

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EVALUACIÓN BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA DE
POBLACIONES DE *Lotus corniculatus* L. SENSIBLES Y
TOLERANTES A SEQUÍA**

por

Germán MUTTONI PASTORINO

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

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2008**

Tesis aprobada por:

Director: -----
Ing. Agr. Dr. Omar Borsani

Dr. Jorge Monza

MSc. Pedro Díaz

Fecha: -----

Autor: -----
Germán Muttoni Pastorino

AGRADECIMIENTOS

A Jorge Monza y Omar Borsani por permitirme realizar esta tesis y por su constante apoyo en la etapa final de la carrera.

A Pedro Díaz por su gran ayuda durante las diferentes etapas de de la tesis.

A todos los integrantes del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Agronomía por su colaboración en la realización de los ensayos y por hacer que el trabajo de tesis sea realmente disfrutable.

A la Facultad de Agronomía por ser durante toda la carrera mi segunda casa.

A Juan Silva, Guillermo Cassarino, Diego Díaz, Felipe García, Lucía Vignotti y Joaquín Vázquez, por su colaboración y constante apoyo durante la realización de los ensayos, sin el cual hubiera sido extremadamente dificultosa la realización de los mismos.

A mis padres, familia y amigos por ser constantes en su apoyo incondicional durante mi formación como profesional y como persona.

A mi esposa Rosina Estol Peixoto por darle sentido a mi vida en cada momento.

TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|---|--------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN..... | II |
| AGRADECIMIENTOS..... | III |
| LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES..... | VI |
| | |
| 1. <u>INTRODUCCIÓN</u> | 1 |
| | |
| 2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> | 3 |
| 2.1. EL GENERO <i>Lotus</i> | 3 |
| 2.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Lotus corniculatus</i> | 4 |
| 2.2.1. <u>El cultivar San Gabriel</u> | 6 |
| 2.2.2. <u>El cultivar INIA Draco</u> | 7 |
| 2.2.3. <u>Selección de líneas Tolerante y Sensible de Lotus</u> | 8 |
| 2.3. MARCADORES BIOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS ASOCIADOS A DÉFICIT HÍDRICO..... | 10 |
| 2.3.1. <u>Conductancia estomática, difusión de CO₂ y agua</u> | 12 |
| 2.3.2. <u>Fluorescencia del fotosistema II (PSII)</u> | 16 |
| 2.3.3. <u>Acumulación de prolina</u> | 17 |
| 2.3.4. <u>Eficiencia en el uso del agua (EUA)</u> | 17 |
| 2.3.4.1 Definiciones..... | 17 |
| 2.3.4.2. Evaluación de la EUA..... | 23 |
| 2.3.5. <u>Discriminación de isótopos del carbono</u> | 24 |
| 2.3.5.1. Fraccionamiento isotópico-Efectos isotópicos (α)... | 25 |
| 2.3.5.2. Ecuaciones usadas para determinar la discriminación isotópica..... | 28 |
| 2.3.6. <u>Relación entre EUA y discriminación isotópica del carbono</u> | 32 |
| 2.3.6.1. EUA, crecimiento y biomasa en relación a $\Delta^{13}\text{C}$ | 34 |
| 2.3.6.2. Uso combinado de isótopos del carbono y oxígeno.. | 36 |
| | |
| 3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> | 38 |
| 3.1. MATERIAL VEGETAL..... | 38 |
| 3.2. CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS..... | 38 |
| 3.3. EVALUACIÓN DE LA EUA Y DISCRIMINACIÓN ISOTÓPICA... | 39 |
| 3.3.1. <u>Determinación de la EUA o <i>W</i></u> | 40 |
| 3.3.2. <u>Determinación de la discriminación isotópica del carbono</u> | 40 |
| 3.4. EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE ACUMULACIÓN DE PROLINA Y CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA..... | 41 |
| 3.4.1. <u>Acumulación de prolina</u> | 41 |
| 3.4.2. <u>Conductancia estomática</u> | 42 |

| | |
|--|----|
| 3.5. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE FLUORESCENCIA DEL PS II..... | 42 |
| 3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 43 |
| 3.6.1. <u>Eficiencia transpiratoria (W)</u> | 43 |
| 3.6.2. <u>Discriminación isotópica del carbono ($\Delta^{13}C$)</u> | 44 |
| 3.6.3. <u>Parámetros de fluorescencia del PSII</u> | 44 |
| 4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> | 45 |
| 4.1. RESPUESTA DE LA CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA AL DÉFICT HÍDRICO..... | 45 |
| 4.2. EMISION DE FLUORESCENCIA DEL FOTOSISTEMA II EN CONDICIONES DE ESTRÉS..... | 46 |
| 4.3. ACUMULACIÓN-OXIDACIÓN DE PROLINA..... | 48 |
| 4.4. EVALUACIÓN DE LA W Y DISCRIMINACIÓN ISOTÓPICA..... | 50 |
| 4.4.1. <u>Primer ensayo</u> | 50 |
| 4.4.1.1. Evaluación de la producción de biomasa..... | 50 |
| 4.4.1.2. Estimación de la transpiración, evapotranspiración y evaporación..... | 52 |
| 4.4.1.3. Eficiencia transpiratoria (W)..... | 56 |
| 4.4.1.4. Discriminación de isótopos del carbono ($\Delta^{13}C$)..... | 57 |
| 4.4.2. <u>Segundo ensayo</u> | 59 |
| 4.4.2.1. Evaluación de la producción de biomasa..... | 59 |
| 4.4.2.2. Estimación de la transpiración, evapotranspiración y evaporación..... | 60 |
| 4.4.2.3. Eficiencia transpiratoria (W)..... | 63 |
| 4.4.2.4. Discriminación de isótopos del carbono ($\Delta^{13}C$)..... | 65 |
| 4.5. RELACIONES ENTRE EUA Y DISCRIMINACIÓN ISOTÓPICA..... | 65 |
| 4.5.1. <u>Primer ensayo</u> | 65 |
| 4.5.2. <u>Segundo ensayo</u> | 67 |
| 4.6. RELACIONES ENTRE ENSAYOS Y TRATAMIENTOS..... | 69 |
| 5. <u>CONCLUSIONES</u> | 70 |
| 6. <u>RESUMEN</u> | 71 |
| 7. <u>SUMMARY</u> | 72 |
| 8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 73 |

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

| Cuadro No. | Página |
|--|--------|
| 1. Producción de forraje anual y acumulada de diferentes cultivares de Lotus..... | 8 |
| 2. Caracterización del comportamiento de cultivares de <i>L. corniculatus</i> inoculado con <i>Fusarium oxysporum</i> | 8 |
| 3. Clasificación de las estrategias de tolerancia a la sequía y sus respectivas desventajas potenciales..... | 11 |
| 4. Fraccionamiento isotópico de la fijación de CO ₂ en la fotosíntesis..... | 26 |
| 5. Discriminación isotópica del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$) de tres cultivares de <i>L. corniculatus</i> con y sin déficit hídrico..... | 32 |
| 6. Correlaciones entre EUA y $\Delta^{13}\text{C}$ y Biomasa y $\Delta^{13}\text{C}$ para diferentes especies evaluadas en diferentes condiciones..... | 35 |
| 7. Biomasa producida (g MS/maceta) por los tres genotipos..... | 51 |
| 8. Producción de biomasa por raíz, tallo y hoja inicial y final para cada genotipo y cada tratamiento..... | 51 |
| 9. Relación biomasa PA/R inicial y biomasa PA/R final para cada genotipo-tratamiento..... | 52 |
| 10. Agua transpirada acumulada y evapotranspiración para cada genotipo-tratamiento y para cada tratamiento..... | 53 |
| 11. <i>W</i> para cada genotipo-tratamiento..... | 56 |
| 12. Discriminación isotópica al inicio para cada genotipo y al final para cada genotipo-tratamiento..... | 58 |
| 13. Biomasa producida (g MS/maceta) por tres genotipos..... | 59 |
| 14. Producción de biomasa de raíz, tallo y hoja inicial, y final para cada genotipo y cada tratamiento (g/maceta)..... | 60 |

| | |
|---|----|
| 15. Relación biomasa PA/R inicial y biomasa PA/R final para cada genotipo-tratamiento..... | 60 |
| 16. Agua transpirada acumulada y evapotranspiración para cada genotipo-tratamiento y para cada tratamiento..... | 61 |
| 17. Valores de evaporación para cada tratamiento..... | 63 |
| 18. W para cada genotipo-tratamiento..... | 64 |
| 19. Discriminación isotópica al inicio para cada genotipo y al final para cada genotipo-tratamiento..... | 65 |
| 20. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre W y $\Delta^{13}\text{C}$ para los dos tratamientos y para cada genotipo-tratamiento (primer ensayo).. | 67 |
| 21. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre W y $\Delta^{13}\text{C}$ para los dos tratamientos y para cada genotipo-tratamiento (segundo ensayo)..... | 68 |
| 22. Discriminación isotópica para cada genotipo-tratamiento-ensayo y ranking entre genotipos..... | 69 |

Figura No.

| | |
|---|----|
| 1. Países con más de 100 mil hectáreas sembradas con <i>Lotus</i> spp..... | 3 |
| 2. Rendimiento de parte aérea (g PV/planta) de <i>L. corniculatus</i> para primer crecimiento y primer rebrote bajo condiciones de déficit hídrico..... | 9 |
| 3. Rendimiento de parte aérea (g PV/planta) de <i>L. corniculatus</i> para primer y segundo rebrote bajo condiciones de déficit hídrico..... | 10 |
| 4. Esquema de un estoma..... | 12 |
| 5. Vía de circulación del agua y CO_2 a través de estomas en una condición determinada: fotosíntesis activa y humedad relativa baja..... | 14 |

| | |
|--|----|
| 6. Puntos de resistencia a la difusión de CO ₂ desde el exterior de la hoja hasta los cloroplastos..... | 14 |
| 7. Cambios en la conductancia estomática en respuesta a déficit hídrico de tres genotipos de <i>Lotus</i> spp..... | 15 |
| 8. Efecto Kautsky, emisión de fluorescencia desde hojas adaptadas a la oscuridad..... | 16 |
| 9. Rendimiento en grano (t/ha) en función del uso de agua (con riego) en cebada y trigo..... | 22 |
| 10. Esquema del Ciclo de Calvin..... | 27 |
| 11. Relación entre la discriminación de isótopos del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$) y c_i/c_a | 30 |
| 12. Relación entre $\Delta^{13}\text{C}$ y EUA para diferentes genotipos de <i>Leymus angustus</i> en dos niveles hídricos contrastantes..... | 33 |
| 13. Evolución de la conductancia estomática de tres genotipos de Lotus. | 45 |
| 14. Relación F_v/F_m de tres genotipos de Lotus sometidos a déficit hídrico a temperaturas de 27°C y 37°C, y en las mismas temperaturas a 100% capacidad de campo (100% CC)..... | 47 |
| 15. Evolución de la acumulación de prolina en hojas (A) y raíces (B) de tres genotipos de Lotus..... | 49 |
| 16. Índice hídrico de tres genotipos de Lotus en los primeros 4 días después de privados de riego..... | 50 |
| 17. Evolución de la evapotranspiración para los tres genotipos en los dos tratamientos (50 y 100% CC)..... | 54 |
| 18. Evolución de la evapotranspiración de los tres genotipos en el tratamiento 50 %CC..... | 55 |
| 19. Evolución de la evapotranspiración de la línea Tolerante en cada tratamiento (50 y 100% CC)..... | 55 |

| | |
|--|----|
| 20. Evolución de la evapotranspiración de los tres genotipos en el tratamiento 100% CC..... | 62 |
| 21. Evolución de la evapotranspiración de los tres genotipos en el tratamiento 50% CC..... | 63 |
| 22. Relación entre W y discriminación isotópica para los tres genotipos y los dos tratamientos en el primer ensayo..... | 66 |
| 23. Relación entre W y discriminación isotópica para los tres genotipos y los dos tratamientos en el segundo ensayo..... | 68 |

1. INTRODUCCIÓN

Una de las principales fuentes de proteína de la dieta humana es de origen animal. La producción de carne vacuna y ovina se sustenta en pasturas naturales, sembradas o en base a suplementación a corral (feedlot). Las pasturas sembradas pueden ser monoespecíficas o pueden constituir mezclas ultra simples, simples o complejas de diferentes especies de una misma familia botánica o de diferentes familias botánicas. Dentro de éste último grupo se destaca las mezclas conformadas por gramíneas y leguminosas.

Las leguminosas forrajeras han sido ampliamente difundidas en el mundo debido a la importancia agronómica que poseen. Las especies de esta familia botánica constituyen un componente imprescindible de las pasturas, debido por un lado, a la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico a través de la asociación simbiótica con bacterias denominadas genéricamente rizobios, y por otro, a su alto valor nutritivo.

Una alternativa generalizada en el Uruguay, y en varios países de Sudamérica, es el mejoramiento de campo natural mediante la incorporación de leguminosas y fertilización fosfatada. Este sistema permite aumentar en forma considerable la producción de forraje de la pastura natural a través del aumento de la fertilidad del suelo debido a la incorporación de nitrógeno vía fijación biológica de nitrógeno (FBN) realizada por leguminosas noduladas, y de fósforo incorporado por fertilización fosfatada. Este método parece ser una herramienta de aproximación al desarrollo sostenible de la producción agropecuaria.

Dentro de las diferentes alternativas forrajeras mencionadas el género *Lotus*, perteneciente a la familia de las leguminosas, presenta particular importancia agronómica. Entre las características favorables de este género se destaca: alta tolerancia a suelos de baja fertilidad (principalmente bajos niveles de fósforo), condiciones extremas de humedad (excesos o déficit) y niveles elevados de acidez. Estas situaciones se presentan en gran parte de las áreas destinadas a la ganadería extensiva. Las especies domesticadas de este género poseen, además de un elevado valor nutritivo comparable al de las otras leguminosas de importancia agronómica, la ventaja de que no producen meteorismo, debido a la presencia de taninos condensados.

Lotus corniculatus L., *Lotus glaber* Mill. (*L. tenuis* Waldst. & Kit. ex Willd.), *Lotus uliginosus* Schkuhr. (*L. pedunculatus* Cav.) y *Lotus subbiflorus* Lag. son las cuatro especies domesticadas del género con importancia agronómica. El área sembrada en nuestro país con estas cuatro especies es de 1.250.000 hectáreas (Díaz et al., 2005c), lo que lo hace el género de

leguminosas de mayor importancia en el ámbito nacional. Dentro de este género la especie *L. corniculatus* se destaca por el área que ocupa a nivel mundial y en nuestro país con más de 300.000 ha (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2000).

L. corniculatus es una leguminosa perenne estival, de metabolismo C_3 que presenta destacada resistencia a la sequía, alto valor nutritivo y elevada persistencia, lo que la hacen altamente recomendable para incluirla en mezclas forrajeras y para utilizarla en el mejoramiento de campo natural. Si bien esta especie es considerada de elevada persistencia dentro de las leguminosas, una de las limitantes más frecuentes de éstas, y de *Lotus* spp. en particular, es su baja persistencia (García 1992, Altier 1997).

En general, para la mayoría de nuestros sistemas de producción, es altamente deseable que las leguminosas posean una mayor persistencia. Los factores climáticos que parecen afectar más el crecimiento y persistencia de las leguminosas son los déficit y excesos hídricos, así como las altas temperaturas (García, 1992).

Dentro de la problemática planteada es que se presenta esta tesis, cuyo objetivo general es evaluar marcadores funcionales que puedan ser usados como herramienta en programas de mejoramiento genético de *Lotus corniculatus*. En dos selecciones divergentes de *Lotus corniculatus*, contrastantes en su comportamiento productivo en condiciones de déficit hídrico, se plantean como objetivos específicos:

- a) Evaluar las respuestas de tolerancia-sensibilidad a déficit hídrico a través de parámetros fisiológicos (conductancia estomática, eficiencia en el uso del agua y discriminación isotópica del ^{13}C) y bioquímicos (acumulación de prolina y el estado del fotosistema II).
- b) Establecer entre los parámetros evaluados el más promisorio para ser usado como indicador de tolerancia-sensibilidad a déficit hídrico.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. EL GÉNERO *Lotus*

El género *Lotus* comprende aproximadamente unas 100 a 120 especies en todo el mundo y tiene dos centros de origen principales, uno en la región mediterránea hacia la zona desértica de África y áreas templadas de Asia, donde se encuentran mejor representadas las especies de importancia agronómica, y otro en la zona oeste de América del Norte (Izaguirre y Beyhaut, 1998).

Lotus corniculatus L., *Lotus glaber* Mill. (*L. tenuis* Waldst. & Kit. ex Willd.), *Lotus uliginosus* Schkuhr. (*L. pedunculatus* Cav.) y *Lotus subbiflorus* Lag. son las cuatro especies que poseen importancia agronómica y están distribuidas ampliamente en todo el mundo (Figura 1) (Díaz et al., 2005c). De éstas la única que no es perenne es *Lotus subbiflorus*, la cual es sembrada principalmente en América del Sur (Díaz et al., 2005c).



Figura 1. Países con más de 100 mil hectáreas sembradas con *Lotus* spp. El número debajo del nombre del país indica el área sembrada en miles de hectáreas (Díaz et al., 2005c).

Las especies de este género presentan una destacable tolerancia a suelos de baja fertilidad, especialmente bajos niveles de fósforo, condiciones extremas de humedad (drenaje pobre o sequía) y niveles elevados de acidez (Carámbula, 1996). Estas situaciones se presentan en gran parte de los suelos del Uruguay, en especial aquellos destinados a la ganadería extensiva. A pesar de que las especies de este género son capaces de tolerar niveles elevados de

acidez (pH 4,5-5,2) el proceso de fijación biológica de nitrógeno alcanza su máximo en el rango de pH de 6,0 a 6,5 (Carámbula, 2002).

Estudios llevados a cabo por varios autores demuestran la gran importancia de disponer de cultivares de *Lotus* spp. adaptados a cada región, para alcanzar con ellos una alta performance animal sin necesidad de recurrir a mezclas con trébol blanco (*Trifolium repens* L.), con mayor requerimiento de fósforo, a gramíneas puras, con elevados requerimientos de nitrógeno y fósforo (Carámbula, 2002) o a las mezclas con alfalfa (*Medicago sativa* L.), que tienen los mayores requerimientos de fósforo.

Otra de las ventajas importantes de este género es la presencia de taninos condensados, los cuales inhiben la producción de espuma estable causante de meteorismo, a través de la protección de las proteínas solubles durante la digestión ruminal (Carámbula, 1996). A pesar de ello, existen posibles efectos negativos debido a altas concentraciones de taninos condensados que reducen la digestibilidad de los carbohidratos (fibra) a nivel ruminal y el consumo voluntario por reducción de la palatabilidad (Montossi, 1996). Sin embargo el balance parece ser, en la mayoría de los casos, positivo (Montossi, 1996).

Como desventajas principales del género se mencionan el lento crecimiento inicial, lo que coloca a las plántulas en condiciones similares a las gramíneas, así como la susceptibilidad al mal manejo del pastoreo (Carámbula, 2002). También existen desventajas importantes en la producción de semillas, debido a la maduración despereja de las vainas y al desgrane, que ocurre en condiciones de alta temperatura y baja humedad relativa durante el verano.

2.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Lotus corniculatus* L.

Lotus corniculatus (de ahora en adelante Lotus) es sin duda la especie con mayor importancia agronómica y la que posee mayor distribución mundial (Díaz et al., 2005c). Es una especie nativa de toda Europa y de regiones de Asia, como Crimea, Cáucaso, Asia Central, Irán e India que ha sido introducida con éxito en muchas áreas de Australia, Estados Unidos y Sudamérica (Argentina, Chile, Brasil y Uruguay) (Izaguirre y Beyhaut, 1998).

Esta especie es considerada resistente a la sequía, persistente y con alto valor nutritivo (heno comparable al de alfalfa y forraje verde al de trébol blanco) lo que la hace recomendable para ser incluida en mezclas forrajeras (Carámbula, 1977).

Según Carámbula (2002), las características principales de Lotus son:

- Perenne estival.
- Adaptación a un amplio rango de suelos.
- Bajo vigor inicial, lento establecimiento.
- Sistema radicular pivotante y profundo.
- Buen potencial de producción primavera-estivo-otoñal con posibilidades de producción a fines de invierno en cultivares tempranos.
- Elevado valor nutritivo que disminuye en verano con la madurez.
- Densidad de siembra 10 -12 kg/ha (puro) y 4 -10 (mezcla).
- No admite pastoreos intensos y frecuentes.
- Susceptible a enfermedades de raíz y corona.
- Resiembra natural problemática.

Existen básicamente dos formas mediante las cuales las leguminosas forrajeras pueden persistir, una es por persistencia de la planta original y otra por resiembra e instalación de nuevas plantas (García, 1992). En Lotus, la persistencia depende en buena medida de la perennidad de la planta original, ya que la resiembra natural es bastante errática (García, 1992).

El clima de Uruguay es subtropical, templado y húmedo. A pesar de que la distribución de las precipitaciones pertenecen a un régimen isohigro (distribución relativamente homogénea a lo largo del año) las mismas se caracterizan por su extremada irregularidad y variabilidad entre años. Debido a esto, el estrés por sequía puede ocurrir en cualquier época del año, lo que afecta de forma considerable el proceso de resiembra de Lotus y otras leguminosas (García, 1992). Los factores climáticos que parecen afectar más el crecimiento y persistencia de las leguminosas en el Uruguay son los déficit y excesos hídricos y las altas temperaturas (García, 1992). En situaciones de déficit hídrico, y cuando la transpiración es mayor que la absorción de agua, se produce el estrés, que afecta la fisiología y el crecimiento de las plantas (García, 1992). El déficit hídrico puede provocar el cierre estomático, reduciéndose así la transpiración, con un aumento de la temperatura foliar.

Si bien esta especie es considerada de larga vida, una de sus limitantes más frecuentes es su baja persistencia (Altier, 1997). Trabajos realizados por Formoso (1993) muestran una marcada declinación productiva en cultivos de Lotus luego del segundo verano. Esta situación es consecuencia de la interacción de factores abióticos (climáticos, edáficos y de manejo) y bióticos (enfermedades, plagas y malezas) que resultan en una carga acumulativa de estreses a lo largo de la vida del cultivo (Altier, 1997).

2.2.1. El cultivar San Gabriel

El cultivar San Gabriel, originario de Brasil, fue introducido al Uruguay hace más de 40 años (Formoso, 1993). Este cultivar constituye actualmente una de las variedades de Lotus más adaptadas a las condiciones de Uruguay, y es la más difundida a nivel productivo.

