. ; DILLON, M. ; GAGE, D. 1994. Osmoprotective compounds in the *Plumbaginaceae*: A natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. Proc. Nat. Acad. Sci. 91:306-310
45. HARE, P.; CRESS, W.; VAN STADEN, J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant Cell Environ. 21: 535-553.
46. HARSH, N. 2003. Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stresses wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. Envir. Exp. Bot. 50: 253-264.
47. HONG, Z. ; LAKKINENI, K. ; ZHANG, Z. ; VERMA, D. 2000. Removal of feedback inhibition of pyrroline 5 carboxylate reductase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physiol. 122:1129-1136.
48. HUBICK, K.T.; FARQUHAR, G.; SHORTER, R. 1986. Correlations between water-use efficiency and carbon isotope discrimination in diverse peanut (*Arachis*) germoplasm. Aust. J. Plant Physiol. 13: 803-816.
49. _____.; _____. 1989. Carbon isotope discrimination and the ratio of carbon gained to water lost in barley cultivars. Plant Cell Environ. 12: 795-784.
50. _____.; GIBSON, A. 1993. Diversity in the relationship between carbon isotope discrimination and transpiration efficiency when water is limited. In: Ehleringer, J.R.; Hall, A. E.; Farquhar, G. D. eds. Stable isotopes and plant carbon-water relations. San Diego, Academic Press. pp.311-324.
51. INGRAM, J.; BARTELS, D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 47:377-403.
52. IRIGOYEN, J. ; EMERICH, D. ; SANCHEZ-DIAZ, M. 1992. Water stress induced changes in concentration of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Physiol. Plant. 84: 55-60.
53. ITURBE-ORMAETXE, I.; ESCUREDO, P.; ARRESE-IGOR, C.; BECANA, M. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. Plant Physiol. 116:173-181.
54. JAIN, M.; MATHUR, G.; KOUL, S.; SARIN, N. 2001. Ameliorative effects of proline on salt stress induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogea* L.). Plant Cell Rep. 20:463-468.

55. JOHNSON, D.A.; ASAY, K.H.; TIESZEN, L.L.; EHLERINGER, U.R.; JEFFERSON, P.G. 1990. Carbon isotope discrimination: potential in screening cool- season grasses for water-limited environments. *Crop Sci.* 30: 338-343.
56. KAUTSKY, H.; APPEL, W.; AMANN, H. 1960. Chlorophyllfluoreszenz und kohlenassimilation. XIII. Die fluoreszenzkurve und die photochemie der pflanze. *Biochemische Zeitschrift.* 322: 277-292.
57. KAVI KISHOR, P. 1989. Salt stress in cultured rice cells; effects of proline and abscisic acid. *Plant Cell Environ.* 12:315-319.
58. KENIS, J.; ROUBY, M.; EDELMAN, M.; SILVENTE, S. 1994 Inhibition of nitrate reductase by water stress and oxygen in detached oat leaves; a possible mechanism of action. *J. Plant Physiol.* 144:733-739.
59. KIRCHOFF, W.R.; HALL, A.E.; THOMSON, W.W. 1989. Gas exchange, carbon isotope discrimination and chloroplast ultrastructure of a chlorophyll-deficient mutant of cowpea. *Crop Sci.* 29:109-115.
60. KIYOSUE, T.; YOSHIBA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOSAKI, K.; SHINOSAKI, K. 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 8:1323-1335.
61. KRAUSE, G. H.; WEIS, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis; the basics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 313-349.
62. LANCASHIERE, J.A.; GOMEZ, J.S.; McKELLER, A. 1980. "Grasslands Maku" Lotus seed production. In: Lancashiere, J.A. ed. *Herbage seed production.* Palmerston North, New Zeland, Grassland Association. pp. 80-86.
63. LANGER, R. H. 1973. Especies y variedades de gramíneas. In: *Las pasturas y sus plantas.* s.l., Hemisferio Sur. pp. 75-147.
64. LEVITT, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. I. Chilling, freezing and high temperature stresses. 2nd. ed. New York, Academic Press. 60 p.
65. LUTTS, S.; GUERRIER, G. 1995. Peroxidase activities of two rice cultivars differing in salinity as affected by proline and NaCl. *Biol. Plant.* 37: 577-586.