En nuestro país el cultivar San Gabriel se caracteriza por producir forraje de forma continua durante todo el año, sin períodos de latencia. De todas formas, durante el invierno tiene el menor potencial de producción de forraje, probablemente por la ocurrencia de temperaturas infra-óptimas, además de otros factores (Formoso, 1993). A partir del segundo año, en el que se da la mayor producción de forraje, ésta disminuye progresivamente con el aumento de la edad, principalmente por la importante pérdida de plantas (Formoso, 1993). Esto es consecuencia de lesiones en raíz y corona, provocadas por diversos organismos, como hongos, nematodos, etc. (Formoso, 1993). Esta diversidad de patógenos, conocida como “complejo de enfermedades”, en interacción con los factores ambientales causan el debilitamiento y la muerte de plantas (Altier, 1997). Ensayos realizados en INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay) con el cultivar Estanzuela Ganador, de características similares a San Gabriel, mostraron que la aplicación de fungicidas, y de fungicidas-insecticidas-nematicidas, incrementaron 25% y 33% la producción anual de materia seca en el tercer año, en comparación con el testigo sin proteger, respectivamente. Así, quedó en evidencia como incide el complejo de enfermedades sobre la producción de biomasa de Lotus. También se demostró que la aplicación de fungicidas fue más efectiva en el control de enfermedades de tallo y hoja, y menor sobre enfermedades de raíz y corona, las que inciden principalmente en la persistencia de las plantas (Altier, 1997). Altier (1997) indica que si bien las enfermedades de tallo y hoja limitan la producción de forraje, las enfermedades de raíz y corona tienen un mayor impacto en la productividad, reduciendo de forma significativa la persistencia. Los principales patógenos asociados al marchitamiento y podredumbre de raíz y corona pertenecen al género *Fusarium* spp. (72% de incidencia) dentro del cual se destacó la especie *F. oxysporum* (54% de incidencia) (Altier, 1997). Resultados similares fueron obtenidos en el litoral oeste de Uruguay y en la provincia Argentina de Entre Ríos, los cuales indican que la prevalencia de *Fusarium* spp. asociado a enfermedades de raíz y corona es superior a 80% (Altier, 1997).

2.2.2. El cultivar INIA Draco

El objetivo principal del programa de mejoramiento genético de INIA La Estanzuela en Lotus, ha sido mejorar la persistencia productiva de la especie manteniendo el ciclo de crecimiento estacional y la capacidad de producción de semillas similares a los cultivares Estanzuela Ganador y San Gabriel (Rebuffo y Altier, 1996). Rebuffo y Altier (1996) establecieron como objetivo alcanzable en el mediano plazo el aumento de la producción en el tercer año y la prolongación de la vida útil de la pradera en un año. Como resultado de dicho programa se liberó en el año 1999 el cultivar INIA Draco, utilizando para su generación una variedad criolla y el cultivar Estanzuela Ganador como materiales parentales. La selección se realizó por persistencia a campo (Rebuffo et al., 2005). Su mayor persistencia productiva es producto de la combinación de características morfológicas y de tolerancia a enfermedades (Altier et al. 2000, Rebuffo et al. 2005). La ventaja comparativa en la producción de forraje de INIA Draco sobre San Gabriel se observa en años adversos, 61% en años adversos y 9% en años normales (Rebuffo et al., 2005). La mayor adaptación de este cultivar se ha reflejado en mayor tolerancia a sequías, aun cuando las mismas hayan sido extremas. Por otro lado evaluaciones en el marco del Programa Nacional de Evaluación de Cultivares (Convenio INASE-INIA) durante 8 a 10 años indican diferencias significativas en producción total entre los cultivares INIA Draco y San Gabriel (12% de superioridad de INIA Draco) y entre INIA Draco y E. Ganador (10% de superioridad de INIA Draco) así como diferencias significativas en el tercer año de producción (Cuadro 1). En relación al comportamiento sanitario, las evaluaciones realizadas por Altier et al. (2000) muestran que el cultivar INIA Draco tiene mejor comportamiento sanitario frente a *Fusarium oxysporum*, con diferencias significativas en podredumbre interna e índice de severidad en comparación al cultivar San Gabriel (Cuadro 2).

Cuadro 1. Producción de forraje anual y acumulada de diferentes cultivares de Lotus. (Fuente: adaptado de Castro y Vilaró, 2002).

| Cultivar | 1er. AÑO 2002 | | 2do. AÑO 2003 | | 3er. AÑO 2004 | | TOTAL 3 AÑOS 1-14 | |
|------------------------------------|------------------|------------|------------------|------------|------------------|------------|----------------------|------------|
| | 1-2 | | 3-8 | | 9-14 | | KgMS/Ha | % |
| E. GANADOR | 4673 | 98 | 12919 | 101 | 9000 | 127 | 26592 | 108 |
| INIA DRACO | 3281 | 69 | 13234 | 103 | 9447 | 134 | 25962 | 105 |
| SAN GABRIEL (T) | 4770 | 100 | 12821 | 100 | 7067 | 100 | 24658 | 100 |
| Base 100: SAN GABRIEL (KgMS/Ha) | 4770 | | 12821 | | 7067 | | 24658 | |
| Media del ensayo (KgMS/Ha) | 3076 | | 12011 | | 8200 | | 23287 | |
| DMS 5% | 375 | | 1685 | | 957 | | 2129 | |

Cuadro 2. Caracterización del comportamiento de cultivares de *L. corniculatus* inoculado con *Fusarium oxysporum*. (Fuente: adaptado de Altier et al., 2000).

| Cultivar | PI* | DV* | IS* | % PR* |
|-------------|------|-----|------|-------|
| SAN GABRIEL | 15.4 | 3.2 | 1.52 | 17.1 |
| E. GANADOR | 13.0 | 3.0 | 1.31 | 29.4 |
| INIA DRACO | 6.6 | 2.3 | 0.97 | 35.4 |
| LSD 5% | 6.8 | 1.2 | 0.48 | 20.4 |

*PI, podredumbre interna; DV, decoloración vertical (largo sobre el sitio de inoculación), IS, índice de severidad (0 sin enfermedad, 1 podredumbre o decoloración leve, 2 moderada, 3 severa, 4 casi o completamente muerta), %PR, % de plantas resistentes.

2.2.3. Selección de líneas Tolerante y Sensible de Lotus

La selección por tolerancia a estrés hídrico enfrenta severas restricciones en la diagramación de programas de mejoramiento que logren progresos significativos en cada generación, debido a que la misma es una característica compleja (Messa et al., 2007).

En el marco del Proyecto LOTASSA (FP6-2003-INCO-DEV2 PL-517617) se desarrollaron por selección divergente dos líneas contrastantes de Lotus (Messa et al., 2007). El procedimiento de selección consistió en hacer crecer las plantas en macetas con un nivel hídrico de 70% de capacidad de campo durante el primer mes, con el objetivo de obtener plántulas vigorosas, y luego someterlas a un régimen hídrico de 40% de capacidad de campo (considerado como nivel de déficit hídrico suficiente). Se realizaron mediciones de rendimiento de forraje verde en 3 cortes. Dentro del conjunto de plantas con

buen desarrollo inicial (primer corte) se seleccionaron las tolerantes y sensibles, considerando los rendimientos extremos en los dos rebrotes evaluados durante el período de déficit hídrico. Los conjuntos seleccionados como tolerantes y sensibles fueron similares en el rendimiento inicial (6,56 y 6,23 g de peso verde (PV)/planta, respectivamente) pero se diferenciaron marcadamente en los rebrotes (Figura 2). La diferencia promedio entre ambos grupos fue de 2.5 g PV/planta en el primer rebrote (tolerantes con 6,21 g y sensibles con 3,71 g), mientras que la diferencia en el segundo rebrote se redujo a 1,66 g PV/planta al observarse una reducción general en los rendimientos (tolerantes 3,74 respecto a sensibles 2,08) (Figura 3). Además del déficit hídrico, las plantas estuvieron sometidas a estrés térmico, ya que la temperatura dentro del invernáculo en el cual se realizó la selección llegó en algunos momentos a 50 °C¹.

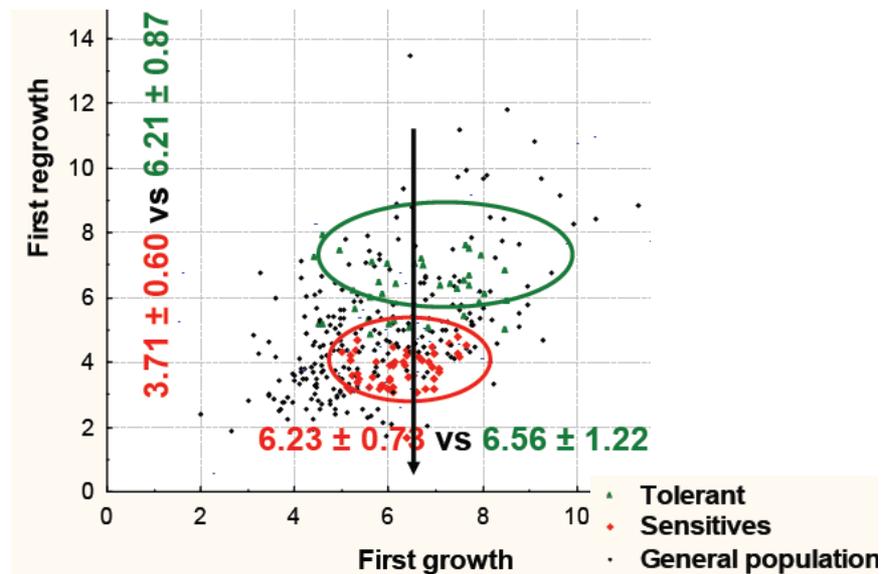


Figura 2. Rendimiento de parte aérea (g PV/planta) de *L. corniculatus* para primer crecimiento y primer rebrote bajo condiciones de déficit hídrico. (Fuente: Rebuffo, 2007).

¹ Rebuffo, M. 2008. Com. personal.

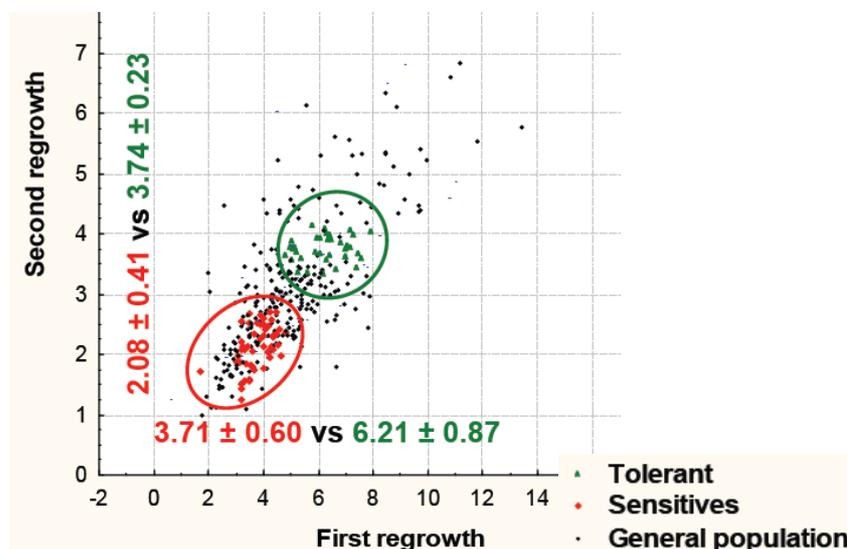


Figura 3. Rendimiento de parte aérea (g PV/planta) de *L. corniculatus* para primer y segundo rebrote bajo condiciones de déficit hídrico. (Fuente: Rebuffo, 2007).

2.3. MARCADORES BIOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS ASOCIADOS A DÉFICIT HÍDRICO

El estrés es usualmente definido como un factor externo que ejerce influencias negativas sobre las plantas y la tolerancia como la capacidad de las mismas de sobreponerse a un ambiente desfavorable (Taiz y Zeiger, 2006).

En relación a la tolerancia a la sequía, las plantas desarrollan estrategias anatómicas y morfológicas como sistemas radiculares ramificados, presencia de cutícula gruesa en hojas y tallos, así como distintas respuestas de tipo metabólico (Díaz et al., 2005d), algunas de las cuales serán motivo de evaluación en esta tesis como marcadores funcionales frente a situaciones de déficit hídrico.

A medida que transcurre el déficit hídrico, se desencadenan una serie de mecanismos bioquímicos y fisiológicos necesarios para proteger procesos como la respiración celular, fotosíntesis y transporte de nutrientes. La sequía, salinidad y bajas temperaturas extremas generan ajustes metabólicos comunes, debido a que en todos ocurre una disminución de la actividad del agua dentro de la célula (Díaz et al., 2005b).

Según Jones (2004), todas las estrategias que tienden a mantener la sobrevivencia de la planta o su productividad, en condiciones de restricción

hídrica en el suelo o alta demanda atmosférica, pueden ser consideradas *mecanismos de tolerancia a la sequía* (Cuadro 3). Es importante destacar que los mecanismos que actúan sobre la conservación del agua, en principio reducen la fotosíntesis, y por lo tanto la productividad neta. Esto se debe a que el estoma es la vía de ingreso de CO₂ y la principal ruta de pérdida de agua por transpiración. El cuadro 3 muestra como la elevada eficiencia en el uso del agua (EUA) es un mecanismo de tolerancia a la sequía y que generalmente se relaciona con una baja productividad de biomasa.

Cuadro 3. Clasificación de las estrategias de tolerancia a la sequía y sus respectivas desventajas potenciales. (Fuente: adaptado de Jones, 2004).

| Estrategia | Desventajas potenciales |
|---|--|
| 1. Evitar el déficit hídricos | |
| a. Escape a la sequía: ciclo de vida corto, dormancia -latencia- en la estación seca. | Ciclos cortos y por lo tanto limitada producción de biomasa total |
| b. Conservación del agua: hojas pequeñas, reducida área foliar, cierre estomático, baja conductancia cuticular, baja absorción de luz | En los sistemas naturales puede favorecer los competidores debido a que utilizan el agua previamente en sistemas agrícolas puede restringir la productividad |
| c. Maximizar el consumo de agua: extenso sistema radicular | Costo estructural, reducción del área fotosintética o la producción de semilla |
| 2. Tolerancia al déficit hídrico | |
| a. Mantenimiento de la turgencia: adaptación osmótica | Costo metabólico |
| b. Solutos de protección, enzimas tolerantes a la desecación | Costo metabólico |
| 3. Mecanismos de eficiencia | |
| a. Elevada EUA | Usualmente asociado con baja productividad |
| b. Eficiencia en el uso del agua disponible | Bajas tasa de crecimiento que pueden favorecer a los competidores |
| c. Maximizar el índice de cosecha | Desconocido |

En términos generales las estrategias de las plantas para evitar los efectos perjudiciales de la sequía se pueden clasificar de la siguiente forma:

- *Escape a la sequía*: plantas anuales de ciclos cortos que desarrollan su ciclo de vida exclusivamente en el período en el que hay disponibilidad de agua en el suelo (Díaz et al., 2005b).
- *Tolerancia a la sequía*: plantas que desarrollan mecanismos que incrementan la tolerancia a la sequía porque limitan y controlan el déficit hídrico o sus consecuencias (Díaz et al. 2005b, Taiz y Zeiger 2006).

El género *Lotus* incluye especies y cultivares que muestran un amplio rango de adaptación a condiciones edáficas desfavorables, como baja fertilidad,

bajo pH, elevado contenido de aluminio, etc., mayor que los tréboles (*Trifolium* spp.) y que la alfalfa (*Medicago sativa*) (Wheeler et al., 1992). Sin embargo, no está bien adaptado a altas temperaturas, salinidad o sequía (Blumenthal y McGraw, 1999). Según Díaz et al. (2005b), dado que las regiones de origen de *Lotus* spp. y a las zonas donde se siembra corresponden en general a ambientes templados y húmedos, las especies perennes de este género mostrarían mecanismos de *tolerancia a la sequía* más que de *escape* a la misma.

Asociado a los mecanismos de tolerancia mencionados se han encontrado marcadores bioquímicos y fisiológicos que podrán explicar el comportamiento de diferentes genotipos frente al déficit hídrico. En el marco de esta tesis se definieron como posibles marcadores bioquímicos el estado del fotosistema II y acumulación de prolina, y como marcadores fisiológicos la conductancia estomática, eficiencia en el uso del agua (EUA) y discriminación isotópica del ^{13}C ($\Delta^{13}\text{C}$).

El estado del fotosistema II en respuesta a condiciones de estrés hídrico y térmico ha sido evaluado en especies de *Lotus* spp. en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Agronomía (Borsani et al. 2006, Borsani et al. 2007, Ferrés 2008), así como también la acumulación de prolina ha sido extensamente estudiada en los últimos 10 años (Borsani 1999, Díaz 2005a, Borsani et al. 2006, Borsani et al. 2007, Ferrés, 2008). En este contexto es que se decidió para esta tesis hacer mayor énfasis en marcadores menos estudiados, como la EUA y $\Delta^{13}\text{C}$, que están directamente relacionados al fenotipo en estudio.

2.3.1. Conductancia estomática, difusión de CO_2 y agua

La **conductancia estomática** (g_s) corresponde al flujo de agua y CO_2 hacia adentro y afuera de la hoja a través del estoma (Figura 4) (Taiz y Zeiger, 2006), y también se la define como la inversa de la resistencia estomática ($1/r_s$).

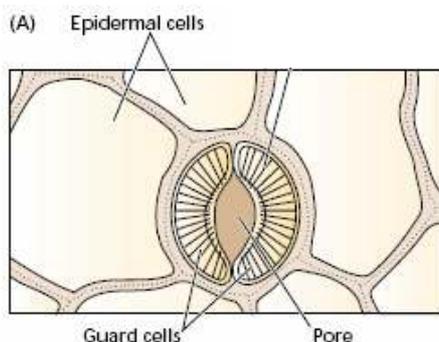


Figura 4. Esquema de un estoma. Se indican las células oclusivas (*Guard cells*), ostiolo (*Pore*) y células acompañantes (*Epidermal cells*). (Fuente: adaptado de Taiz y Zeiger, 2006).

La **resistencia estomática** (r_s) es regulada por el cierre y la apertura del estoma por acción de las células oclusivas (Figura 4). Los cambios en la resistencia estomática regulan la pérdida de agua de la planta y controlan el ingreso de CO_2 necesario para la fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 2006). De esta forma están relacionados inversamente dos procesos, el ingreso de CO_2 desde la atmósfera y la pérdida de agua desde las hojas, dado que ambos comparten la misma vía de circulación: el estoma (Figura 5). Este es un problema complejo porque el gradiente de concentración para el ingreso de CO_2 es, en términos generales, unas 50 veces menor que el gradiente de concentración de la salida de agua. Cuando el agua no es limitante, la regulación temporal de la apertura estomática determina que se encuentren abiertos durante el día y cerrados durante la noche, período en el cual no se realiza fotosíntesis y por lo tanto no hay demanda de CO_2 (Taiz y Zeiger, 2006). Por otro lado, cuando se dan condiciones de alta radiación solar incidente y elevada disponibilidad de agua la actividad fotosintética se ve favorecida, aumenta la demanda de CO_2 y también aumenta la apertura estomática, disminuyendo la resistencia estomática. En este caso la pérdida de agua por transpiración es elevada, pero como la disponibilidad de agua es suficiente, la fotosíntesis se ve favorecida y también el crecimiento. Con baja disponibilidad de agua, los estomas estarán menos abiertos, o permanecerán cerrados aunque existan condiciones de alta radiación solar. El mantenimiento de los estomas cerrados en condiciones de baja disponibilidad hídrica, es un mecanismo de protección contra la deshidratación (Cuadro 3).

Los **movimientos de agua** hacia el espacio intercelular, luego de que la misma se evapora de la superficie de la célula, se dan principalmente por difusión (Taiz y Zeiger, 2006). Ha sido estimado que sólo un 5% de la pérdida de agua desde las hojas se da a través de la cutícula, debido a que la misma es básicamente impermeable (Taiz y Zeiger, 2006), con lo cual la mayor pérdida de agua se da por difusión a través de los estomas (Figura 5), que son más abundantes en la cara abaxial de la hoja.

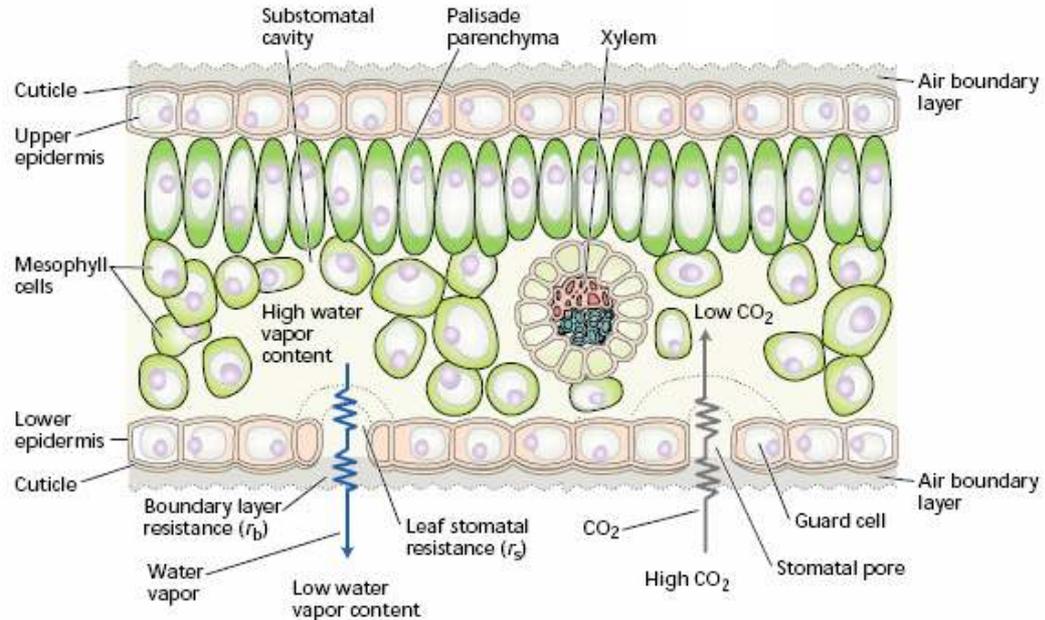


Figura 5. Vía de circulación del agua y CO_2 a través de estomas en una condición determinada: fotosíntesis activa y humedad relativa baja. (Fuente: Taiz y Zeiger, 2006).

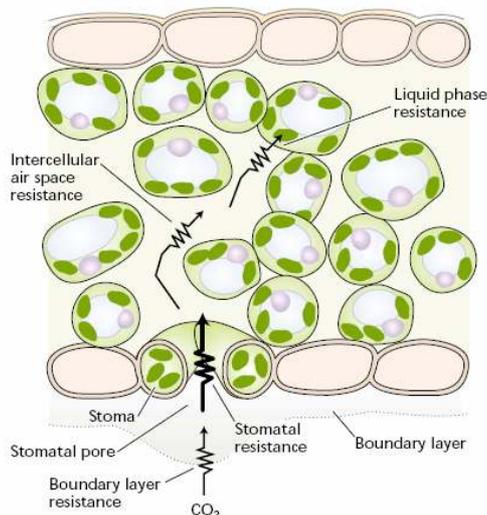


Figura 6. Puntos de resistencia a la difusión de CO_2 desde el exterior de la hoja hasta los cloroplastos (Fuente: Taiz y Zeiger, 2006).

La transpiración desde la hoja depende de dos factores: (i) la diferencia de concentración de vapor de agua entre los espacios de aire de la hoja y el aire exterior y (ii) la resistencia a la difusión (r) (Taiz y Zeiger, 2006). La difusión del CO_2 enfrenta varios puntos de resistencia antes de alcanzar los cloroplastos (Figura 6). En primer lugar se encuentra la resistencia de la capa límite (r_b), luego la resistencia estomática (r_s), seguido por la resistencia del aire en el espacio intercelular y por último la resistencia de la fase líquida intracelular.

El mayor punto de resistencia a la difusión del CO_2 lo constituye el estoma (r_s) (Taiz y Zeiger, 2006). La magnitud de la resistencia de la capa límite

disminuye con el aumento del tamaño de las hojas y la velocidad del viento. Hojas pequeñas tienen baja resistencia de la capa límite para la difusión del CO_2 y el agua. En condiciones normales la resistencia de la capa límite es mucho menor que la resistencia estomática, la cual, como se dijo, constituye la principal imposición a la difusión del CO_2 . La tercera resistencia, dada por los espacios de aire intercelular, es usualmente pequeña. Por último, se encuentra la resistencia de la fase líquida, que corresponde a la resistencia a la difusión del CO_2 en el intracelular. Esta resistencia ha sido estimada como un décimo de las resistencias de la capa límite (r_b) y de la estomática (r_s) combinadas, cuando el estoma está completamente abierto (Taiz y Zeiger, 2006). Este bajo valor de resistencia puede ser atribuido a que los cloroplastos se ubican en la periferia de las células, lo que minimiza la distancia de difusión.

Evaluaciones de conductancia estomática realizadas por Borsani et al. (2006) indican que existe una caída importante de la misma a valores cercanos a $0 \text{ mmol/m}^2\text{s}$ en genotipos de *Lotus* spp. luego de cuatro días de impuesto el déficit hídrico, en las condiciones de ensayo definidas en esa evaluación (Figura 7).

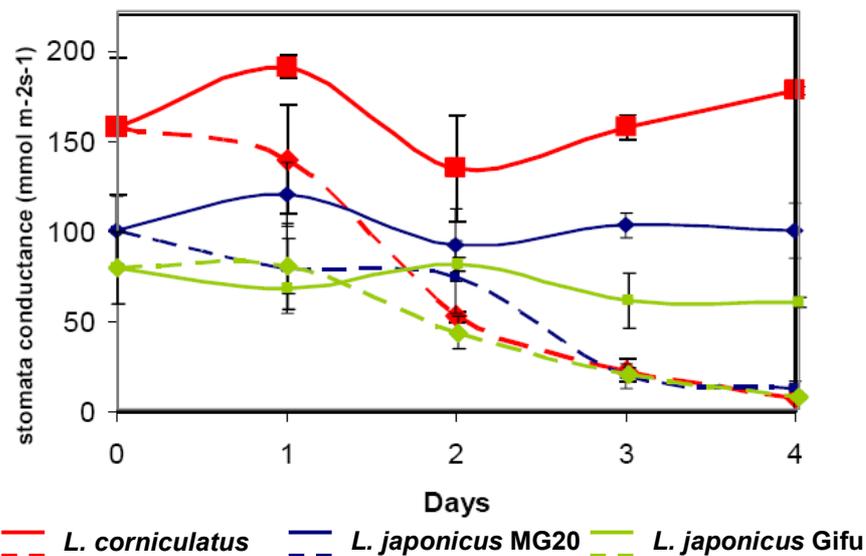


Figura 7. Cambios en la conductancia estomática en respuesta a déficit hídrico de *Lotus corniculatus* cv San Gabriel y *Lotus japonicus* ecotipos MG20 y Gifu (la línea completa representa el control y la punteada el tratamiento de déficit hídrico). (Fuente: Borsani et al., 2006).

2.3.2. Fluorescencia del fotosistema II (PSII)

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 está determinada por el estado fisiológico, es utilizada como un indicador de tolerancia-sensibilidad de las plantas a diferentes tipos de 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). La emisión de fluorescencia por el PS II es una vía minoritaria como forma de disipar energía respecto a 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.

Al transferir una hoja de la oscuridad a la luz, ocurre un incremento en la emisión de fluorescencia, fenómeno conocido como “efecto Kautsky” (Kautsky 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 8).

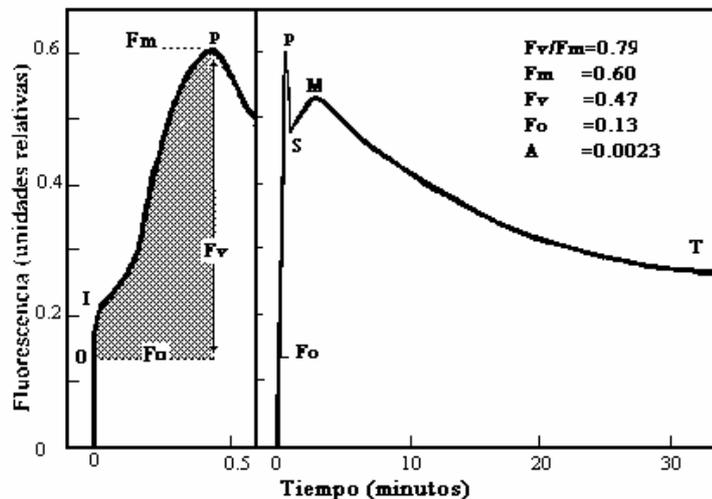


Figura 8. Efecto Kautsky, emisión de fluorescencia de hojas adaptadas a la oscuridad. F_o : fluorescencia mínima, F_m : fluorescencia máxima, F_v : fluorescencia variable (= $F_m - F_o$). (Fuente: Kautsky et al., 1960).

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 en diferentes especies de plantas, si se lo determina en condiciones controladas. Para especies del género *Lotus* la relación F_v/F_m , en condiciones normales, se encuentra entre 0,85 y 0,87, y la misma se reduce en plantas estresadas o dañadas a valores cercanos a 0,80 (Borsani et al., 2007).

De todas formas, la funcionalidad del fotosistema II en *Lotus spp.* y trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) en respuesta a sequía no parece estar asociada a la magnitud del estrés, y la misma es muy variable entre genotipos (Borsani et al., 2008), por esto, este parámetro no parece ser un buen indicador de tolerancia-sensibilidad al déficit hídrico para estas especies.

2.3.3. Acumulación de prolina

La acumulación del iminoácido prolina es una respuesta común de diferentes organismos sometidos a diferentes tipos de estrés. En particular, la acumulación de este iminoácido en respuesta a déficit hídrico es un hecho general en vegetales, y en *Lotus spp.* ocurre a partir de síntesis *de novo* (Díaz et al., 2005d). Si bien no se ha establecido la función de la prolina en plantas sometidas a déficit hídrico, es posible que la misma esté relacionada con el mantenimiento del potencial osmótico celular, la defensa antioxidante, la reserva de C y N y como regulador de la expresión génica (Díaz, 2005d).

Para leguminosas como *Lotus* y trébol rojo esta molécula es un buen indicador inicial o primario del déficit hídrico, y su acumulación comienza con variaciones muy bajas del contenido de agua celular, antes que otras respuestas fisiológicas o bioquímicas ocurran (Borsani et al., 2008). De esta forma, si bien es una respuesta a déficit hídrico temprana, sensible y reproducible, útil a la hora de monitorear el estado hídrico de la planta no es un indicador de tolerancia-sensibilidad a sequía en *Lotus spp.* (Borsani et al., 2008).

2.3.4. Eficiencia en el uso del agua (EUA)

2.3.4.1. Definiciones

Es bien sabido desde hace un siglo que la relación entre la cantidad de agua transpirada por las plantas y la materia seca producida por las mismas es

variable en función de las condiciones ambientales, siendo esta relación la más alta cuando las plantas crecen en ambientes secos (Jones, 2004).

La relación entre la cantidad de agua transpirada por las plantas y la materia seca acumulada por las mismas ha sido denominada de varias formas: *coeficiente de transpiración*, *tasa transpiratoria* o *requerimiento de agua por las plantas*, mientras que el inverso de esta relación ha sido originalmente denominada *eficiencia transpiratoria*, la cual más recientemente pasó a denominarse *eficiencia en uso del agua* (EUA) (Jones, 2004). La *tasa transpiratoria* es definida como la relación entre la pérdida de agua por transpiración y la ganancia de biomasa. De esta forma, mide la efectividad de las plantas de moderar la pérdida de agua, en relación al ingreso de CO₂ (Taiz y Zeiger, 2006).

La EUA no tiene una única definición, y ésta depende del contexto en el cual se esté discutiendo. En las ciencias vegetales y en relación con la tolerancia a la sequía se han utilizado varias definiciones de EUA, las cuales según Jones (2004) se pueden establecer a diferentes niveles y con distintos objetivos:

- *a nivel de planta*: es la relación entre la tasa de producción de biomasa y la tasa transpiratoria de la planta. Se representa como EUA_t o W y es también conocida como *eficiencia transpiratoria*.
- *a nivel de cultivo o vegetación*: es la relación entre la producción de biomasa total, aérea o la cosechada (expresadas en peso fresco, seco o equivalente glucosa) y la evapotranspiración o transpiración total.
- *a nivel de hoja*: es la relación entre la tasa de asimilación neta de CO₂ (A) y la transpiración. Se representa como EUA_l .
- *EUA intrínseca*: es la relación entre la tasa de asimilación neta de CO₂ (A) y la conductancia estomática (g_s). Se representa como EUA_i .
- *con objetivo agronómico*: es la relación entre la producción total de biomasa o la biomasa cosechada (rendimiento) y el uso total de agua (lluvia + riego) en cierta temporada de crecimiento.

La EUA *instantánea* es definida como la relación del flujo de fotosíntesis neta (A) y la transpiración (E) (Farquhar et al., 1989). Debido a que A y E comparten la misma vía de difusión (el estoma) la EUA *instantánea* puede ser estimada según Farquhar et al. (1989) como:

$$A/E = \frac{c_a(1 - (C_i/C_a))}{1,6v} \quad [1]$$

donde c_i es la presión parcial intercelular de CO_2 , c_a la presión parcial ambiental de CO_2 y v corresponde al gradiente en presión de vapor de agua entre la hoja y la atmósfera dividido la presión atmosférica total. El factor 1,6 es debido a que el vapor de agua difunde a través del aire 1,6 veces más rápido que el CO_2 (Farquhar et al., 1982). Bajo condiciones de campo, la concentración atmosférica de CO_2 (c_a) es relativamente constante, por lo que A/E depende primariamente de la concentración intercelular de CO_2 (c_i) y del gradiente de vapor de agua entre la hoja y la atmósfera (v) (Squeo y Ehleringer, 2004).

Los procesos A y E están regulados por la conductancia estomática para el agua y el CO_2 y los gradientes de concentración respectivos en vapor de agua y CO_2 adentro y afuera de la hoja (subíndice i y a respectivamente). Los gradientes de concentración se calculan, para vapor de agua = $w_i - w_a$ y para $\text{CO}_2 = c_i - c_a$ (Bacon, 2004). En un conjunto de condiciones particulares, la fuerza conductora del consumo de CO_2 aumentará con una disminución de la concentración interna de CO_2 , mientras que la fuerza conductora de la pérdida de agua permanecerá relativamente constante, llevando esto a un aumento de la EUA (Bacon, 2004).

De acuerdo a Bacon (2004) las plantas pueden lograr una baja relación c_i/c_a , con el consecuente aumento de la EUA, a través de:

- la disminución de la apertura estomática (reduciendo la c_i limitando la difusión de CO_2 al interior de la hoja),
- el incremento de la capacidad fotosintética del CO_2 (reduciendo la c_i aumentando la carboxilación), o
- la combinación de ambas (con mayor probabilidad de ocurrencia).

La EUA es usualmente discutida en relación a la performance de la planta cuando el agua es limitante. El ajuste osmótico dentro de las raíces a medida que disminuye el contenido de agua en el suelo es una respuesta adaptativa para mantener el potencial hídrico de las raíces como una extensión de la fuerza hidráulica conductora necesaria para que el consumo y transporte de agua en la planta puedan ser mantenidos (Bacon, 2004). Este autor, propone que los genotipos que expresan un ajuste osmótico significativo, probablemente lo logren mediante el desvío de carbohidratos destinados a procesos de crecimiento, resultando en genotipos tolerantes a la sequía, con baja tasa de crecimiento y poca producción de biomasa. Sin embargo, en esos casos donde la baja disponibilidad de agua resulta en una reducida tasa de transpiración y sostenida acumulación de biomasa, la EUA aumenta significativamente (Bacon, 2004). Bacon (2004) indica que los caracteres que

confieren elevada EUA y rendimiento sostenido en sequía son fundamentalmente opuestos.

Resulta claro que la regulación de la apertura estomática es central para la EUA. Los factores ambientales como intensidad de luz, calidad de la misma, temperatura, humedad y concentración de CO₂ (Bacon 2004, Taiz y Zeiger 2006) actúan de manera directa o indirecta en la apertura estomática junto con los ritmos circadianos internos, el estado hídrico de la hoja y señales conducidas vía xilema, como citoquininas, ABA, etc. (Bacon, 2004). El efecto de las señales, particularmente CO₂, sobre la células oclusivas permanece incierto y ha sido causa importante de discusión (Ball y Berry, Raschke, Mansfield et al., Kearns y Assmann, Jarvis y Davis, citados por Bacon, 2004), sobre todo en relación al rol indirecto de la fotosíntesis sobre el control de la conductancia estomática (Bacon, 2004). La teoría de optimización de la apertura estomática predice que la misma varía a lo largo del día para asegurar la mínima pérdida de agua para obtener la mayor ganancia de carbono (Bacon, 2004).

Los estomas tienen un rol importante en la regulación de la entrada de CO₂, sin embargo la habilidad para modificar la fuerza que conduce la pérdida de agua vía transpiración de enfriamiento de la hoja es realmente limitada (Bacon, 2004). La fuerza conductora de la pérdida de agua hacia la atmósfera desde la cavidad subestomática es comúnmente unas 100 veces superior a la fuerza conductora de la entrada de CO₂ en dicha cavidad y a su fijación (Bacon, 2004). Según este autor, en las plantas C₃ el flujo de salida de vapor de agua puede llegar a valores de 2000-3000 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ mientras que el flujo máximo de entrada de CO₂ se encuentra entre 20-30 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Existe entonces un predominio inherente de la pérdida de agua respecto a la ganancia de carbono en las plantas que tienen este metabolismo. Aquellas plantas que pueden generar un incremento de los gradientes de difusión de CO₂ tendrán una mayor EUA, si la conductancia estomática permaneciera constante (Bacon, 2004).

Según Taiz y Zeiger (2006) en las plantas con metabolismo C₃ cerca de 500 moléculas de agua son perdidas por cada molécula de CO₂ fijada, lo que implica una EUA de 1/500 (o una *tasa transpiratoria* de 500). La elevada relación entre el egreso de agua y el ingreso de CO₂ es según Taiz y Zeiger, (2006) el resultado de tres factores:

1. El gradiente de concentración determinante de la pérdida de agua es cerca de 50 veces mayor que el que determina el ingreso de CO₂. En gran parte, esta diferencia se debe a la baja concentración de CO₂ en el aire (cercana a 0,038%) y la concentración relativamente alta de vapor de agua dentro de la hoja.

2. La difusión de CO₂ a través del aire es alrededor de 1,6 veces más lenta que la del agua porque el PM del CO₂ es mayor que el del H₂O, y porque tiene un menor coeficiente de difusión.
3. El CO₂ debe cruzar la membrana plasmática, el citoplasma, y la doble membrana cloroplástica antes de ser asimilado.

Debido entonces a que el CO₂ y el vapor de agua utilizan la misma vía de difusión y de acuerdo a lo expresado en relación a las diferencias de los gradientes de difusión, un aumento de la conductancia estomática provocará un aumento de la difusión de CO₂, y por tanto un aumento de la tasa fotosintética y de la transpiración. Chaves et al. (2004), establecen que en especies con metabolismo C₃ la conductancia estomática normalmente afecta a la fotosíntesis, ya que tiende a ser co-limitada por la carboxilación y la regeneración de la ribulosa 1-5 bifostato (RuBP). De todas formas, existen evidencias que indican que la relación A/g_s (EUA_i) se mantiene en un amplio rango de condiciones, característica que parece tener una importante significancia ecológica (Chaves et al., 2004).

Dado el papel que tienen las condiciones atmosféricas sobre la determinación EUA, concretamente la influencia que tienen sobre v , muchos investigadores optaron por evaluar solo el rol de los componentes biológicos en la determinación de las relaciones de intercambio agua-carbono (Ehleringer et al., 1993b). A partir de dicha consideración es que resulta interesante determinar las diferencias intrínsecas en la EUA que puedan existir de forma independiente de las condiciones ambientales. La EUA_i permite la comparación directa de las consideraciones fisiológicas intrínsecas, eliminando los efectos de la temperatura y el gradiente de humedad diferente entre plantas (Ehleringer et al., 1993b). Según Jones (2004) la EUA_i constituye una medida directa de la actividad subyacente que existe en el sistema fotosintético, normalizada a conductancia estomática constante (Jones, 2004).

Mientras que la EUA *instantánea* y la *intrínseca* pueden ser útiles para evaluar el intercambio agua-carbono en una base de corto plazo, éstas no necesariamente pueden ser llevadas al largo plazo (Ehleringer et al., 1993b). Para evaluaciones de largo plazo, como las realizadas en el marco de esta tesis, la *eficiencia transpiratoria* (W o EUA_t) resulta más adecuada. Dicha eficiencia permite evaluar medidas de largo plazo de la producción de biomasa o rendimiento en relación a la pérdida de agua a nivel de planta entera (Ehleringer et al., 1993b). De acuerdo con Farquhar et al. (1989) W corresponde a la relación molar entre la ganancia de carbono y la pérdida de agua de la planta, la cual puede ser expresada como:

$$W = \frac{C_a(1 - (C_i/C_a))(1 - \varnothing_c)}{1,6v(1 + \varnothing_w)} \quad [2]$$

donde \varnothing_c es la fracción de carbono fijado que se pierde por respiración y \varnothing_w es la fracción de agua que se pierde durante la noche si los estomas no están totalmente cerrados. Como consecuencia de lo anterior W no es equivalente a EUA_i (A/g_s). W está definido en términos de relaciones de abundancia molar, pero puede ser fácilmente expresada como gramos de carbono-gramos de agua transpirada o gramos de biomasa-gramos de agua transpirada (Ehleringer et al., 1993b).

Existe una fuerte relación positiva entre la cantidad total de agua transpirada por un cultivo y su rendimiento evaluado en respuesta a variaciones de dicha cantidad (Figura 9) (Bacon, 2004). De acuerdo con Gregory (2004) si se asume que la producción de materia seca por un cultivo en el campo se relaciona con la asimilación neta de las hojas individuales, la cantidad de materia seca producida por dicho cultivo por unidad de agua transpirada (*eficiencia transpiratoria*), estará determinada por:

1. El gradiente de concentración de CO_2 entre la atmósfera y los espacios intercelulares.
2. El gradiente de concentración de vapor de agua entre la atmósfera y la cavidad subestomática.
3. La naturaleza de los carbohidratos producidos que constituyen la biomasa de la planta.

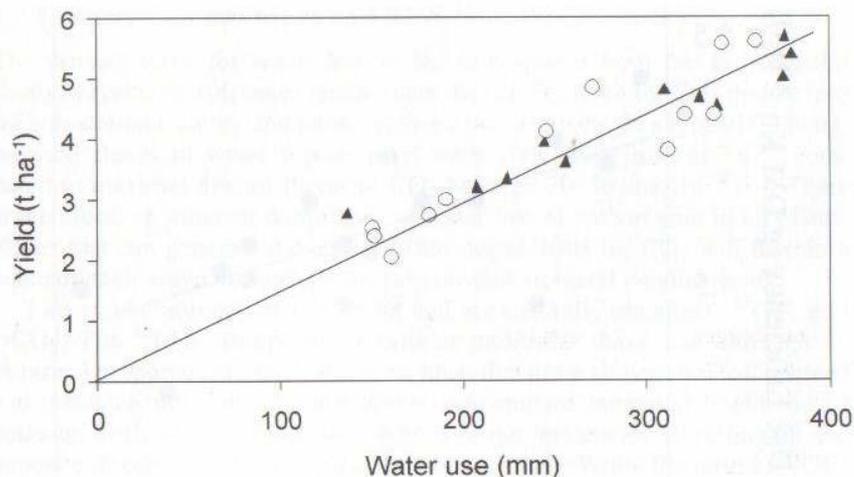


Figura 9. Rendimiento en grano (t/ha) en función del uso de agua (con riego) en cebada (círculos) y trigo (triángulos). La pendiente de la figura indica la EUA para cada tratamiento (Fuente: Bacon, 2004).

Del análisis bibliográfico se puede concluir que la EUA disminuye a medida que aumenta la tasa transpiratoria, debido a la estrecha relación existente entre la tasa transpiratoria y la tasa de asimilación de carbono, y de acuerdo a lo expresado anteriormente en cuanto a la relación asimilación de carbono-transpiración (Figura 9) de manera que hay una tendencia a que la EUA disminuya con el aumento de la productividad (Jones, 2004). De acuerdo a Jones (2004) debido a que en la mayoría de las situaciones la productividad se reduce al aumentar de la EUA, sería erróneo establecer que la simple maximización de dicha eficiencia permitiría maximizar la producción. De esta forma, el concepto de EUA tiene una aplicación limitada cuando se discute la aptitud de las plantas en ambientes con baja disponibilidad de agua (Jones, 2004).

Frecuentemente no es de interés agronómico conocer W (*eficiencia transpiratoria*), pero sí el rendimiento de un cultivo (biomasa del producto cosechable, como semilla) por unidad de agua aplicada al cultivo. Esta expresión corresponde a W multiplicado por el índice de cosecha del cultivo. En este contexto se define una nueva EUA, denominada C (EUA del cultivo) la cual según Ehleringer et al. (1993b) puede expresarse como:

$$C = W * \frac{E}{E_{\text{total}}}, \quad [3]$$

donde E es la pérdida de agua por transpiración del cultivo y E_{total} es la pérdida de agua total desde el suelo, ambas integradas en toda la vida del cultivo y expresadas en base a superficie terrestre.

2.3.4.2. Evaluación de la EUA

En los primeros experimentos de evaluación de la variación del *coeficiente de transpiración* realizados en Europa con unos 10 cultivos diferentes (gramíneas y leguminosas con metabolismo C_3) se determinó una EUA *a nivel de cultivo* (biomasa aérea/transpiración) aproximadamente de 1/300 (Jones, 2004), valor superior al indicado por Taiz y Zeiger (2006) de 1/500. Para cereales C_3 se reportan valores de EUA (biomasa aérea seca / transpiración) de 1,47 a $2,20 \times 10^3$ y para alfalfa (leguminosa C_3) dicho rango se encuentra entre 1,09 y $1,60 \times 10^3$, en cambio para especies C_4 las cuales tienen menores coeficientes de transpiración, y por lo tanto mayor EUA, el rango encontrado es de 2,41 a $3,88 \times 10^3$ (Jones, 2004). De todas formas, la EUA presenta gran variabilidad en diferentes experimentos, debido a que depende de las condiciones ambientales, especialmente de la variación en la humedad relativa, de manera que se dan variaciones en determinaciones realizadas en diferentes sitios y años.

Por otro lado, existe una constancia relativa de la EUA evaluada en diferentes experimentos, con distintos tratamientos, en un mismo ambiente y durante todo el ciclo de vida del cultivo (Jones, 2004). Varias razones podrían explicar esto, pero se destaca en importancia que la EUA *integrada* es dominante en valor cuando los estomas están abiertos (Jones, 2004). Wright et al. (1993) indican valores de *eficiencia transpiratoria* en especies del género *Arachis* spp. (leguminosa C₃) que varían desde 2,96 a 4,58 g/kg en experimentos sin déficit hídrico y de 3,41 a 4,74 en condiciones de estrés hídrico.

2.3.5. Discriminación de isótopos del carbono

Los elementos son definidos de acuerdo al número de protones en su núcleo y la masa atómica de un elemento es igual a la suma del número de protones y neutrones. Un mismo elemento puede tener más de un valor de masa atómica debido a diferencias en el número de neutrones en su núcleo. Estas diferentes formas de un elemento se denominan *isótopos*, que pueden ser estables e inestables. Estos últimos son radiactivos y liberan partículas y energía para pasar a formas más estables.

Existen dos isótopos estables del carbono que son naturalmente abundantes, el ¹²C (6 neutrones y 6 protones) y el ¹³C (6 protones y 7 neutrones). El primero, el isótopo más frecuente en la naturaleza, se encuentra en una abundancia de 98,89 %, mientras que el segundo tiene una abundancia de 1,11%.