66. McCUE, K.F. ; HANSON, A.D. 1990. Drought and salt tolerance; towards understanding and application. *Trends Biotechnol.* 8: 358-362.
67. MAGGIO, A.; MIYAZAKI, S.; VERONESE, P.; FUJITA, T.; IBEAS, J.; DAMSZ, B.; NARASIMHAN, M.; HASEGAWA, P.; JOLY, R.; BRESSAN, R. 2002. Does proline accumulation play an active role in stress induced growth reduction? *Plant J.* 31:699-712.
68. MARTIN, B.; THORSTENSON, Y.R. 1988. Stable carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$), water use efficiency, and biomass productivity of *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pennelli*, and de F₁ hybrid. *Plant Physiol.* 88: 213-217.
69. MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence a practical guide. *J. Exp. Botany.* 51: 659-668.
70. MENÉNDEZ, C.; HALL, A. 1996. Heritability of carbon discrimination and correlations with harvest index in cowpea. *Crop Sci.* 36: 233-238.
71. RAMANJULU, S.; SUDHAKAR, C. 2000. Proline metabolism during dehydration in two mulberry genotypes with contrasting drought tolerance. *J. Plant Physiol.* 157: 81-85.
72. RAYAPATI, J.; STEWART, C. 1991. Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. *Plant Physiol.* 95:787-791.
73. RENTSCH, D.; HIRNER, B.; SCHMELZER, E.; FROMMER, W. 1996. Salt stress induced proline transporters and salt stress repressed broad specificity amino acid permease identified by suppression of yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell.* 8:1437-1446.
74. RHODES, D. ; HANDA, S. ; BRESSAN, R. 1986. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiol.* 82:890-903.
75. ROBINSON, D.; HANDLEY, L.; SCRIMGEOUR, C.; GORDON, D.; FORSTER, B.; ELLIS, R. 2000. Using stable isotope natural abundances (^{15}N and ^{13}C) to integrate the stress responses of wild barley (*Hordeum spontaneum* C. koch.) genotypes. *J. Exp. Bot.* 51: 41-50
76. ROHÁČEK, K.; BARTÁK, M. 1999. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence; basics concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica.* 37: 339-363.

77. ROY-MACAULEY, H.; ZUILY-FODIL, Y.; KIDRIC, M.; PHAM THI, A.; VIEIRA DA SILVA, J. 1992. Effects of drought stress on proteolytic activities in *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants. *Physiol. Plant.* 85:90-96.
78. SAMARAS, Y.; BRESSAN, R. A.; CSONKA, L. N.; GÁRCÍA-RÍOS, M. G.; PAINO D'URZNO, M.; RODEES, D. 1995. Proline accumulation during drought and salinity. In: Davies, W. J. ed. *Environment and plant metabolism flexibility and acclimatation*. s.l., Bios Scientific Publisher. pp. 161-186.
79. SÁNCHEZ-DÍAZ, M.; AGUIRREOLEA, J. 1993. Efectos fisiológicos que causa la falta persistente de agua en los cultivos. *Pythoma (España)*. 51:26-36.
80. SCHONFELD, M.A.; JOHNSON, R.C.; CARVER, B.F.; MORNHINWEG, D.W. 1988. Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Sci.* 28: 526-531.
81. SCHWACKE, R.; GRALLATH, S.; BREITKREUZ, K.; STRANSKY, E.; STRANSKY, H.; FROMMER, W.; RENTSCH, D. 1999. LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine and amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell.* 11:377-391.
82. SHEWFELT, R.; PURVIS, A. 1995. Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. *Hortscience.* 30:213-218.
83. SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatibles solutes. *Phytochemistry.* 28:1057-1060.
84. _____. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125:27-58.
85. STEWART, R.C.; HANSON, A.D. 1980. Proline accumulation as a metabolic response to water stress. In: Turner, N.C.; Kramer, P.J. eds. *Adaptation of plants to water and high temperature stress*. New York, Wiley. pp. 173-189.
86. TROLL, W.; LINDSLEY, J. 1955. A photometric method for the determination of proline. *J. Biol. Chem.* 215:655-660.

87. VERBRUGGEN, N.; XUE-JUN, H.; MAY, M.; VAN MONTAGNU, M. 1996. Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis; evidence for a negative transcriptional regulator. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 63: 8787-8791.
88. VERSLUES, P.; SHARP, R. 1999. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L) Primary roots at low water potentials. II Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. *Plant Physiol.* 119:1349-1360.
89. WELLBURN, A. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144: 307-313.
90. ZHANG, J.; NGUYEN, H. T.; BLUM, A. 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J. Exp. Bot.* 50: 291-302.
91. ZHU, J.; HASEGAWA, P.; BRESSAN, R. 1997. Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16: 253-277.
92. _____. 2003. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 53: 247-273.
93. ZYALALOV, A. 2004. Water flows in higher plants; physiology, evolution, and system analysis. *Russian J. Plant Physiol.* 51 (4): 547-555.