Cuando estos isótopos del C forman del CO₂, dan lugar al ¹²CO₂ y ¹³CO₂ (liviano y pesado respectivamente) que se comportan diferente en ciertos procesos y reacciones químicas. Según Bacon (2004) el isótopo pesado tiene respecto al liviano, menor velocidad y tasa de difusión en la hoja, con lo cual hay mayor probabilidad de que el liviano colisione con otras moléculas, como las de agua que viajan en dirección opuesta y tienen una mayor difusión (ítem 2.3.4). A su vez, las moléculas que contienen isótopos livianos se evaporan y difunden más rápido que sus contrapartes pesadas, por lo tanto un líquido en evaporación contendrá más isótopos livianos en la fase gaseosa y más cantidad de pesados en la fase líquida (Pataki et al., s.f.). A esto se lo denomina fraccionamiento isotópico (ítem 2.3.5.1).

Durante la fotosíntesis ocurre discriminación isotópica o fraccionamiento isotópico en contra del isótopo ¹³C, lo que implica que los carbohidratos formados por la planta tienden a tener menos ¹³C que ¹²C, en comparación al C a partir del cual fueron formados (CO₂ atmosférico).

Así, la relación de la abundancia molar $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ del tejido vegetal (R_{muestra}) es inferior a la relación de abundancia molar del aire (la cual es cercana a 1/99, $\delta^{13}\text{C} = -8\text{‰}$), debido a esto los valores de proporción del isótopo pesado ($\delta^{13}\text{C}$) del tejido vegetal son inferiores en comparación a los del aire (el rango de variación de $\delta^{13}\text{C}$ para plantas C_3 es de -23 a -36‰) (Griffiths, 1993). El valor negativo del $\delta^{13}\text{C}$ tanto del aire como de la planta se deben a que la relación de la abundancia molar $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de ambos, es menor que la del estándar PDB-Pee Dee Belemnite (fósil de *Belemnita americana* de la formación geológica Pee Dee, Carolina del Sur, USA), cuyo valor es igual a 0,0112372 (Squeo y Ehlereinger, 2004). Mediante la utilización del espectrómetro de masa se puede determinar R_{muestra} a partir del cual se obtiene $\delta^{13}\text{C}$ (ver ecuaciones en ítem 2.3.5.2). Con el $\delta^{13}\text{C}_{\text{producto}}$ (tejido vegetal) y considerando un $\delta^{13}\text{C}_{\text{fuente}}$ (aire) igual a -8‰, se calcula el $\Delta^{13}\text{C}$, es decir la discriminación del isótopo ^{13}C .

2.3.5.1. Fraccionamiento isotópico-Efectos isotópicos (α)

Las plantas fraccionan los isótopos del carbono durante la fotosíntesis. El fraccionamiento isotópico ocurre cuando los isótopos son particionados de forma diferente entre dos fases (ej. líquida y gaseosa) o entre dos sustancias. Por lo tanto, el fraccionamiento isotópico es consecuencia del comportamiento diferencial que tienen las moléculas que contienen las diferentes formas isotópicas. Este comportamiento diferencial puede ocurrir por causas cinéticas (durante una reacción química), durante el proceso de difusión y en situaciones de equilibrio dinámico (debido a las propiedades físicas de las moléculas) (Squeo y Ehlereinger, 2004).

De acuerdo con Squeo y Ehlereinger (2004) el **fraccionamiento cinético** (situaciones de no-equilibrio) se genera debido a que en cualquier reacción bioquímica, la ruptura de una molécula que contiene el isótopo pesado de un elemento es más difícil en comparación a una misma reacción, en la que participe la molécula con el isótopo liviano, debido a que los enlaces químicos son más fuertes en el primero. Una reacción enzimática que utiliza sustratos con formas isotópicas livianas ocurrirá a mayor velocidad en comparación con reacciones que involucran a formas isotópicas pesadas; en consecuencia, la proporción de isótopos estables de los productos va a ser distinta a la de los sustratos. Estas diferencias van a ocurrir a menos que todo el sustrato sea consumido, en cuyo caso no se debería encontrarse diferencias en la composición isotópica entre sustratos y productos. En muchas reacciones bioquímicas, la ocurrencia de fraccionamiento cinético involucra a sustratos que se encuentran al inicio de vías metabólicas, como la fijación inicial de dióxido de carbono en la fotosíntesis. Un segundo tipo de fraccionamiento es de equilibrio (**fraccionamiento termodinámico**). Este fraccionamiento refleja las diferencias

en las constantes de equilibrio de las especies isotópicas, tal como la reacción de equilibrio entre la fase líquida y gaseosa del agua, en la cual las moléculas con la forma isotópica más pesada son típicamente más abundantes en el estado de fase de menor energía (líquida). El proceso de difusión (**fraccionamiento difusivo**) que implica transferencia de masa, muestra a menudo una pequeña discriminación isotópica (O'Leary, 1993) en el cual las especies de isótopos más pesadas difunden más lentamente que las livianas. La difusión de CO₂ (¹²CO₂ y ¹³CO₂) en el aire presenta un fraccionamiento isotópico ($\delta^{13}\text{C}$) de 4,4‰ (O'Leary, 1981) lo que implica que el aire fuera de la hoja es apenas enriquecido y el de dentro de los estomas de la misma es empobrecido en ¹³C.

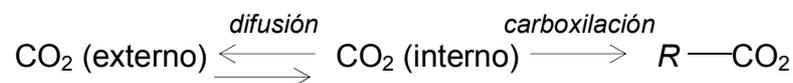
En el proceso inicial de fijación de CO₂ en la fotosíntesis hay un significativo fraccionamiento cinético (Pataki et al., s.f.) usualmente mayor al termodinámico (O'Leary, 1993). La magnitud del fraccionamiento varía con el tipo fotosintético (C₃, C₄ o CAM), ambiente, genotipo, entre otros factores (O'Leary, 1993) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Fraccionamiento isotópico de la fijación de CO₂ en la fotosíntesis. (Fuente: adaptado de Farquhar et al. 1989, O'Leary 1993).

| Proceso | Fraccionamiento α (‰)* | Símbolo |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|
| Difusión de CO ₂ en el aire a través del estoma | 4,4 | <i>a</i> |
| Fijación neta en C ₃ respecto a <i>c_i</i> | 27 | <i>b</i> |
| Fijación de CO ₂ gaseoso por la RuBisCO | 29 (30**) | <i>b₃</i> |
| Fijación de HCO ₃ ⁻ por la PEP carboxilasa | 2 | <i>b₄</i> [#] |
| Fijación de CO ₂ gaseoso (en equilibrio con HCO ₃ ⁻ a 25°C por la PEP carboxilasa) | -5,7 | <i>b₄</i> |
| Disolución de equilibrio del CO ₂ en agua | 1,1 | <i>e_s</i> |

*valores positivos indican empobrecimiento en ¹³C, **considerando disolución del CO₂

El proceso fotosintético puede considerarse en dos pasos que se representan en el siguiente esquema:



En el primer paso el CO₂ difunde a través de los estomas hacia el sitio de carboxilación; en el segundo paso, este CO₂ es tomado por la enzima carboxilasa correspondiente en un proceso irreversible (O'Leary, 1993).

La discriminación isotópica ocurre en ambos pasos de la fotosíntesis. En el primero, como fue mencionado, el valor de discriminación es de 4,4‰, mientras que en el segundo paso existen importantes diferencias en el proceso

de carboxilación según el metabolismo que posea la planta (C_3 , C_4 o CAM). En las plantas C_3 el CO_2 se une a la enzima RuBisCO, dando inicio a un proceso bioquímico denominado Ciclo de Calvin (Figura 10). Esta enzima se une preferentemente al isótopo $^{12}CO_2$ si la concentración de CO_2 es alta. La concentración de CO_2 dentro de la hoja (c_i) depende de la tasa de fotosíntesis y de la apertura estomática. Considerando el caso extremo de un completo cierre estomático (no hay difusión adicional de CO_2 en la hoja, y por tanto c_i es baja), todo el CO_2 presente en la cámara estomática debe utilizarse en la fotosíntesis, y la RuBisCO no tiene posibilidad de optar entre $^{12}CO_2$ y $^{13}CO_2$. En esta condición la discriminación por carboxilación es 0 y el valor esperable de $\delta^{13}C$ hipotéticamente es cercano a $-12,4\%$, correspondiendo a -8 del aire + $-4,4$ de la difusión (O'Leary, 1993). Si se considera el caso extremo opuesto, es decir estomas completamente abiertos, la c_i se aproxima a la c_a , y la difusión se vuelve insignificante (próxima al equilibrio) en comparación a la elevada tasa de carboxilación; la RuBisCO puede optar por moléculas de $^{12}CO_2$. En este caso los carbohidratos producidos tendrán la máxima discriminación ($\delta^{13}C$) de la RuBisCO, cercana a 30% , que junto con la del aire será igual a -38% (Cuadro 4). En la realidad no ocurren estos casos extremos sino que existe un comportamiento intermedio, donde cambios en la apertura estomática modifican la concentración interna de CO_2 y el fraccionamiento isotópico.

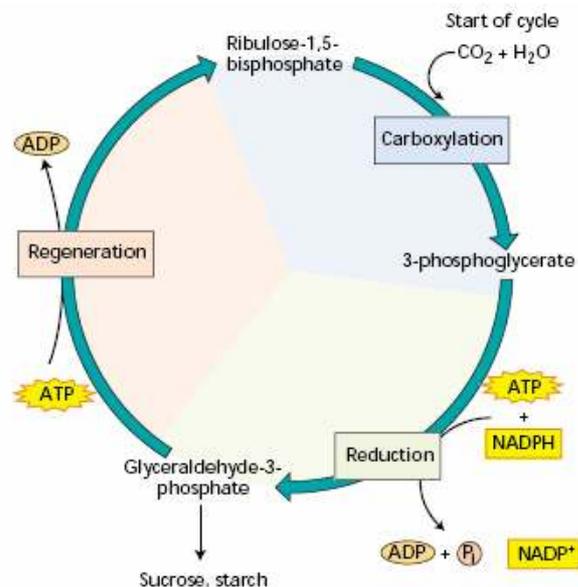
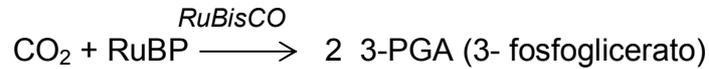


Figura 10. Esquema del Ciclo de Calvin. Se indican tres etapas: Carboxilación, reducción y regeneración. (Fuente: Taiz y Zeiger, 2006).

La enzima RuBisCO cataliza el primer paso de la fijación de CO₂ en las plantas C₃:



Un gran número de evaluaciones indica que el fraccionamiento isotópico enzimático por RuBisCO es del orden de 29‰ comparado con CO₂ disuelto en agua a 25°C, pH 8 y 30‰ comparado con CO₂ gaseoso (O'Leary, 1993). El valor adoptado normalmente para determinar la discriminación isotópica en plantas C₃ es 27‰ debido a que se considera en éste la contribución de la discriminación realizada por la PEP carboxilasa (2‰) en plantas con este metabolismo (Farquhar et al. 1989, Griffiths 1993).

2.3.5.2. Ecuaciones usadas para determinar la discriminación isotópica

Los efectos isotópicos (α) también llamados factores de fraccionamiento, ya que resultan del fraccionamiento isotópico, se definen según Farquhar et al. (1989) como sigue:

$$\alpha = R_r/R_p \quad [4]$$

donde R_r es la relación molar ¹³C/¹²C del reactivo y R_p la del producto.

El efecto isotópico cinético o fraccionamiento isotópico **cinético** (Farquhar et al., 1989) se puede definir entonces como la relación entre las tasas constantes de los sustratos ¹²C y ¹³C (k^{12} y k^{13} respectivamente):

$$\alpha_{\text{cinético}} = k^{12} / k^{13} \quad [5]$$

Un efecto isotópico de **equilibrio** simple sería la relación de las constantes de equilibrio para ¹²C y ¹³C, conteniendo los componentes K¹² y K¹³ respectivamente Farquhar et al. (1989):

$$\alpha_{\text{equilibrio}} = K^{12} / K^{13} \quad [6]$$

De acuerdo con Farquhar et al. (1989) los efectos de **difusión** pertenecen a la categoría de efectos cinéticos, y el efecto isotópico es la relación entre la difusividad del compuesto ¹²C y la del compuesto ¹³C.

Los efectos isotópicos cinéticos de sucesivas reacciones individuales son usualmente no-aditivos pero los termodinámicos sí lo son (Farquhar et al., 1989).

Farquhar y Richards (1984) propusieron el uso del Δ para medir la discriminación isotópica del carbono de las plantas:

$$\Delta = \alpha - 1 = (R_a/R_p) - 1, \quad [7]$$

siendo los valores de α conocidos (y por tanto los de Δ) para la difusión de CO_2 y para la carboxilación de la RuBisCO y de la PEP carboxilasa (Griffiths, 1993) (Cuadro 4). R_a corresponde al fraccionamiento de los reactivos que en este caso es el aire atmosférico y R_p corresponde al del producto que en este caso es la planta.

El espectrómetro de masa permite conocer el valor de proporción isotópica del carbono ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$, ‰) el cual se obtiene a través de la comparación de las abundancias molares $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de las muestras respecto a las del estándar *Pee Dee Belemnite* (PDB) según la fórmula (Farquhar et al., 1989):

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [(R_{\text{muestra}}/R_{\text{PDB}}) - 1] \times 1000\text{‰}, \quad [8]$$

donde $\delta^{13}\text{C}$ es la proporción del isótopo pesado, R_{muestra} es la relación de la abundancia molar $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la muestra vegetal (planta) y R_{PDB} es la relación de la abundancia molar $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ del estándar (PDB), la cual es igual a 0,0112372 (Squeo y Ehleringer, 2004).

Por otro lado, considerando las ecuaciones 7 y 8 se puede determinar $\Delta^{13}\text{C}$ como la diferencia entre el valor $\delta^{13}\text{C}$ de la fuente (aire, considerada como -8 ‰) y el producto (planta) utilizando la ecuación (Farquhar et al., 1989):

$$\Delta^{13}\text{C} = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{fuente}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{producto}}}{1 + \delta^{13}\text{C}_{\text{producto}}} \quad [9]$$

Las ventajas de utilizar $\Delta^{13}\text{C}$ en lugar de $\delta^{13}\text{C}$ o las relaciones de abundancia molar $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (R) es que con la primera se expresan directamente las consecuencias de los procesos biológicos, y es independiente de la composición isotópica de la fuente (aire) y de la composición isotópica del estándar, mientras que la $\delta^{13}\text{C}_{\text{producto}}$ es el resultado de la composición isotópica de la fuente (aire) y de la discriminación isotópica del carbono (Farquhar et al. 1989, Farquhar et al. 1993).

De acuerdo a O'Leary (1993) el fraccionamiento isotópico en plantas C_3 se puede expresar de la siguiente manera:

$$\text{Fraccionamiento } (\Delta^{13}\text{C}) = [a + (b - a)c_i/c_a - d], \quad [10]$$

donde a es la discriminación debida a la difusión (4,4‰), b es la discriminación debida a la carboxilación por la RuBisCO (principalmente b_3 ; 30‰ corregido por el efecto de la disolución del CO_2), c_i es la presión de la fase gaseosa interna de CO_2 y c_a es la presión externa (ambiental) de CO_2 . El término d involucra la contribución de la respiración, difusión en fase líquida, cambios isotópicos debidos a la exportación de carbono, fijación de CO_2 en plantas C_3 por la PEP carboxilasa, y una variedad de otros factores. El valor de d es usualmente pequeño y puede ser omitido, si bien la respiración representa una parte importante del consumo de carbono y puede hacer que d sea elevado y variable (O'Leary, 1993). De todas formas, la evidencia disponible sugiere que el fraccionamiento isotópico asociado a la respiración es reducido (Farquhar et al. 1989, O'Leary 1993). El fraccionamiento isotópico ($\Delta^{13}\text{C}$) varía de acuerdo a las variaciones en la concentración interna de CO_2 (c_i) (ver ecuación 12) (Farquhar et al. 1982, O'Leary 1993). La ecuación 11 ha sido ampliamente difundida en su forma más simple (Farquhar et al., 1982):

$$\text{Fraccionamiento } (\Delta^{13}\text{C}) = a + (b - a)(c_i / c_a) \quad [11]$$

Farquhar et al. (1989) encontraron una correlación significativa entre c_i/c_a y $\Delta^{13}\text{C}$ para varias especies de metabolismo C_3 y C_4 (Figura 11).

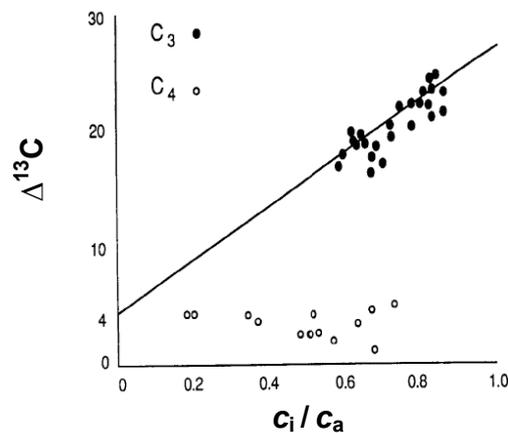


Figura 11. Relación entre la discriminación de isótopos del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$) y c_i/c_a . La recta fue realizada a partir de la ecuación 11. (Fuente: Farquhar et al., 1989).

Las plantas C_3 no estresadas presentan una relación c_i/c_a cercana a 0,7 (Figura 11) (Farquhar et al., 1989). Según Condon et al. (2002) este valor de c_i/c_a estaría determinado por el balance entre conductancia estomática y capacidad fotosintética. La relación entre Δ y c_i/c_a es función de la capacidad

fotosintética y de la conductancia estomática, con un Δ que reflejaría el punto óptimo entre estos dos parámetros para un determinado momento (Bacon, 2004).

De acuerdo con Farquhar y Richards (1984) el valor de $\Delta^{13}\text{C}$ sería dependiente del valor de la presión parcial de CO_2 en el espacio intercelular (c_i) acorde a la ecuación:

$$\Delta^{13}\text{C} = 4,4 + 25,6c_i/c_a \quad [12]$$

La misma relación fue confirmada experimentalmente en varias situaciones con plantas C_3 , mientras que $\Delta^{13}\text{C}$ es ampliamente insensible a la relación c_i/c_a en plantas C_4 (Jones, 2004).

Las principales desventajas del uso de la discriminación isotópica es que la misma no permite conocer las pérdidas por respiración ni la evaporación del suelo (Jones, 2004). Otra limitante importante del uso de este parámetro fisiológico es que solo permite conocer la EUA intrínseca global, sin dar información acerca de si las diferencias son resultado de modificaciones en la actividad fotosintética o de la regulación de la conductancia estomática (Jones, 2004). Según Bacon (2004) si la elevada EUA es debida a bajos valores de conductancia estomática (g_s), la productividad en ambientes de adecuada disponibilidad hídrica puede no ser tan elevada como la de un genotipo con baja EUA, debido a la estricta relación entre transpiración y productividad (Figura 9). Por otro lado Chaves et al. (2004) indican que mayor $\delta^{13}\text{C}$ (menor $\Delta^{13}\text{C}$) puede resultar tanto del bajo consumo de agua (ahorro de agua) por baja conductancia estomática y/o mayor asimilación de carbono (mayor A_{max}), condición que podría darse con un mejora en la nutrición mineral de las plantas (Chaves, et al., 2004). La ocurrencia de lo anterior estaría afectando las estimaciones de EUA utilizando $\Delta^{13}\text{C}$.

Para plantas con metabolismo C_3 los valores de $\Delta^{13}\text{C}$ varían de 13 a 28‰ y -1 a 7‰ para las de metabolismo C_4 (Jones, 2004). Para especies del género *Lotus*, Borsani et al. (2007) reportan valores de $\Delta^{13}\text{C}$ que van desde 25,8‰ en condiciones de crecimiento normales y que descienden a 20,61‰ luego de 15 días de estrés hídrico. Dichos investigadores indican que dentro de *Lotus corniculatus*, el cultivar INIA Draco fue el que mostró los menores valores de discriminación en todos los tratamientos (Cuadro 5), lo que puede explicar su mayor persistencia a campo (ítem 2.2.2). A su vez éste genotipo fue el que presentó mayor EUA, seguido por Ganador y San Gabriel (Borsani et al., 2007) lo que a indica el potencial que representa la discriminación isotópica para evaluar la EUA *integrada* en el largo plazo (ítem 2.3.6).

Cuadro 5. Discriminación isotópica del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$) de tres cultivares de *L. corniculatus* con y sin déficit hídrico. (Fuente: adaptado de Borsani et al., 2007).

| Cultivar | Tratamiento | $\Delta^{13}\text{C}$ |
|---|------------------------|-----------------------|
| <i>Lotus corniculatus</i> cv E. Ganador | Control día 0 | 23,19 |
| | Control día 15 | 23,17 |
| | Déficit hídrico día 15 | 22,19 |
| <i>Lotus corniculatus</i> cv San Gabriel | Control día 0 | 24,44 |
| | Control día 15 | 24,64 |
| | Déficit hídrico día 15 | 23,37 |
| <i>Lotus corniculatus</i> cv INIA Draco | Control día 0 | 23,13 |
| | Control día 15 | 22,63 |
| | Déficit hídrico día 15 | 21,71 |

2.3.6. Relación entre EUA y discriminación isotópica del carbono

En la segunda mitad del siglo veinte el descubrimiento de que el proceso fotosintético presenta la capacidad de fraccionar los isótopos del carbono, permitió el uso de éstos como herramienta para evaluar la EUA *instantánea* así como también la *integrada* (Bacon, 2004).

El gran impacto de la utilización de los isótopos estables (del carbono y oxígeno) es que su uso provee un método simple y rápido de evaluación de la EUA a lo largo del tiempo ya que las relaciones isotópicas encontradas en los tejidos dependen de los procesos involucrados en su formación (Jones, 2004).

Varios años de investigación demuestran la existencia de una fuerte relación negativa entre la discriminación isotópica del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$) y la EUA (Figura 12). Sin embargo, mientras que $\Delta^{13}\text{C}$ es una buena medida de la EUA, esta metodología no indica si tal eficiencia (inferida por bajo $\Delta^{13}\text{C}$) es debida al control estomático o a la capacidad fotosintética (Bacon, 2004).

Farquhar et al. (1989) establecieron que el alcance de $\Delta^{13}\text{C}$ varía de acuerdo a la presión parcial de CO_2 tanto dentro (c_i) como fuera (c_a) de la hoja y a su vez ésta determina la fuerza conductora de CO_2 (ecuaciones 11 y 12). Una elevada relación c_i/c_a resulta en un elevado $\Delta^{13}\text{C}$, mientras que una baja relación c_i/c_a determina un menor de $\Delta^{13}\text{C}$ (Figura 11) (Bacon, 2004). Consecuentemente un elevado $\Delta^{13}\text{C}$ se da en un ambiente de fijación de CO_2 con relación c_i/c_a relativamente alta (cerca a 1), mientras que lo contrario (bajo $\Delta^{13}\text{C}$) indica un ambiente de fijación de CO_2 con relación c_i/c_a relativamente baja (Figura 11). Como fue expresado anteriormente (ítem

2.3.4.1) una baja relación c_i/c_a determina una mayor EUA, debido a la mayor fuerza relativa de conducción del ingreso de CO_2 que ésta genera (Bacon, 2004).

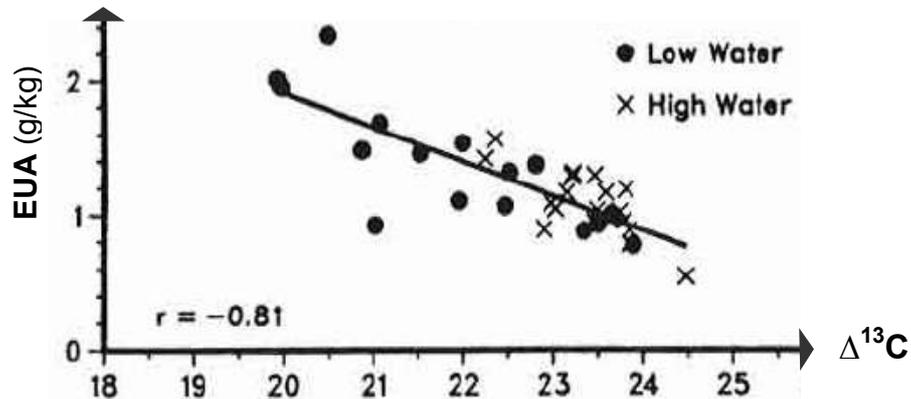


Figura 12. Relación entre $\Delta^{13}\text{C}$ y EUA (g de MS parte aérea/ Kg de agua utilizada) para diferentes genotipos de *Leymus angustus* (Trin.) Pilg. (gramínea forrajera C_3) en dos niveles hídricos contrastantes. (Fuente: adaptado de Johnson et al., 1990).

Farquhar et al. (1989) determinaron que la relación entre las tasas de asimilación y transpiración ($\text{EUA}_i = A/E$) (ítem 2.3.4.1) y $\Delta^{13}\text{C}$ están relacionadas negativamente, lo que es esperado considerando la ecuación 1 y Figura 11. Según Ehleringer et al. (1990a) esto es debido a que ambas variables son dependientes de la relación c_i/c_a . Sin embargo, existen pérdidas de carbono que no están consideradas en dicha ecuación. Dichas pérdidas son \emptyset_c y \emptyset_w las cuales son utilizadas en el cálculo de la eficiencia transpiratoria, W (ver ecuación 2, ítem 2.3.4.1). Combinando la ecuación 1 con la 11, es posible predecir una relación lineal negativa entre W y Δ , la cual se puede expresar según Farquhar et al. (1989) como:

$$W = \frac{c_a(b - d - \Delta)(1 - \emptyset_c)}{1,6v(1 + \emptyset_w)} \quad [13]$$

donde d es la corrección de la tasa de asimilación. Existen varias razones que indican que la relación negativa entre W y Δ de la ecuación 13 puede ser útil para evaluaciones en macetas o pequeñas parcelas a campo pero no en grandes áreas (Farquhar et al., 1989). Algunas de ellas son que la pérdida incontrolada de agua no es una proporción fija (\emptyset_w) independiente de la respiración; si v varía aquellos genotipos que pueden crecer más cuando v es menor tendrán mayor W a una misma Δ .

La discriminación isotópica del carbono (Δ) que ocurre en las hojas de las plantas C_3 está relacionada con el intercambio de gases, ya que $\Delta^{13}C$ se considera una medida integradora de largo plazo de la relación c_i/c_a (Farquhar et al. 1982, Farquhar y Richards 1984, Farquhar et al. 1989, Ehleringer et al. 1990a). Cabe destacar que los análisis foliares de $\Delta^{13}C$ constituyen una estimación de la Δ producida durante el período de crecimiento de la hoja, con lo cual la EUA que se determina es la que transcurrió en dicho período.

Farquhar y Richards (1984) establecen que de acuerdo con la teoría, la EUA y Δ están inversamente relacionados si se cumplen las siguientes premisas: (i) la presión de vapor de aire en la hoja (y por lo tanto las temperaturas) se mantienen constantes, (ii) la fracción del carbono fijado durante la fotosíntesis que se pierde por respiración se mantiene constante. Estas premisas pueden no cumplirse estrictamente en todas las condiciones experimentales (Ebdon y Kopp, 2004).

Por otro lado se destaca que el aumento en la capacidad fotosintética aumentará la EUA, tal como fuera mencionado anteriormente (ítem 2.3.4.1). Sin embargo este aumento de la capacidad fotosintética está usualmente asociado a una disminución del tamaño foliar, lo que reduce la transpiración total de la planta y la intercepción de luz, tal que la EUA a *nivel de planta* puede en realidad disminuir (Bacon, 2004). A pesar de que en la mayoría de los casos existe una relación positiva entre transpiración y rendimiento (Figura 9), en ciertas circunstancias el rendimiento y la EUA pueden mantenerse o incluso aumentar aunque exista una caída de la acumulación de biomasa a nivel de planta entera (Bacon, 2004).

2.3.6.1. EUA, crecimiento y biomasa en relación a $\Delta^{13}C$

Un gran número de experimentos han sido realizados en los últimos 20 años para evaluar la relación entre la EUA, discriminación isotópica, producción de biomasa y rendimiento. En términos generales los resultados de estas evaluaciones indican una relación negativa entre EUA (o eficiencia transpiratoria) y $\Delta^{13}C$ y una relación positiva entre biomasa producida y $\Delta^{13}C$ (Cuadro 6).

Cuadro 6. Correlaciones entre EUA y $\Delta^{13}\text{C}$, y Biomasa y $\Delta^{13}\text{C}$ para diferentes especies evaluadas en diferentes condiciones.

| Especie/s | Coeficientes de correlación [#] | | Fuente |
|--|--|--------------------------------|--|
| | EUA- $\Delta^{13}\text{C}$ | Biomasa- $\Delta^{13}\text{C}$ | |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> L. | -0,80* (1) | 0,68 (2) | (1) Ehleringer et al., 1990a. (2) White et al., 1990. |
| <i>Agropyron desertorum</i> (Fisch. ex Link) Schult. | -0,73* | 0,75** | Johnson et al., 1990. |
| <i>Leymus angustus</i> (Trin.) Pilg. | -0,81* | s/d | |
| <i>Poa pratensis</i> L. | -0,71 | s/d | Ebdon y Kopp, 2004. |
| <i>Oryza sativa</i> L. | -0,83 | s/d | Impa et al. 2005. |
| <i>Chrysothamnus nauseosus</i> (Pallas) Britt. | s/d | -0,27** | Donovan y Ehleringer, 1994. |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | | 0,97 | Martin y Thorstenson, 1988. |
| <i>Lycopersicon pennellii</i> (Correll) D'Arcy | -0,78 (a) -0,81 (b) | 0,82 | |
| <i>L. esculentum</i> x <i>L. pennellii</i> (F ₁) | | 0,95 | |
| <i>L. esculentum</i> x <i>L. pennellii</i> (F ₂) | -0,42 / -0,44 | -0,34 / 0,57 | |

[#]Significativos con $p \leq 0,05$, *eficiencia transpiratoria; **biomasa aérea, (a) 50% CC, (b) 100% CC.

De acuerdo a experimentos realizados por Condon et al. (2002) en trigo (*Triticum aestivum*; gramínea C₃) es posible afirmar que para ambientes donde exista disponibilidad suficiente de agua sería recomendable seleccionar en contra de la EUA (baja EUA, alta Δ), particularmente si la menor EUA está asociada con mayores tasas de crecimiento, y lo contrario cuando la disponibilidad de agua es limitada. En tales experimentos los genotipos de trigo que presentaron elevada EUA, tuvieron una conductancia estomática significativamente menor que los de baja EUA (cerca de un 33%) (Condon et al., 2002). En esos experimentos las líneas con baja Δ (alta EUA) mostraron mayores rendimientos que aquellos con alta Δ (baja EUA) (Condon et al., 2002) debido a que la cantidad de agua era relativamente baja.

En ambientes que no tienen necesariamente restricciones hídricas, el aumento de la EUA debido a cambios en la capacidad fotosintética puede ofrecer mayores ventajas, así como también en ambientes con restricciones hídricas, aunque las ventajas de estas modificaciones no serían totales ya que el aumento de dicha capacidad fotosintética puede implicar una disminución del área foliar potencial (Bacon, 2004).

Mientras que la comprensión de la discriminación del $^{13}\text{CO}_2$ en las plantas ha permitido beneficios tangibles a través del logro de nuevas variedades de cereales con elevada EUA (ej. cultivar de trigo "Drysedale"), usando solamente $\Delta^{13}\text{C}$ no se tiene información de la relativa contribución del

control fotosintético o estomático del c_i y por tanto de la contribución de la regulación estomática en la determinación de la EUA (Bacon, 2004). Según Bacon (2004) si la elevada EUA es determinada por una baja conductancia estomática, la productividad en un ambiente sin restricciones hídricas puede no ser tan elevada como la que se puede obtener con un genotipo de baja EUA como consecuencia de la estricta relación entre transpiración (uso de agua) y productividad (rendimiento) (Figura 9). En general, pero no siempre, mayor $\delta^{13}\text{C}$ (menor $\Delta^{13}\text{C}$) resulta del cierre estomático y reducida asimilación de carbono y crecimiento.

2.3.6.2. Uso combinado de isótopos del carbono y oxígeno

Debido a que durante la fotosíntesis ocurre fraccionamiento de isótopos del carbono y en la transpiración de isótopos del oxígeno, las proporciones entre los isótopos ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) pueden ser considerados como variables sustitutas que integran estos dos procesos fisiológicos básicos (Chaves et al., 2004).

La utilización de los isótopos estables del oxígeno puede ser útil para evaluar si los genotipos con elevada EUA (identificados con Δ) son también los que tienen elevados niveles de transpiración (Bacon, 2004). Existen tres isótopos estables del oxígeno: ^{16}O (99,759%), ^{17}O (0,037%) y ^{18}O (0,204%), pero debido a que las proporciones $^{18}\text{O}/^{17}\text{O}$ se mantienen constantes y a la mayor abundancia de ^{18}O es que normalmente se determinan solo las relaciones $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (Ehleringer y Rundel, 1989b).

Según Bacon (2004), cuando el agua se evapora desde la cavidad subestomática la hoja se enriquece con el isótopo de oxígeno O^{18} , debido al aumento de la evaporación de las moléculas de agua que tienen el isótopo liviano (H_2O^{16}) en relación a las que tienen al isótopo pesado (H_2O^{18}), como consecuencia de las diferencias en su masa molecular.

El aumento de la conductancia estomática resulta en una disminución del enriquecimiento en H_2O^{18} (Bacon, 2004). La relación de abundancia molar $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ es finalmente almacenada en los carbohidratos de las hojas, a través del intercambio molecular de oxígeno entre el agua y los grupos carbonilos dentro de los carbohidratos de las hojas (Bacon, 2004). De acuerdo con Barbour et al. (2000) es posible modelar y evaluar la relación entre la discriminación del ^{18}O en el tejido foliar y la conductancia estomática y la relación entre la discriminación de ^{13}C y ^{18}O . Es posible entonces predecir que el cierre estomático (disminución de la conductancia estomática) produciría una disminución de la discriminación de ^{13}C (enriquecimiento de los tejidos con ^{13}C)

y un aumento de la de ^{18}O (enriquecimiento de las hojas con ^{18}O), relación que ha sido reportada por varios autores (Bacon, 2004).

Chaves et al. (2004) establecen que la relación entre isótopos del oxígeno en las plantas ($\delta^{18}\text{O}$) está relacionada a la relación entre la presión de vapor en la atmósfera y la presión de vapor intercelular, y está determinada por: (i) la composición isotópica del agua utilizada por las plantas, (ii) el fraccionamiento que se da en la transpiración (enriquecimiento con ^{18}O) y (iii) el fraccionamiento que se da durante las reacciones bioquímicas.

La proporción de ^{18}O de la biomasa refleja entonces la tasa transpiratoria, y debido a que no existe fraccionamiento durante la fotosíntesis, la misma puede ser considerada como una medida integradora de la conductancia estomática (Farquhar y Lloyd 1993, Barbour et al. 2000). Por lo tanto, los valores de $\delta^{18}\text{O}$ pueden ser potencialmente útiles para conocer si la discriminación isotópica del carbono observada es debida a cambios en la conductancia estomática (g_s) o en la fotosíntesis neta máxima (asimilación neta máxima, A_{max}) (Chaves et al., 2004). Según Tuberosa (2004) las medidas de $\delta^{18}\text{O}$ ofrecen tres ventajas claras en comparación a las medidas de conductancia estomática:

1. Provee una medida integrada en términos de conductancia estomática y temperatura foliar del período en el cual se formó el tejido analizado.
2. Evita problemas experimentales típicos en la evaluación de la conductancia estomática.
3. Permite coleccionar un elevado número de muestras con poco trabajo en el campo.

Evaluaciones realizadas con cultivares de trigo del CIMMYT (Barbour et al., 2000) en condiciones de riego indicaron una fuerte correlación entre $\delta^{18}\text{O}$ en la hoja y la conductancia estomática ($r = -0,93$). En este caso la correlación entre $\delta^{18}\text{O}$ medido en las hojas y rendimiento en grano fue mayor en comparación a la obtenida utilizando $\delta^{13}\text{C}$ (-0,90 versus -0,71).

Las relaciones entre los isótopos del oxígeno ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) pueden ser entonces utilizadas como medida integradora de la transpiración, con bajos niveles de enriquecimiento con ^{18}O indicadores de elevada tasa transpiratoria a lo largo de la vida del tejido muestreado. Es posible establecer que la evaluación de genotipos con bajo enriquecimiento de O^{18} (elevada tasa transpiratoria) asociado con bajo enriquecimiento de ^{13}C (elevada discriminación de ^{13}C) es una poderosa herramienta para seleccionar cultivares de alto rendimiento y elevada EUA (Bacon, 2004).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Se usaron tres genotipos: *Lotus corniculatus* cv San Gabriel (testigo), *Lotus corniculatus* línea tolerante y *Lotus corniculatus* línea sensible. Las líneas fueron obtenidas por selección fenotípica a partir de cruzamientos entre el cultivar San Gabriel y el cultivar INIA Draco, teniendo como criterio de selección la producción de forraje bajo condiciones de estrés hídrico (ver criterio de selección en ítem 2.2.3). La proporción estimada de cada padre en la progenie es 2/3 INIA Draco-1/3 San Gabriel¹. Las líneas fueron obtenidas y suministradas por la Ing. Agr. (M.Phil.) Mónica Rebuffo y colaboradores en la Estación Experimental INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay).

3.2. CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

Las semillas se esterilizaron superficialmente según el siguiente protocolo:

1. Alcohol 96° GL 1 min.
2. Enjuague con agua estéril.
3. Hipoclorito de sodio comercial 2 min.
4. Enjuagues sucesivos con agua estéril 3-5 cada 5 min y 2-3 cada 2 h.

Luego de la esterilización, la cual tiene efecto escarificante sobre las semillas, éstas se transfirieron a placas de Petri con agar-agua estéril (1 % p/v). Las semillas se incubaron en cuarto de cultivo a una temperatura de 22° C durante 2-3 días hasta que la radícula se desarrolló 3-5 mm. Las placas permanecieron con la tapa hacia abajo para evitar que la radícula de las plántulas se incorpore en el agar. Las plántulas se sembraron en macetas de 300 mL con sustrato de arena y vermiculita en proporción 2:1 respectivamente. La arena fue previamente tratada con ácido clorhídrico (37%) utilizando 100 mL cada 10 Kg de arena, durante 12 h. El tratamiento con ácido permite eliminar gran parte del CaCO₃ contenido en la arena. Después, la misma se lavó con agua durante unas 4 h, hasta alcanzar pH entre 6 y 7. La vermiculita y la arena se esterilizaron a 121°C durante 20 min.

Luego de que las plantas alcanzaron unos 10 -15 cm de altura se agregó perlita con el objetivo de disminuir la evaporación.

Durante los primeros 30 días todas las plantas fueron regadas hasta capacidad de campo con agua corriente y fertilizadas cada dos riegos con

solución nutritiva Hornum (Handberg y Stougaard, 1992) modificada para *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen, 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. La solución Hornum se esterilizó en autoclave.

La capacidad de campo (100 % CC) se definió como el peso de la maceta a partir del momento en el cual comienza el escurrimiento. El 50 % de la capacidad de campo (50 % CC) se definió como el peso de la maceta secada a temperatura ambiente más el peso de la mitad de agua agregada a las macetas de 100 % CC.

3.3. EVALUACIÓN DE LA EUA Y DISCRIMINACIÓN ISOTÓPICA

Las plantas permanecieron en cámara de crecimiento a 22°C, con un ciclo luz/oscuridad 16/8 h e intensidad de luz (PFD, Densidad de Flujo de Fotones) de 250 µEm⁻².s⁻¹. Para cada genotipo se realizaron 2 tratamientos a partir de 30 días de crecimiento inicial en condiciones de capacidad de campo, en los que se determinó separadamente la biomasa de raíz, tallo y hoja:

- **Evaluación Inicial** (biomasa inicial): consistió en medir la biomasa total producida en 5 macetas que se mantuvieron 30 días post-siembra.
- **Tratamiento 1** (100% CC): se midió la biomasa en 5 macetas que se mantuvieron 45 días post-siembra a capacidad de campo con riego diario.
- **Tratamiento 2** (50% CC): se midió la biomasa producida en 5 macetas mantenidas sin déficit hídrico hasta el día 30 post-siembra en capacidad de campo y a partir de este día a 50 % de capacidad de campo durante 15-16 días.

A partir del día 30 todas las macetas se pesaron diariamente, y se regaron hasta alcanzar el peso de maceta correspondiente a cada tratamiento (100 % y 50 % de la capacidad de campo).

Para evaluar la evaporación del sistema se utilizaron 4 macetas que no fueron sembradas (sin plantas) que contenían sustrato cubierto con perlita, al igual que todos los tratamientos. De las cuatro macetas, dos se mantuvieron a 100 % de capacidad de campo y dos a 50 %.

3.3.1. Determinación de la EUA o W

La EUA o más específicamente eficiencia transpiratoria (W) expresada como biomasa total (raíz, tallo y hoja) / agua transpirada se calculó de la siguiente forma:

$$W \text{ (g/kg)} = \frac{[\text{Biomasa final (g/maceta)} - \text{Biomasa inicial(g/maceta)}]}{\text{Agua Transpirada Acumulada}}$$

$$\text{Agua Transpirada Acumulada (mL)} = \sum(\text{agua agregada a las plantas}) - \sum(\text{agua agregada a las macetas vacías})$$

Las determinaciones de biomasa se realizaron luego del secado de las muestras en estufa a 60°C durante 48h.

3.3.2. Determinación de la discriminación isotópica del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$)

Las muestras compuestas por las hojas de cada maceta fueron molidas en mortero de ágata hasta lograr un polvo muy fino, luego de haber sido secadas en estufa a 60°C durante 48h. Luego de esto se volvieron a secar durante 24h y se tomaron muestras de 1,5 mg que se colocaron en cápsulas de estaño para determinar el $\delta^{13}\text{C}$ en un analizador elemental (Flash EA[®], 1112 Series) acoplado a un espectrómetro de masa de relaciones isotópicas (Termo Finnigan Delta Plus[®]). El valor R (relación de abundancia molar $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la muestra) se expresa en relación al estándar *Pee Dee Belemnite* (PDB). El procedimiento utilizado fue el del Laboratorio de Isótopos Estables de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República.

Los valores de la relación isotópica del carbono ($\delta^{13}\text{C}\text{‰}$) fueron obtenidos a través de la comparación de las abundancias molares $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de una muestra del conjunto de hojas de cada maceta, respecto a las del estándar *Pee Dee Belemnite* (PDB) según la fórmula (O'Leary, 1993):

$$\delta^{13}\text{C} \text{ (‰)} = [(R_{\text{muestra}}/R_{\text{PDB}}) - 1] \times 1000\text{‰}$$

donde $\delta^{13}\text{C}$ es la proporción de isótopos del carbono, R_{muestra} es la relación de la abundancia molar $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la muestra vegetal (planta) y R_{PDB} es la relación de la abundancia molar $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ del estándar (PDB), la cual es igual a 0,0112372 (Squeo y Ehleringer, 2004).

La discriminación isotópica del carbono (Δ) se expresa como una diferencia entre el valor $\delta^{13}\text{C}$ de la fuente (aire) y el producto (planta), la misma se calculó utilizando la ecuación descrita por O'Leary (1993):

$$\Delta = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{fuente}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{producto}}}{1 + (\delta^{13}\text{C}_{\text{producto}}/1000)}$$

donde el valor de $\delta^{13}\text{C}$ de la fuente (aire) se lo tomó como -8 ‰.

El ensayo de evaluación de la EUA y de la discriminación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ se realizó en total 2 veces en las mismas condiciones.

3.4. EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE ACUMULACIÓN DE PROLINA Y CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA

Para determinar la concentración de prolina acumulada en folíolos y raíces durante el periodo de déficit hídrico definido, y el comportamiento de la conductancia estomática en 3 momentos del día, se usaron 8 macetas con 6 plantas cada una que crecieron en las condiciones indicadas en el ítem 3.2. A partir del día 35 las macetas fueron privadas de riego hasta el día 40 en el cual finalizó el ensayo.

3.4.1. Acumulación de prolina

Para evaluar la acumulación de prolina de cada genotipo se cosecharon diariamente 6 plantas procedentes de una maceta. Las plantas se colocaron en papel de aluminio y se conservaron a -80°C . Para evaluar la concentración de prolina en folíolos y raíces se realizó primero extracción y luego cuantificación.

a. Extracción de prolina de hojas y raíces (Borsani et al., 1999):

- Homogeneizar a temperatura ambiente una muestra de tejido vegetal (150 – 200 mg) con 2 mL de metanol-cloroformo-agua (MCA) en relación 12:5:1, respectivamente.
- Centrifugar el homogenizado a 2000 xg 2 min y recoger el sobrenadante (fase de color claro).
- Adicionar al sobrenadante 2 mL de MCA, 5 mL de agua y 1,5 mL de cloroformo. Se forman dos fases, la acuosa (color claro) donde se encuentra la prolina y la clorofórmica (color verde) donde se encuentran los pigmentos. Se centrifuga a 2000 xg durante 2 min y en la fase acuosa se determina la prolina.

b. Cuantificación de prolina (Borsani et al., 1999):

- Extraer cuidadosamente la totalidad de fase acuosa y adicionar 1 mL de ácido acético glacial y 4 mL de reactivo ninhidrina.
- Calentar 1 h en baño de agua a 100 °C en tubos con tapa, parcialmente cerrados, para evitar evaporación.
- Enfriar a temperatura ambiente, agregar 4 mL de tolueno y en agitador mezclar vigorosamente durante 5 min.
- Dejar aclarar la fase de tolueno toda la noche y leer en el espectrofotómetro la absorbancia a 515 nm.

La concentración de prolina se determinó de acuerdo a una curva patrón con soluciones de prolina de concentración conocida.

Al momento de evaluación de prolina se extrajeron dos muestras de folíolos para cada genotipo en cada día para determinar el índice hídrico (IH), determinado como el peso fresco menos el peso seco, dividido el peso seco.

3.4.2. Conductancia estomática

La conductancia estomática se evaluó con un porómetro (Decagon, Inc.® Modelo SC-1) según las instrucciones del fabricante. Las medidas se realizaron en el folíolo central de diez hojas distintas pertenecientes a diferentes plantas y macetas en la primer hora de encendida la luz, a las 4 h y 8 h después de encendida la misma. La conductancia se determinó entre el día 35 y el día 40, o sea entre el día 0 y 5 de privación del riego.

Cuando la conductancia estomática fue inferior a 5 mmol/m²s se cambió del modo “Automático” de trabajo a “Manual”, en la configuración del porómetro. En este caso el tiempo necesario para obtener el valor de conductancia se determinó en 30 seg. Este valor surgió de pruebas realizadas previamente.

3.5. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE FLUORESCENCIA DEL PS II

Para cada genotipo en evaluación se utilizaron 4 macetas con 6 plantas cada una. Las mismas crecieron en las condiciones descritas en el ítem 3.2. Las plantas crecieron durante 40 días a capacidad de campo. A partir del día 40 post-siembra, dos macetas se mantuvieron a 100% capacidad de campo y dos se mantuvieron privadas de riego. Las determinaciones de emisión de fluorescencia del PS II se realizaron a las 48 h y 72 h de suprimido el riego en condiciones normales de temperatura (27 °C) y en condiciones definidas como alta temperatura (37°C, durante 30 min).

La emisión de fluorescencia del PS II se midió con un espectrómetro de fluorescencia portátil (Hansatech Instruments®) equipado con diodo emisor de luz, un detector de fluorescencia y un registrador. En los folíolos en los que se realizó la medición se colocaron durante 10 min pinzas para privar de luz la zona donde se determinó la fluorescencia. La fluorescencia mínima (F_o) fue medida durante un flash de luz modulada de $440 \mu\text{moles/m}^2 \cdot \text{s}$ durante 0,6 s. Para las medidas de fluorescencia máxima (F_m) se aplicó un flash de luz actínica de $900 \mu\text{moles/m}^2 \cdot \text{s}$ durante 0,8 s. 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.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables continuas W , discriminación isotópica del carbono, conductancia estomática, relación F_v/F_m , agua transpirada acumulada, evapotranspiración, evaporación e índice hídrico fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico InfoStat® versión 2008 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). La comparación de medias entre tratamientos se realizaron todas a través de la prueba de comparación de medias Tukey. Para determinadas comparaciones se utilizó LSD-Fisher, en este caso se indica en el texto si fue utilizado. A su vez se determinó la correlación entre EUA y discriminación isotópica del carbono para cada genotipo-tratamiento y para cada genotipo en los dos tratamientos juntos, en cada ensayo por separado, y para todos los tratamientos-genotipos de cada ensayo. Los análisis de correlación y las comparaciones de medias se realizaron con el programa indicado anteriormente.

3.6.1. Eficiencia Transpiratoria (W)

Se realizaron para cada genotipo-tratamiento 5 repeticiones (5 macetas, unidades experimentales) en un diseño completo al azar (DCA). Se planteó un modelo factorial que se puede escribir de la siguiente manera:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ij},$$

donde Y_{ij} corresponde a la W para el i -genotipo (San Gabriel, Tolerante o Sensible) y j -tratamiento (100 y 50 %CC); μ corresponde a la media poblacional de *L. corniculatus* (conceptual), A_i es el efecto del i -ésimo genotipo sobre W , B_j es el efecto del j -ésimo tratamiento sobre la W y $(AB)_{ij}$ es la posible interacción entre A_i y B_j . ε_{ij} corresponde al error experimental.

3.6.2. Discriminación isotópica del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$)

Se evaluó en el mismo ensayo de W , y se planteó el mismo modelo factorial, a diferencia que en este caso la Y_{ijk} corresponde al valor de $\Delta^{13}\text{C}$.

3.6.3. Parámetros de fluorescencia del PSII

Se realizaron para cada genotipo-tratamiento 2 repeticiones (2 macetas, unidades experimentales) en un diseño completo al azar (DCA). Se planteó un modelo factorial que se puede escribir de la siguiente manera:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + \varepsilon_{ijk},$$

donde Y_{ijk} corresponde a la relación F_v/F_m para el i -genotipo (San Gabriel, Tolerante o Sensible), j -tratamiento hídrico (50% y 100% CC) y k tratamiento térmico (alta o baja temperatura); μ corresponde a la media poblacional de *L. corniculatus* (conceptual), A_i es el efecto del i -ésimo genotipo sobre la relación F_v/F_m , B_j es el efecto del j -ésimo tratamiento sobre dicha relación, C_k es el efecto de la k -ésima temperatura (alta versus baja) y $(AB)_{ij}$, $(AC)_{ik}$, $(BC)_{jk}$, $(ABC)_{ijk}$ es la posible interacción entre los tratamientos. ε_{ijk} corresponde al error experimental.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESPUESTA DE LA CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA AL DÉFICIT HÍDRICO

La conductancia estomática mide la tasa de intercambio gaseoso entre la hoja y el medio a través del estoma. Este parámetro varía en relación a la luz, a la edad y al estado hídrico, y puede ser usado como criterio para evaluar el ajuste de las plantas ante variaciones de agua en el suelo o en la atmósfera.

La conductancia estomática de las líneas Sensible, Tolerante y San Gabriel se determinó con un porómetro, y se encontró variación de acuerdo al momento del día en que se midió, establecido según las horas de encendida la luz como mañana (menos de 1h), mediodía (4h) y tarde (8h), y al tiempo transcurrido desde la supresión del riego, días 1 al 4 día (Figura 13).

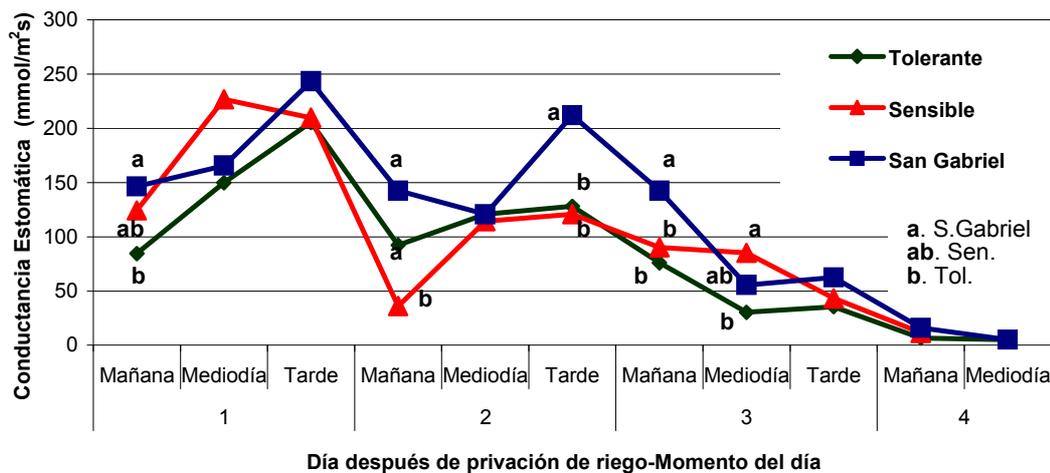


Figura 13. Evolución de la conductancia estomática de tres genotipos de Lotus. La conductancia se determinó en 10 folíolos de diferentes plantas durante 4 días después de suprimido el riego, a 1h, 4h y 8h de encendida la luz, consideradas como mañana, mediodía y tarde respectivamente. En el día 4, mañana, se indican en la figura los genotipos y las diferencia significativas entre ellos. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$), la ausencia de letras indica que los valores no difieren significativamente en cada momento.

El primer día después de suprimido el riego (día 1) los mayores valores de conductancia estomática se dieron a las 8 h después de encendida la luz (de tarde). Durante los primeros dos días los menores valores de conductancia

estomática para Sensible y Tolerante se registraron por la mañana, lo cual es esperable considerando que las medidas se tomaron durante la primera hora de encendida la luz. A partir del segundo día la conductancia estomática de las líneas Tolerante y Sensible permaneció constante a partir de las 4 h de luz (mediodía) hasta las 8 h de encendida (tarde), probablemente debido a la regulación del cierre estomático inducida por menores contenidos de agua. El cultivar San Gabriel parece no detectar los cambios en la disponibilidad hídrica durante los primeros 2 días, dado que mantiene los mismos valores de conductancia estomática y la respuesta de apertura dependiente de la luz.

A partir del día 3 y hasta el día 4, final del experimento, la conductancia estomática de los 3 cultivares descendió como también lo hizo el contenido de agua de la maceta. La regulación del estoma, en lo que respecta a la apertura inducida por luz se perdió al incrementar el déficit hídrico, y el mayor tiempo de permanencia en esa condición. A lo largo de los 4 días de evaluación, San Gabriel tuvo una clara tendencia (con momentos de significancia estadística) a mantener mayor conductancia estomática en comparación a Tolerante y Sensible, en relación a la disminución del contenido de agua (Figura 13).

Al igual que lo comunicado por Borsani et al. (2006), la conductancia estomática de *L. corniculatus* descendió a valores cercanos a 0 mmol/m².s después de cuatro días de déficit hídrico, ya con las plantas en condición de estrés hídrico.

Esta técnica es un indicador de la respuesta de la planta al déficit hídrico, que se determina con un equipo de manejo sencillo y bajo costo, con posibilidad de ser realizada a campo, pero que tiene como desventaja la alta variabilidad, incluso en medidas sucesivas en la misma hoja. Esto puede mejorarse aumentando la cantidad de repeticiones, pero a su vez esto genera un corrimiento espacial de las medidas en un momento determinado, y por lo tanto el uso de más de un porómetro y mayor número de plantas.

4.2. EMISION DE FLUORESCENCIA DEL FOTOSISTEMA II EN CONDICIONES DE ESTRÉS

El rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica del PSII, o relación F_v/F_m , es considerado un parámetro fácilmente medible, que da información sobre el estado funcional del aparato fotosintético en etapas tempranas de imposición de diferentes tipos de estrés. Por esto, ha sido utilizado en algunas plantas como un indicador de tolerancia-sensibilidad a sequía y temperatura (Lu y Zhang 1999, Maxwell y Johnson 2000).

Los valores de relación F_v/F_m medidos en los tres genotipos (Figura 14) concordaron con los resultados obtenidos en evaluaciones realizadas con el cultivar San Gabriel por Borsani et al. (2006), Borsani et al. (2007), en los que se obtuvieron relaciones F_v/F_m máximas de 0,87 en condiciones control y reducciones a valores de 0,80 cuando las plantas fueron sometidas simultáneamente a estrés hídrico y térmico.

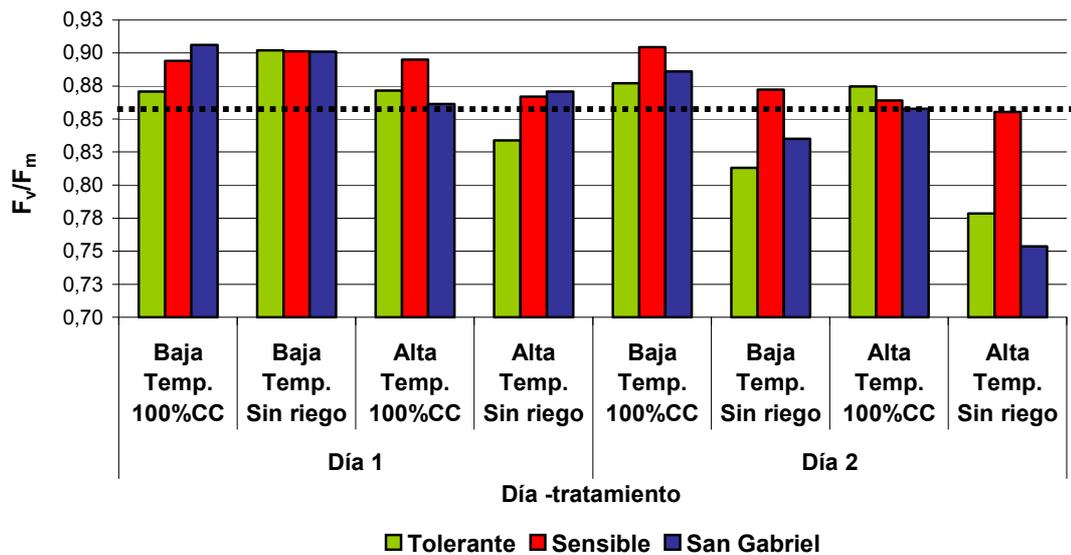


Figura 14. Relación F_v/F_m de tres genotipos de *Lotus* sometidos a déficit hídrico (sin riego) a temperaturas de 27°C (baja) y de 37°C (alta), y en las mismas temperaturas a 100% capacidad de campo (100% CC). La emisión de fluorescencia se midió a las 48 h (Día 1) y 72 h (Día 2) luego de la privación del riego. La línea punteada indica el valor promedio de relación F_v/F_m para todos los genotipos y tratamientos (0,86).

El promedio de relación F_v/F_m para todos los genotipos-tratamientos fue de 0,86 (Figura 14). Los valores de relación F_v/F_m máxima fueron de 0,91 y los mínimos de 0,75, ambos registrados en el cv San Gabriel, en los tratamientos contrastantes, es decir, día 1 baja temperatura, 100% CC respecto a día 2 alta temperatura, sin riego (Figura 14). De todas formas, las diferencias observadas no fueron significativas para ninguno de los genotipos en ninguno de los tratamientos. San Gabriel y la línea Tolerante mostraron una tendencia hacia menores valores al segundo día en condiciones de alta temperatura y sin riego (Figura 14).

Los resultados obtenidos confirman lo observado por Borsani et al. (2008), donde las respuestas de *Lotus* spp. asociadas con la funcionalidad del

fotosistema II no parecen estar asociadas a la magnitud del estrés y al ser las mediciones muy variables no se detectan diferencias entre genotipos.

De esta forma, en las condiciones de estrés y número de observaciones definidas en esta tesis, la relación F_v/F_m no es un indicador adecuado de tolerancia-sensibilidad al déficit hídrico para esta especie.

4.3. ACUMULACIÓN-OXIDACIÓN DE PROLINA

Dentro de las respuestas bioquímicas a situaciones de sequía la acumulación de prolina en células vegetales es frecuentemente observada y atribuida a la coordinación de dos mecanismos, el incremento de la síntesis y la disminución de la oxidación (Díaz et al., 2005d).

La acumulación de prolina en hojas se incrementó en los tres genotipos estudiados a partir del segundo día de privación de riego (Figura 15 A). A partir del tercer día la concentración de prolina en hojas aumentó considerablemente en todos los genotipos. En ese período en el cv. San Gabriel, la prolina en hoja pasó de 4 $\mu\text{mol/gPS}$ en el día 3 a 90 $\mu\text{mol/gPS}$ en el día 4 (Figura 15 A). A su vez, luego de unas 30 h de rehidratación, los tres genotipos oxidaron aproximadamente más de la mitad de la prolina acumulada (Figura 15 A, 6*).

En raíces, la concentración de prolina acumulada durante los días en que las plantas estuvieron privadas de riego, fue menor que en hojas (Figura 15 B).

La mayor biomasa aérea de la línea Tolerante (Cuadro 8) determinó una mayor pérdida de agua a partir del inicio de la supresión del riego (Figura 16) lo que pudo haber determinado la temprana acumulación de prolina en hojas y raíces.

En raíces de la línea Tolerante, cuando se percibe el descenso de agua al tercer día, se registró mayor acumulación de prolina que en los otros dos genotipos, en lo que puede considerarse un nivel fisiológicamente significativo. En el tratamiento de rehidratación, al igual que lo que sucedió en hojas, los contenidos de prolina a nivel radicular de la línea Tolerante fueron del orden del doble respecto a los otros dos genotipos, lo que podría indicar una menor capacidad de oxidación.

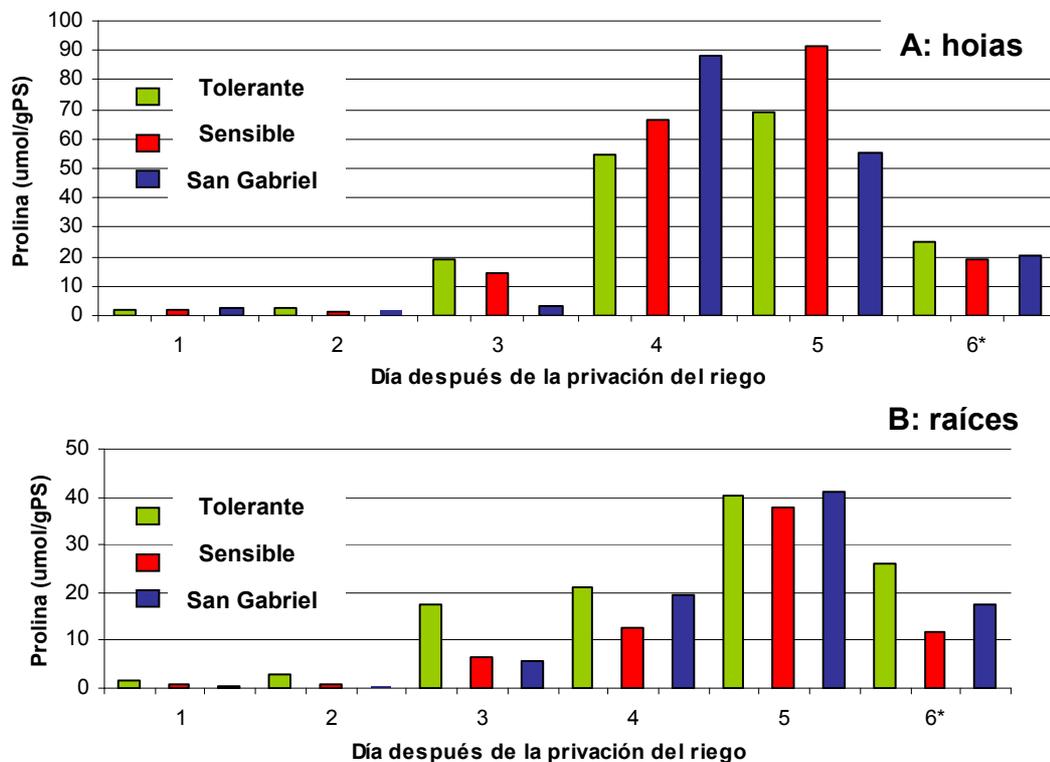


Figura 15. Evolución de la acumulación de prolina en hojas (A) y raíces (B) de tres genotipos de Lotus. En los tres genotipos se evaluó la acumulación de prolina durante 5 días en los que las plantas se privaron de riego. El día 5 las plantas se rehidrataron y a las 30 h (6*) se determinó la concentración de prolina para estimar el comportamiento de los genotipos en relación a la capacidad de oxidación de la misma.

La diferencia en la pérdida de agua de los tres genotipos (Figura 16) podría ser la causa de algunas diferencias en la cinética de acumulación de prolina en cada uno de ellos, por ejemplo la concentración de prolina en raíces en el día 3.

A pesar de que la raíz es el primer órgano en detectar la deficiencia de agua, no está descrito como un órgano de acumulación de prolina en Lotus (Sainz, 2006). Pero a diferencia de lo observado por Sainz (2006) los niveles en raíz fueron menores que en hojas, aunque estas diferencias podrían ser debidas a diferencias en la intensidad del déficit hídrico alcanzado.

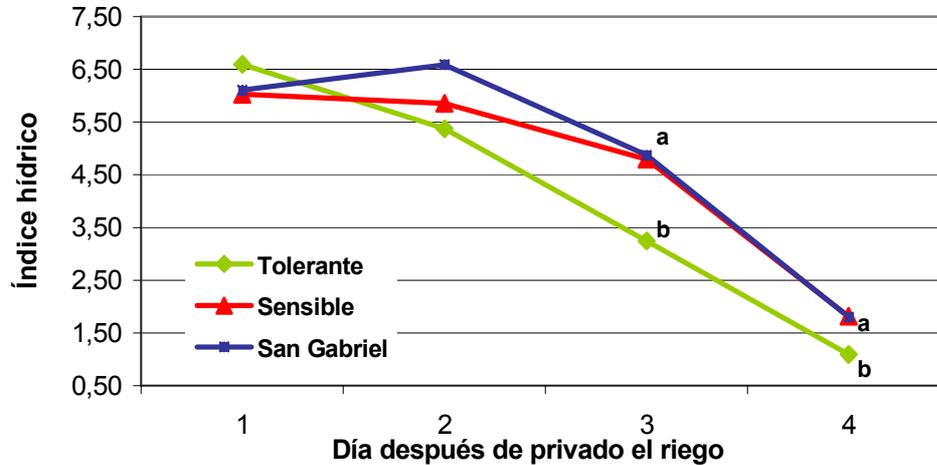


Figura 16. Índice hídrico (IH) de tres genotipos de Lotus en los primeros cuatro días después de privados de riego. La determinación del IH se realizó en las mismas plantas y momentos en que se hizo la evaluación de la concentración de prolina. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$, LSD-Fisher) en cada día, la ausencia de letras indica que los valores no difieren significativamente en cada día.

4.4. EVALUACIÓN DE LA W Y DISCRIMINACIÓN ISOTÓPICA

4.4.1. Primer ensayo

4.4.1.1. Evaluación de la producción de biomasa

La línea Tolerante tuvo mayor producción de biomasa seca inicial y final en el tratamiento 100% CC con respecto a los otros dos genotipos, no existiendo diferencias significativas en el tratamiento 50% CC (Cuadro 7).

Considerando el criterio de selección de las líneas Tolerante y Sensible (Messa et al., 2007) es acorde observar una mayor producción de biomasa de la línea Tolerante en relación a la línea Sensible.

Cuadro 7. Biomasa producida (g MS/maceta) por los tres genotipos. Se consideró al inicio (antes de privar el riego) y al final para cada tratamiento.

| Genotipo | Biomasa Inicial* | Biomasa Final | |
|-----------------|------------------|-----------------|---------------|
| | | 100% CC | 50% CC |
| Tolerante | 1,31 a | 5,28 a | 4,01 a |
| Sensible | 0,80 b | 4,07 b | 3,57 a |
| S. Gabriel | 0,96 b | 3,59 b | 3,23 a |
| Promedio | 1,02 | 4,31 a** | 3,60 b |

*Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). **Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Los valores de biomasa inicial presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para los tres órganos considerados entre las líneas Tolerante y Sensible, siendo mayores los valores en la línea Tolerante (Cuadro 8).

Cuadro 8. Producción de biomasa por raíz, tallo y hoja inicial, y final para cada genotipo y cada tratamiento (g MS/maceta).

| Genotipo | Biomasa Inicial (g) | | | Biomasa Final (g) | | | | | |
|-------------------|---------------------|--------------|--------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| | Raíz* | Tallo | Hoja | 100% CC | | | 50%CC | | |
| | | | | Raíz | Tallo | Hoja | Raíz | Tallo | Hoja |
| Tolerante | 0,33a | 0,42a | 0,56a | 2,05a | 1,55a | 1,67a | 1,68a | 1,07ab | 1,27a |
| Sensible | 0,17b | 0,24b | 0,40b | 1,22b | 1,43ab | 1,42ab | 1,14a | 1,19a | 1,24a |
| S. Gabriel | 0,17b | 0,32b | 0,48ab | 1,05b | 1,25b | 1,29a | 1,18a | 0,92b | 1,13a |
| Promedio** | 0,22c | 0,33b | 0,48a | 1,44a | 1,41a | 1,46a | 1,33a | 1,06b | 1,21ab |

*Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). **Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La biomasa final no presentó diferencias entre las dos líneas en el tratamiento 50% CC, y sólo se observaron diferencias a nivel de raíz en el tratamiento 100% CC (Cuadro 8).

A pesar de que la línea Tolerante presentó una mayor producción de biomasa en raíz, tallo y hoja en comparación a la línea Sensible, la mayor producción de biomasa por raíces de la primera, determinó una menor relación biomasa parte aérea/raíz (PA/R) (Cuadro 9). Por otro lado, se evidenció una reducción para todos los genotipos de la relación PA/R cuando las plantas crecieron a 50% CC en comparación a 100% CC (Cuadro 9). Dicha disminución fue significativa únicamente para el cultivar San Gabriel ($p \leq 0,10$, LSD-Fisher;

datos no mostrados). La reducción de la relación PA/R es debida a que en condiciones de estrés hídrico, disminuye el crecimiento relativo de la parte aérea en comparación al crecimiento del sistema radicular, ya que la mayor actividad del sistema radicular permitiría mayor absorción de agua y la reducción de la parte aérea disminuiría la evapotranspiración.

Cuadro 9. Relación entre biomasa PA/R inicial y biomasa PA/R final para cada genotipo-tratamiento.

| Genotipo | PA/R inicial* | PA/R final | |
|-------------------|---------------|-----------------|---------------|
| | | 100% CC | 50% CC |
| Tolerante | 3,20 <i>a</i> | 1,61 <i>a*</i> | 1,53 <i>a</i> |
| Sensible | 4,21 <i>a</i> | 2,76 <i>a</i> | 2,18 <i>a</i> |
| S. Gabriel | 4,80 <i>a</i> | 2,48 <i>a</i> | 1,85 <i>a</i> |
| Promedio** | 4,07 | 2,28 <i>a**</i> | 1,85 <i>b</i> |

*Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). **Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,10$, LSD-Fisher).

4.4.1.2. Estimación de la transpiración, evapotranspiración y evaporación

El cultivar San Gabriel tiene una menor producción de biomasa en comparación con las líneas Tolerante y Sensible (Cuadro 7). Sin embargo este cultivar no tuvo menor transpiración y/o evapotranspiración ni a 100% ni a 50% CC en comparación a las líneas Tolerante y Sensible (Cuadro 10), lo que posiblemente se deba a un menor cierre estomático (Figura 13). Las líneas Sensible y Tolerante fueron significativamente diferentes en el tratamiento 100% CC (130 mL de diferencia entre los dos genotipos), diferencias que posiblemente determinaron la mayor producción de biomasa de la línea Tolerante en ese tratamiento (Cuadro 7), considerando la elevada relación biomasa-transpiración.

Cuadro 10. Agua transpirada acumulada y evapotranspiración para cada genotipo-tratamiento y para cada tratamiento.

| Genotipo | Agua Transpirada Acumulada Promedio (mL)* | Evapotranspiración (mL) | | Agua Transpirada Acumulada (mL) | |
|-------------------|---|-------------------------|-----------------|---------------------------------|--------------|
| | | 100% CC# | 50% CC | 100% CC# | 50% CC |
| Tolerante | 700 <i>a</i> | 1154,36 <i>a</i> | 583,00 <i>a</i> | 920 <i>a</i> | 480 <i>a</i> |
| Sensible | 630 <i>a</i> | 1028,75 <i>a</i> | 583,89 <i>a</i> | 790 <i>b</i> | 480 <i>a</i> |
| S. Gabriel | 660 <i>a</i> | 1120,70 <i>a</i> | 548,07 <i>a</i> | 880 <i>ab</i> | 440 <i>a</i> |
| Promedio | 663 | 1101,27 <i>a**</i> | 571,65 <i>b</i> | 860 <i>a**</i> | 460 <i>b</i> |

*Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). **Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). #Diferencias significativas con $p \leq 0,10$ (LSD-Fisher).

La mayor cantidad de biomasa producida por la línea Tolerante se asoció a una mayor transpiración y evapotranspiración a lo largo de los 16 días del ensayo, con diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en transpiración, en comparación a Sensible cuando las plantas crecieron a 100% CC (Cuadro 10). No hubo diferencias significativas en los volúmenes de agua evapotranspirada por día, en la mayoría de los días (Figura 17). Por lo tanto, las diferencias finales observadas se deben a la acumulación de diferencias no significativas durante la duración del ensayo. El promedio diario de evapotranspiración durante los 16 días de ensayo en el tratamiento 100% CC, fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en Tolerante y San Gabriel que en la línea Sensible (en mL/día: Tolerante 72, San Gabriel 70 y Sensible 64). Esto agrega elementos a la hipótesis planteada en relación a la menor regulación del cierre estomático por parte del cv San Gabriel en relación a la línea Tolerante, ya que produce significativamente menos biomasa que éste y evapotranspira la misma cantidad de agua.

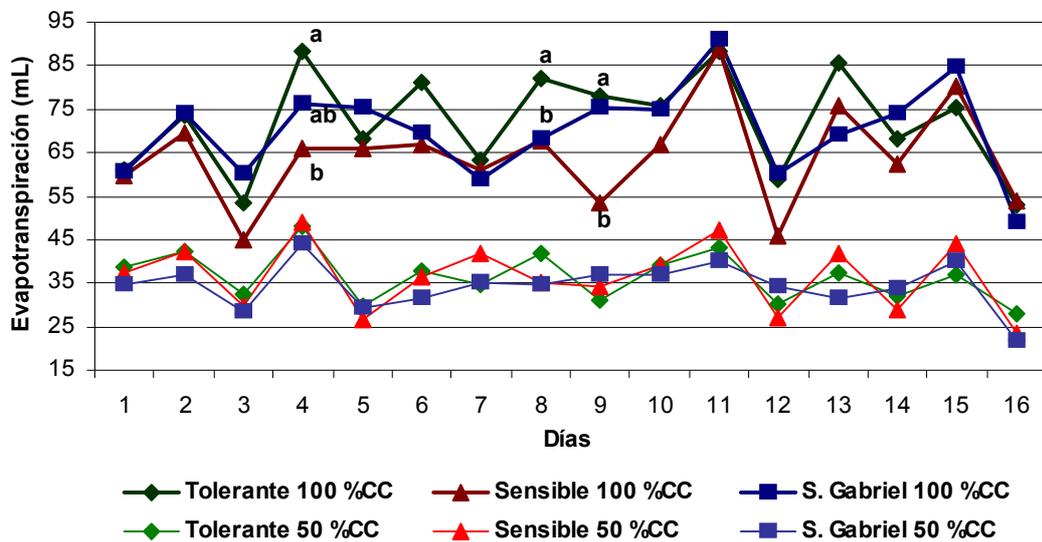


Figura 17. Evolución de la evapotranspiración de los tres genotipos en los dos tratamientos (50% CC y 100% CC) durante los 16 días de evaluación. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de cada día ($p \leq 0,05$), la ausencia de letras indica que los valores no difieren significativamente en cada día.

Los patrones de variación diaria de la evapotranspiración (Figuras 17 y 18) podrían deberse a efectos del tamaño de maceta y tamaño de las plantas, ya que las mismas consumirían en el período inter-riego (24 h) el agua suministrada diariamente. Esto determina que en la práctica la cantidad de agua en los tratamientos 50 y 100% CC se da efectivamente en el momento del riego, y después el contenido hídrico desciende debido al consumo por las plantas y a la evaporación.

Para el tratamiento 50% CC no se registraron diferencias significativas en la evapotranspiración entre los tres genotipos, en ninguno de los días del ensayo (Figura 18), ni en los promedios diarios de los tres genotipos (en mL/día: San Gabriel 34, Tolerante y Sensible 36). A su vez, se observó un patrón relativamente homogéneo de evapotranspiración desde el inicio al final del ensayo que se mantuvo en un rango de variación aproximado de 25 a 45 mL, no existiendo aumentos en este parámetro en relación al aumento de la biomasa ocurrido en esos 16 días (Figura 18, Cuadro 7).

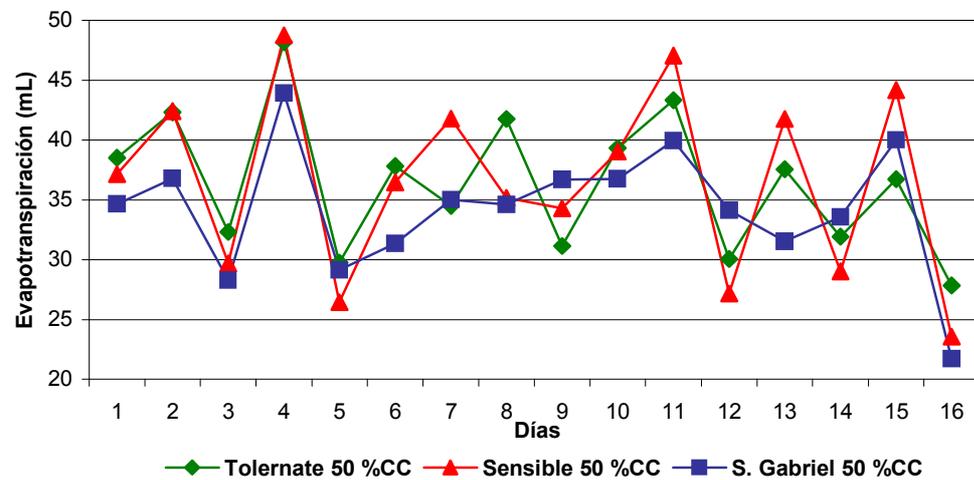


Figura 18. Evolución de la evapotranspiración de los tres genotipos en el tratamiento 50% CC.

Comparando los niveles diarios de evapotranspiración entre los tratamientos 50 y 100% CC se determinó una mayor correlación entre éstos ($r=0,85$; $p\leq 0,01$) en la línea Tolerante (Figura 19), seguida por el cultivar San Gabriel ($r=0,71$; $p\leq 0,01$), y por último la línea Sensible ($r=0,49$; $p\leq 0,1$). La mayor correlación entre tratamientos para la línea Tolerante estaría indicando un mejor ajuste estomacal de este genotipo con respecto a los otros dos genotipos evaluados, tal como fue evidenciado en las medidas de conductancia estomacal y discriminación isotópica del carbono (ítem 4.4.1.6).

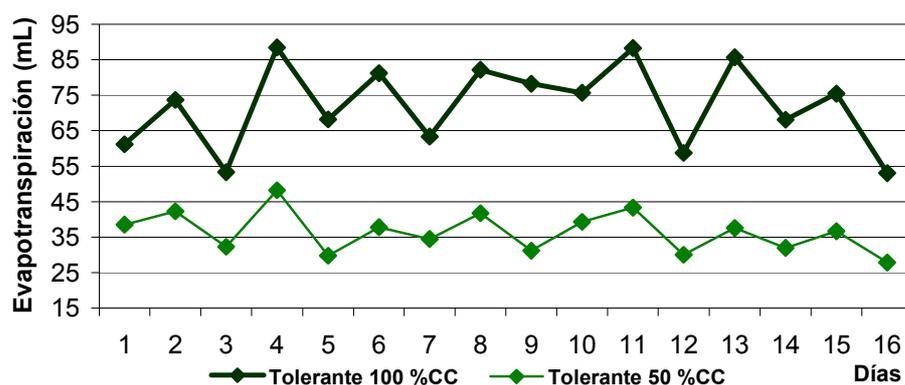


Figura 19. Evolución de la evapotranspiración de la línea Tolerante en cada tratamiento (50 y 100% CC).

Los resultados obtenidos en las macetas de evaporación presentaron un coeficiente de variación (CV) de 58%, y no existieron diferencias significativas entre los tratamientos a 50 y 100% CC, con lo cual se omitieron los mismos y se utilizaron los datos pertenecientes al segundo ensayo para todos los cálculos correspondientes (Cuadro 17).

4.4.1.3. Eficiencia transpiratoria (*W*)

La eficiencia transpiratoria (*W*) es una de las posibles formas de evaluar la EUA (Jones, 2004). La misma se determinó como la relación entre producción de biomasa y cantidad de agua transpirada por las plantas.

Cuando se evaluó *W* se observaron diferencias entre los genotipos y los tratamientos evaluados (Cuadro 11), ya que ambos factores planteados en el modelo fueron significativos ($p \leq 0,05$), pero no así la interacción genotipo x tratamiento ($p > 0,10$). Los tres genotipos presentaron en el tratamiento 50% CC una mayor *W* que en el tratamiento 100% CC. La mayor *W* en condiciones de déficit hídrico ya ha sido observada en diferentes especies (Jonson et al. 1990, Ehleringer et al. 1993a, Wright et al. 1993, Rebetzke et al. 2002).

El cultivar San Gabriel mostró una menor *W* con respecto a las líneas Sensible y Tolerante, con diferencias significativas, en el tratamiento 100% CC (Cuadro 11). Esta menor *W* puede ser el resultado de un menor cierre estomático (Figura 13), alta evapotranspiración y baja producción de biomasa en relación a la cantidad de agua evapotranspirada (Cuadros 7 y 10). En el tratamiento 50% CC no se observaron diferencias significativas en *W* entre los genotipos estudiados.

Cuadro 11. *W* para cada genotipo-tratamiento.

| Genotipo | <i>W</i> (g/kg) | |
|-------------------|-----------------|--------|
| | 100% CC | 50% CC |
| Tolerante | 4,34 a | 5,66 a |
| Sensible | 4,11 a | 5,83 a |
| S. Gabriel | 2,96 b | 5,12 a |
| Promedio | 3,80 b** | 5,54 a |

*Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). **Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Las diferencias observadas en producción de biomasa (Cuadro 7) y en transpiración (Cuadro 10) a 100% CC entre las líneas Sensible y Tolerante

estaría indicando que la selección divergente fue útil para generar diferencias en estos parámetros, aunque tales diferencias no se tradujeron en diferencias en W . A pesar de que en no existieron diferencias en la evapotranspiración- evaporación y biomasa final al 50% CC entre las selecciones y el material parental (cv San Gabriel), las diferencias significativas observadas entre las dos selecciones podrían indicar que se va en la dirección correcta. Altier et al. (2000) obtuvieron también este tipo de resultados con un ciclo de selección divergente de resistencia a *Fusarium oxysporum* en *Lotus corniculatus*. De acuerdo a esto, un segundo ciclo de selección podría aumentar la divergencia entre las líneas y así detectar diferencias significativas en W .

Se observó una tendencia a una mayor W para la línea Tolerante en relación a la línea Sensible en el tratamiento 100% CC, opuesta a lo que sucedió en el tratamiento 50% CC (Cuadro 11), sin embargo, como fue mencionado, la interacción genotipo x tratamiento no fue significativa ($p > 0,10$). Los valores de W al 100% CC se encuentran dentro de los reportados para otras especies de leguminosas como las del género *Arachis* los cuales se encuentran entre 2,96 a 4,58 g/kg en experimentos sin déficit hídrico, pero fueron superiores a los observados en condiciones de estrés hídrico para estas especies (3,41 a 4,74 g/kg) (Wright et al., 1993).

4.4.1.4. Discriminación de isótopos del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$)

El hecho que el proceso fotosintético tenga la capacidad de fraccionar los isótopos del carbono, permite el uso de éstos como una herramienta para evaluar la EUA (Bacon, 2004). Varios años de investigación demuestran la existencia de una fuerte relación negativa entre la discriminación isotópica del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$) y la EUA.

Durante la fotosíntesis ocurre discriminación isotópica o fraccionamiento isotópico en contra del isótopo ^{13}C , lo que implica que los carbohidratos formados por la planta tienden a tener menos ^{13}C que ^{12}C , en comparación al carbono a partir del cual se formaron.

Al día 30, es decir cuando se estableció el riego diferencial de cada tratamiento, se analizó el $\Delta^{13}\text{C}$ de los tres genotipos ($\Delta^{13}\text{C}$ inicial). En ese momento la línea Tolerante tuvo el menor valor de $\Delta^{13}\text{C}$ (discriminación isotópica) significativamente diferente a los otros dos genotipos (Cuadro 12). Este hecho puede deberse a la tendencia a menores valores de conductancia estomática registrados en la línea Tolerante (Figura 13), así como significativa mayor W al 100% CC en comparación al cv San Gabriel.

Cuadro 12. Discriminación isotópica al inicio para cada genotipo y al final para cada genotipo-tratamiento.

| Genotipo | $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) Inicial* | $\Delta^{13}\text{C}$ Final (‰) | |
|-------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---------|
| | | 100% CC | 50% CC |
| Tolerante | 25,69 b | 26,29 b | 24,64 a |
| Sensible | 27,04 a | 26,44 b | 24,93 a |
| S. Gabriel | 27,14 a | 27,30 a | 25,18 a |
| Promedio | 26,62 | 26,68 a** | 24,92 b |

*Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). **Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Estudios en *Phaseolus vulgaris* y *P. lunatus* indican que los menores valores de $\Delta^{13}\text{C}$ están positivamente asociados a una menor conductancia estomática (correlaciones significativas mayores a 0,80) debido a que los cambios en la difusión de CO_2 a través de los estomas determinan cambios en la c_i (concentración intercelular de CO_2), lo que finalmente determina cambios en el delta de acuerdo a la ecuación 11 y en la EUA (W) de acuerdo a la ecuación 2 (Ehleringer 1990b, Ehleringer et al. 1990a).

El cv San Gabriel mostró un valor de $\Delta^{13}\text{C}$ inicial y final significativamente mayor que la línea Tolerante, lo que puede explicarse por las mismas razones que determinarían la baja W de San Gabriel respecto a ésta.

Al igual que lo determinado para los valores de W , en el tratamiento 50% CC no se observaron diferencias significativas en los valores de $\Delta^{13}\text{C}$ entre los tres genotipos.

De estos resultados se destaca la relación clara entre los valores de W y $\Delta^{13}\text{C}$, ya que en el tratamiento 100% CC, las líneas Tolerante y Sensible no fueron diferentes entre sí, pero ambas fueron diferentes al cv San Gabriel, tanto para W como para $\Delta^{13}\text{C}$. En cambio a 50% CC no se evidenciaron diferencias significativas entre ningún genotipo para ninguno de los parámetros evaluados: W y $\Delta^{13}\text{C}$.

Quizás a mayores niveles de déficit hídrico, por ej. 30% CC, o bien con períodos de déficit hídrico más prolongadas, por ej. 25 días podrían detectarse mayores diferencias.

4.4.2. Segundo ensayo

4.4.2.1. Evaluación de la producción de biomasa

No se encontraron diferencias significativas en la producción de biomasa inicial y final entre los tres genotipos. Sin embargo, se encontraron diferencias en la biomasa producida promedio de los tres genotipos entre los dos tratamientos (Cuadro 13).

Cuadro 13. Biomasa producida (g MS/maceta) por los tres genotipos. Se consideró al inicio (antes de privar el riego) y al final para cada tratamiento.

| Genotipo | Biomasa Inicial* | Biomasa Final | |
|-------------------|------------------|---------------|--------|
| | | 100% CC | 50% CC |
| Tolerante | 1,84 a | 4,45 a | 3,03 a |
| Sensible | 1,57 a | 4,11 a | 2,63 a |
| S. Gabriel | 2,16 a | 5,27 a | 3,07 a |
| Promedio | 1,86 | 4,61 a** | 2,91 b |

*Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). **Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

A diferencia de lo observado en el primer ensayo, no se observaron diferencias en la biomasa inicial producida por raíz y tallo entre los tres genotipos evaluados, sólo se encontraron diferencias entre la línea Tolerante y San Gabriel en comparación a Sensible en la biomasa de hoja (Cuadro 14).

La biomasa final por hojas no presentó diferencias entre las líneas Tolerante y Sensible en el tratamiento 100% CC, pero sí en el tratamiento 50% CC, en el cual la línea Tolerante produjo más biomasa que la línea Sensible (Cuadro 14).

Comparando el primer ensayo con el segundo se observó una menor producción de biomasa inicial en el primero, pero mayor producción de éste en biomasa final total. Dentro de cada tratamiento, la producción de biomasa fue mayor en 100% CC en el segundo ensayo con respecto al primero, pero lo opuesto ocurrió en el tratamiento 50% CC.

Cuadro 14. Producción de biomasa por raíz, tallo y hoja inicial, y final para cada genotipo y cada tratamiento (g MS/maceta).

| Genotipo | Biomasa Inicial (g) | | | Biomasa Final (g) | | | | | |
|-------------------|---------------------|-------|-------|-------------------|-------|--------|--------|-------|--------|
| | | | | 100% CC | | | 50% CC | | |
| | Raíz* | Tallo | Hoja | Raíz | Tallo | Hoja | Raíz | Tallo | Hoja |
| Tolerante | 1,09a | 0,30a | 0,46a | 1,59ab | 1,28a | 1,57a | 1,25a | 0,77a | 1,02a |
| Sensible | 0,98a | 0,23a | 0,36b | 1,41b | 1,41a | 1,29a | 1,28a | 0,59a | 0,76b |
| S. Gabriel | 1,32a | 0,31a | 0,53a | 2,32a | 1,43a | 1,52a | 1,38a | 0,73a | 0,95ab |
| Promedio** | 1,13a | 0,28b | 0,45b | 1,78a | 1,37b | 1,46ab | 1,30a | 0,70b | 0,91b |

*Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). **Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La relación PA/R inicial del segundo fue destacadamente menor a lo encontrado en el primer ensayo (4,07 versus 0,71). Esto se debe a la diferencia registrada en el peso de raíz de los tres genotipos (Cuadros 8 y 14). Al igual que en el primer ensayo, en el segundo ensayo se observó una reducción de la relación PA/R solamente para las líneas Tolerante y Sensible cuando las plantas crecieron a 50% CC en comparación a 100% CC (Cuadro 15). Dicha disminución fue significativa únicamente para la línea Sensible ($p \leq 0,05$, datos no mostrados). Llama la atención la ausencia de cambios en la relación PA/R para el cv San Gabriel cuando se evaluó en condiciones de déficit hídrico (Cuadro 15), lo que parece estar asociado a un mayor rendimiento de raíz en 100% CC, valor especialmente alto (Cuadro 14).

Cuadro 15. Relación entre biomasa PA/R inicial y biomasa PA/R final para cada genotipo-tratamiento.

| Genotipo | PA/R inicial* | PA/R final | |
|-------------------|---------------|------------|--------|
| | | 100% CC | 50% CC |
| Tolerante | 0,78 a | 1,87 a* | 1,52 a |
| Sensible | 0,65 a | 2,06 a | 1,10 a |
| S. Gabriel | 0,71 a | 1,32 a | 1,31 a |
| Promedio** | 0,71 | 1,75 a** | 1,31 b |

*Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). **Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,10$, LSD-Fisher).

4.4.2.2. Estimación de la transpiración, evapotranspiración y evaporación

Los valores de transpiración promedio de los dos tratamientos (agua transpirada acumulada promedio) del segundo ensayo fueron menos de la mitad de los registrados en el primer ensayo (320 versus 663 mL) (Cuadros 10 y 16).

El análisis estadístico del segundo ensayo evidenció la existencia de variabilidad no controlada, lo que aumento considerablemente el error experimental (mayor coeficiente de variación, CV). Los elevados CV en varios de los parámetros evaluados en este ensayo fueron un impedimento estadístico para poder analizarlo conjuntamente con el primer ensayo.

Cuadro 16. Agua transpirada acumulada y evapotranspiración para cada genotipo-tratamiento y para cada tratamiento.

| Genotipo | Agua Transpirada Acumulada Promedio (mL)* | evapotranspiración Total (mL) | | Agua Acumulada Transpirada (mL) | |
|-----------------|---|-------------------------------|--------|---------------------------------|--------|
| | | 100% CC# | 50% CC | 100% CC# | 50% CC |
| Tolerante | 300 a | 697 b | 244 a | 460 b | 140 a |
| Sensible | 280 a | 660 b | 255 a | 420 b | 150 a |
| S. Gabriel | 370 a | 780 a | 315 a | 540 a | 210 a |
| Promedio | 320 | 712 a** | 271 b | 470 a** | 160 b |

*Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). **Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). # Diferencias significativas con $p \leq 0,10$ (LSD-Fisher).

El coeficiente de variación (CV) del agua transpirada acumulada del segundo ensayo fue mayor a 50%, en cambio en el primer ensayo fue cercano a 10%. El CV es una de las formas de evaluar la precisión y en términos generales un CV aceptable debería estar en torno al 20% como máximo, con lo cual el segundo ensayo es de dificultosa interpretación para esta variable. A su vez los valores de transpiración (agua transpirada acumulada) para cada tratamiento (50 y 100% CC) presentaron diferencias importantes en los CV entre ensayos (11% versus 21%; primer y segundo ensayo, respectivamente). Estas diferencias en los CV entre ensayos podrían asignarse a diferencias en la producción de biomasa entre el primer y segundo ensayo debido posiblemente a problemas de calidad fisiológica (que determinó diferencias en el crecimiento de las plantas) en de las semillas utilizadas en el segundo ensayo. Esto fue más evidente en el caso de la línea Tolerante (menor disponibilidad de semilla que Sensible), y no sucedió en el cv San Gabriel, del cual se contó con cantidades suficientes de semilla de calidad. Otra posible fuente de variación podría ser el uso de métodos gravimétricos en la estimación de los consumos de agua.

A pesar de la elevada variabilidad no controlada, el patrón de evapotranspiración diaria fue similar en los tres genotipos (Figura 20), con diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la evapotranspiración diaria promedio solo entre San Gabriel y Sensible (52 versus 44 mL/d, respectivamente). La línea Tolerante no evidenció diferencias con ninguno de los otros dos genotipos (46 mL/d).

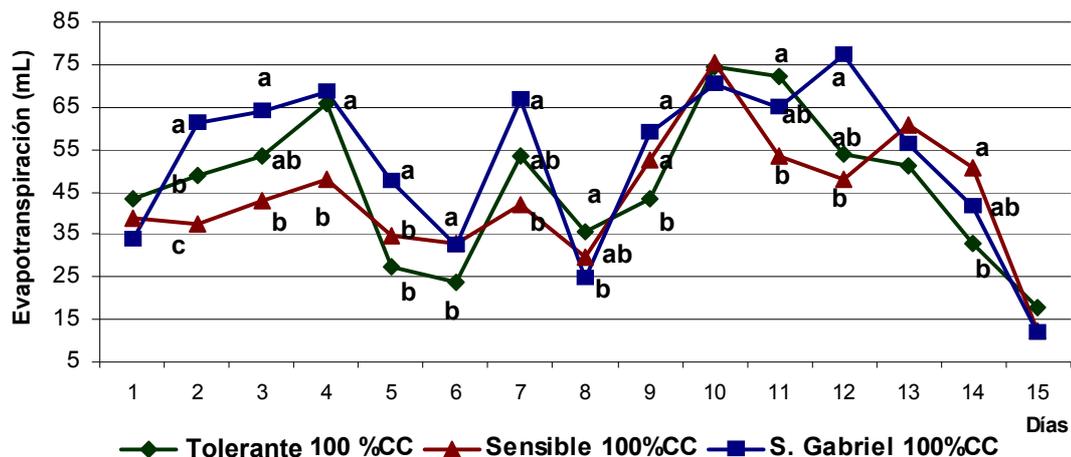


Figura 20. Evolución de la evapotranspiración de los tres genotipos en el tratamiento 100% CC. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de cada día ($p \leq 0,05$), la ausencia de letras indica que los valores no difieren significativamente en cada día.

Los patrones de variación diaria de la evapotranspiración (Figuras 20 y 21) podrían ser debidos a efectos del tamaño de maceta y tamaño de las plantas y cambios en la duración del período inter-riego, lo que provocó cambios bruscos en la evapotranspiración en ciertos días (ej. días 5 y 8). Los cambios en la humedad del aire también pueden provocar cambios en la evapotranspiración.

Para el tratamiento 50% CC no existieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el promedio diario de evapotranspiración en los 15 días de ensayo, entre las líneas Tolerante y Sensible (16 versus 17 mL/d, respectivamente) ni tampoco para cada día por separado (Figura 21). Sin embargo, el cv San Gabriel fue significativamente diferente ($p \leq 0,05$) para el promedio de los 15 días con respecto a los otros dos genotipos (21 mL/d) y no así para la evapotranspiración en cada día (Figura 21). Al igual de lo que sucedió en el primer ensayo, no se registró un aumento de la evapotranspiración durante los 15 días de ensayo en relación al aumento de la biomasa ocurrido en ese período (Figuras 20 y 21, Cuadro 13).

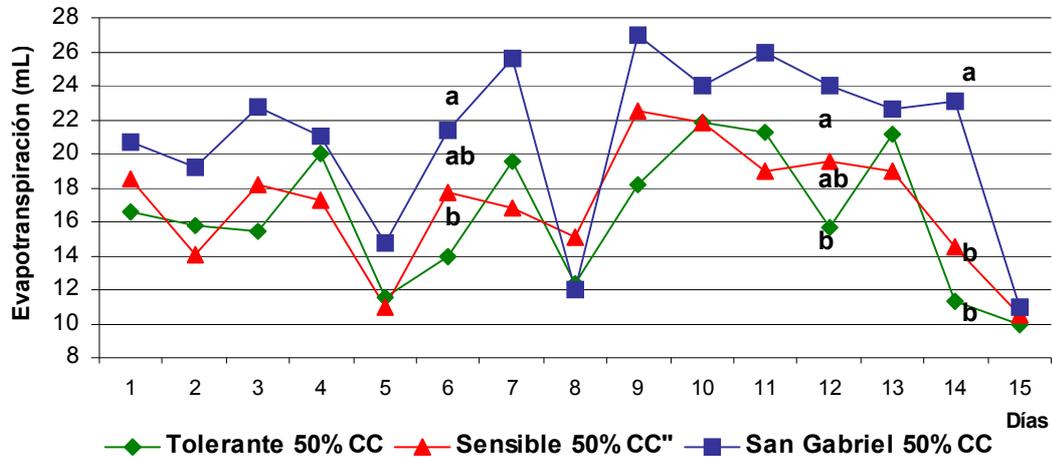


Figura 21. Evolución de la evapotranspiración de los tres genotipos en el tratamiento 50% CC. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de cada día ($p \leq 0,05$), la ausencia de letras indica que los valores no difieren significativamente en cada día.

La cantidad de agua evaporada de las macetas sin plantas fue significativamente diferente entre los tratamientos 50% CC y 100% CC (Cuadro 17). Estas diferencias podrían deberse a que en el tratamiento 50% el agua se encuentra más retenida en el sustrato (potenciales hídricos más negativos). El CV total observado se considera en términos generales adecuado para el ensayo (Cuadro 17).

Cuadro 17. Valores de evaporación para cada tratamiento.

| Tratamiento | Evaporación (mL)* | CV % | CV % Total |
|-------------|-------------------|-------|------------|
| 50% CC | 107,54 b** | 5,19 | 21,05 |
| 100% CC | 239,29 a | 21,25 | |

**diferencias significativas con $p \leq 0,10$ (LSD-Fisher).

4.4.2.3. Eficiencia transpiratoria (W)

Los valores de W promedio de los dos tratamientos y los promedios de cada tratamiento del segundo ensayo fueron superiores a los registrados en el primer ensayo (Cuadro 18). Estas diferencias pueden ser debidas a diferencias en la transpiración (agua transpirada acumulada), que fue más del doble en el primer ensayo con respecto al segundo y no a la biomasa que fue superior en el primer ensayo respecto al segundo.

Cuadro 18. *W* para cada genotipo-tratamiento.

| Genotipo | <i>W</i> (g/kg) | |
|-------------------|-----------------|---------|
| | 100% CC | 50% CC |
| Tolerante | 5,70 a | 9,23 a |
| Sensible | 6,07 a | 7,10 ab |
| S. Gabriel | 5,77 a | 3,72 b |
| Promedio | 5,84 a** | 6,68 a |

*Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). **Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Otra diferencia importante de este ensayo en comparación al primero es la existencia de interacción genotipo x tratamiento significativa ($p \leq 0,05$). Dentro de esta interacción no se observaron diferencias significativas en el tratamiento 100% CC entre los genotipos y sí se registraron diferencias en el tratamiento 50% CC.

El factor genotipo tuvo efecto significativo ($p \leq 0,05$) ya que los valores de *W* al 50% CC fueron diferentes entre la línea Tolerante y el cv San Gabriel y no así entre las líneas Tolerante y Sensible y entre Sensible y San Gabriel (Cuadro 18). A pesar de la importante diferencia registrada entre Sensible y San Gabriel en el tratamiento 50% CC, la elevada variabilidad experimental no controlada (CV del tratamiento 50% CC en el segundo ensayo mayor a 30% versus 15% en el primer ensayo) no permitió diferenciarlos estadísticamente. Al igual que lo indicado para el primer ensayo, el tratamiento 50% CC tuvo una mayor *W* (Cuadro 18), pero no significativamente diferente del tratamiento 100% (el factor tratamiento planteado en el modelo no fue significativo, $p > 0,10$), con lo cual resulta evidente la menor precisión de este ensayo.

Inesperadamente, el cv San Gabriel en el tratamiento 50% CC tuvo una menor *W* con respecto al tratamiento 100% CC, mientras que en el primer ensayo se observó un incremento para este cv de 73% en el tratamiento de déficit hídrico (50% CC). Esto es contradictorio a lo encontrado en varios trabajos (Johnson et al. 1990, Ehleringer et al. 1993b, Wright et al. 1993, Rebetzke et al. 2002). Dicho comportamiento puede haber sido ocasionado por la elevada biomasa producida en el tratamiento 100% CC (Cuadro 13) y la elevada transpiración del tratamiento 50% CC (Cuadro 16). Una vez más los CV de *W* fueron superiores al 30% en el tratamiento 100% CC, con lo cual los resultados son en términos generales de baja precisión, en comparación a los obtenidos en el primer ensayo (CV de *W* tratamiento 100% CC 17%).

4.4.2.4. Discriminación de isótopos del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$)

El $\Delta^{13}\text{C}$ inicial no fue significativamente diferente entre genotipos (Cuadro 19). El $\Delta^{13}\text{C}$ final promedio fue significativamente menor para la línea Tolerante, lo que concuerda con las observaciones del primer ensayo, y con los valores de conductancia estomática registrados para este genotipo (Cuadro 19). Esas diferencias se determinaron también en el tratamiento 50% CC.

Cuadro 19. Discriminación isotópica al inicio para cada genotipo y al final para cada genotipo-tratamiento.

| Genotipo | $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) Inicial* | $\Delta^{13}\text{C}$ Final (‰) | |
|-------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---------|
| | | 100% CC | 50% CC |
| Tolerante | 27,33 a | 28,29 a | 24,26 b |
| Sensible | 27,34 a | 28,80 a | 25,41 a |
| S. Gabriel | 26,93 a | 28,42 a | 25,92 a |
| Promedio | 27,2 | 28,51 a** | 25,20 b |

*Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). **Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

4.5. RELACIONES ENTRE W Y DISCRIMINACIÓN ISOTÓPICA

4.5.1. Primer ensayo

Al igual que lo reportado en un elevado número de trabajos con varias especies (Hubick et al. 1986, Martin y Thorstenson 1988, Hubick y Farquar 1989, Ehleringer 1990b, Johnson et al. 1990, Hubick y Gibson 1993, Condon et al. 2002, Ebdon y Kopp 2004, Impa et al. 2005), en este ensayo se determinó una fuerte correlación negativa ($r=-0,84$, $p \leq 0,05$) entre la eficiencia transpiratoria (W) y la discriminación isotópica del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$) (Figura 22).

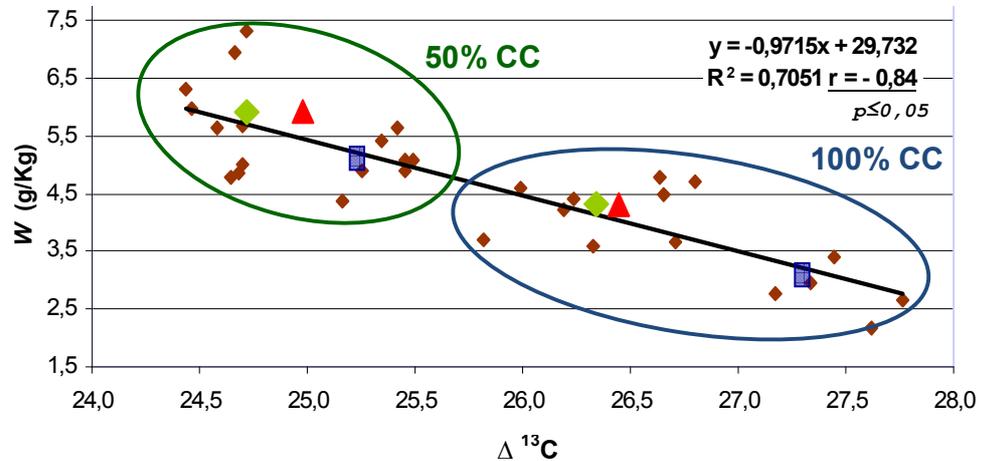


Figura 22. Relación entre W y discriminación isotópica ($\Delta^{13}\text{C}$) para los tres genotipos y los dos tratamientos ($n=30$). Se indican los promedios (aproximados) para la líneas Tolerante (rombo verde), Sensible (triángulo rojo) y cv San Gabriel (rectángulo azul) en cada tratamiento (50 y 100% CC).

La relación negativa entre W y $\Delta^{13}\text{C}$ se basa en la ecuación (ecuación 13) desarrollada por Farquhar et al. (1989):

$$W = \frac{c_a(b - d - \Delta)(1 - \phi_c)}{1,6v(1 + \phi_w)}$$

donde c_a es la presión ambiental de CO_2 , b es la discriminación debida a la carboxilación de la RuBisCO (principalmente b_3 , 30‰ corregido por el efecto de la disolución del CO_2), d es la corrección de la tasa de asimilación, ϕ_c es la fracción de carbono fijada que se pierde por respiración, ϕ_w es la fracción de agua que se pierde durante la noche si los estomas no están completamente cerrados y v es la diferencia de presión de vapor entre los espacios intercelulares y la atmósfera. La ausencia de correlación y la presencia de correlaciones positivas significativas para ciertas combinaciones de genotipos-tratamientos observadas en este ensayo (Cuadro 20) podría deberse a variaciones en v , lo que de acuerdo con Farquhar et al. (1989) provocaría que aquellos genotipos que pueden crecer más cuando v es menor tendrán mayor W a un mismo Δ .

Al igual que lo obtenido por Wright et al. (1993) se observó una alta correlación significativa entre W y $\Delta^{13}\text{C}$ para el conjunto de genotipos en condiciones sin déficit hídrico (100% CC) y no así en el tratamiento de déficit hídrico (50% CC) (Cuadro 20).

Cuadro 20. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre W y $\Delta^{13}\text{C}$ para los dos tratamientos y para cada genotipo-tratamiento (primer ensayo).

| Genotipo | Coeficiente de correlación $W-\Delta^{13}\text{C}$ * | Coeficiente de correlación $W-\Delta^{13}\text{C}$ ** | |
|-------------------|--|---|---------------------|
| | | 100% CC | 50% CC |
| Tolerante | -0,58 (0,08) *** | 0,71 (0,18) | -0,15 (0,81) |
| Sensible | -0,91 (2,9E-04) | -0,79 (0,11) | -0,70 (0,19) |
| S. Gabriel | -0,93 (1,1E-04) | -0,71 (0,18) | -0,27 (0,66) |
| TOTAL | -0,84 (6,6E-09) | -0,75 (1,4E-03) | -0,42 (0,12) |

*para los dos tratamientos (n=10), **para cada tratamiento (n=5), ***el valor dentro del paréntesis corresponde al valor p.

Experimentalmente se ha confirmado una relación lineal negativa entre $\Delta^{13}\text{C}$ y EUA en condiciones de déficit hídrico, para trigo (Condon et al., 2002), cebada (Hubick y Farquar, 1989), gramíneas pratenses (Johnson et al. 1990, Ebdon y Kopp 2004), maní (Hubick et al., 1986), poroto (Ehleringer, 1990b), tomate (Martin y Thorstenson 1988, Martin et al. 1999), algodón (Hubick y Gibson, 1993) y arroz (Impa et al., 2005) entre otras especies. Esta relación no fue observada cuando se analizaron los genotipos por separado dentro de cada tratamiento (Cuadro 20).

4.5.2. Segundo ensayo

También en este ensayo se observó un correlación negativa significativa ($r=-0,57$, $p\leq 0,05$) entre la eficiencia transpiratoria (W) y la discriminación isotópica del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$) (Figura 23). A pesar de la baja precisión, la relación entre estos dos parámetros se mantuvo, evidenciando que la discriminación isotópica del carbono es un parámetro estable y útil para evaluar la eficiencia transpiratoria de diferentes genotipos.

La correlación obtenida para este ensayo fue de -0,34 para el total de los genotipos evaluados (Cuadro 21), sin embargo, cuando se eliminan los dos valores extremos obtenidos para San Gabriel (datos no mostrados) el coeficiente aumenta a -0,57 con un aumento considerable de la significancia ($p\leq 0,05$).

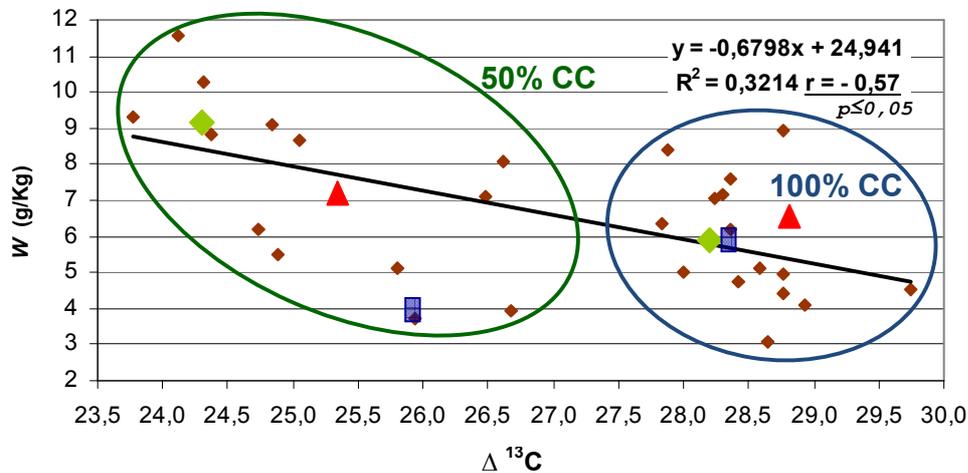


Figura 23. Relación entre W y discriminación isotópica ($\Delta^{13}\text{C}$) para los tres genotipos y los dos tratamientos (sin los dos valores extremos de San Gabriel al 50%). (n=28). Se indican los promedios (aproximados) para la líneas Tolerante (rombo verde), Sensible (triángulo rojo) y cv San Gabriel (rectángulo azul) en cada tratamiento (50 y 100% CC).

El genotipo San Gabriel evaluado a 50% CC presentó un coeficiente de correlación positivo significativo inesperado (Cuadro 21) de acuerdo a lo obtenido en la mayoría de los trabajos, dicho valor puede estar debido a la elevada variabilidad experimental no controlada. Dicha variabilidad puede ser la responsable de las diferencias en los coeficientes de correlación entre ensayos.

Cuadro 21. Coeficientes de Correlación de Pearson entre W y $\Delta^{13}\text{C}$ para los dos tratamientos y para cada genotipo-tratamiento (segundo ensayo).

| Genotipo | Coeficiente de correlación $W-\Delta^{13}\text{C}$ * | Coeficiente de correlación $W-\Delta^{13}\text{C}$ ** | |
|-------------------|--|---|---------------------|
| | | 100% CC | 50% CC |
| Tolerante | -0,78 (0,01) *** | -0,83 (0,08) | -0,64 (0,24) |
| Sensible | -0,38 (0,27) | -0,36 (0,55) | -0,32 (0,60) |
| S. Gabriel | 0,61 (0,06) | -0,47 (0,42) | 0,82 (0,09) |
| TOTAL | -0,34 (0,07) **** | -0,44 (0,10) | -0,48 (0,07) |

*para los dos tratamientos (n=10), **para cada tratamiento (n=5) ***el valor dentro del paréntesis corresponde al valor p. *para los dos tratamientos, **el valor dentro del paréntesis corresponde al valor p, ****están considerados todos los datos, inclusive los que fueron eliminados en la Figura 23.

4.6. RELACIONES ENTRE ENSAYOS Y TRATAMIENTOS

Cuando se comparó los dos ensayos se observó una fuerte correlación positiva y altamente significativa ($r=0,8$, $p<0,001$) entre los valores de discriminación isotópica ($\Delta^{13}\text{C}$), lo que indicaría, de acuerdo a Ehleringer et al. (1990a), la estabilidad de este parámetro. Sin embargo, la correlación observada no fue igual a 1, lo que quizás se deba a la ocurrencia de aclimatación de los genotipos a las diferentes condiciones de crecimiento de los dos ensayos y posibles cambios en las presiones de vapor de agua entre la hoja y la atmósfera, además del error experimental. Los resultados obtenidos, concuerdan con Ehleringer et al. (1990a), lo que estaría sugiriendo la existencia de cierta plasticidad de las plantas como respuesta a cambios en las condiciones ambientales que se reflejan en los valores absolutos de $\Delta^{13}\text{C}$. Lo destacable de estos resultados es que el ranking entre genotipos permanece esencialmente constante en los dos ensayos realizados (Cuadro 22), tal como fue registrado en otras evaluaciones (Ehleringer et al., 1990a).

Cuadro 22. Discriminación isotópica para cada genotipo-tratamiento-ensayo y ranking ente genotipos.

| Genotipo | $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) 100% CC | | | | $\Delta^{13}\text{C}$ 50% CC(‰) | | | |
|-------------------|-----------------------------------|----|----------------|----|---------------------------------|----|----------------|----|
| | Primer ensayo | | Segundo ensayo | | Primer ensayo | | Segundo ensayo | |
| Tolerante | 26,29 b | 3° | 24,26 b | 3° | 24,64 a | 3° | 28,29 a | 3° |
| Sensible | 26,44 b | 2° | 25,41 a | 2° | 24,93 a | 2° | 28,80 a | 1° |
| S. Gabriel | 27,30 a | 1° | 25,92 a | 1° | 25,18 a | 1° | 28,42 a | 2° |
| Promedio | 26,68 | | 25,20 | | 24,92 | | 28,51 | |

La elevada correlación entre tratamientos registrada en el primer ensayo ($r=0,52$, $p\leq 0,05$) indicaría, al igual que la correlación entre ensayos, la estabilidad de $\Delta^{13}\text{C}$, pero con mayor evidencia de aclimatación (plasticidad) a diferentes regímenes hídricos. Para el segundo ensayo la correlación entre tratamientos fue inferior y no significativa ($r=0,26$, $p>0,10$), lo que puede ser debido al error experimental registrado en este ensayo (mayores CV %).

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten ordenar a los marcadores útiles de acuerdo a su uso potencial a la hora de diferenciar genotipos sensibles-tolerantes a sequía de *Lotus corniculatus* L. de la siguiente manera, de mayor a menor:

- (1) Discriminación isotópica del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$). El parámetro es estable y reproducible y permitió detectar diferencias entre los genotipos y los tratamientos evaluados.
 - (2) Eficiencia transpiratoria. Tiene dificultades debido a que se evalúa mediante una técnica gravimétrica, pero suministra información.
 - (3) Conductancia estomática. Parámetro de fácil medición pero que posee error intrínseco, lo que implica elevado número de evaluaciones.
- La relación F_v/F_m no mostró disminuciones significativas con la combinación de estrés hídrico y térmico evaluadas, lo que limita el uso de este parámetro como marcador funcional.
 - La concentración de prolina en hoja y raíz no puede ser usada como marcador funcional para diferenciar estos genotipos.

Entre las conclusiones metodológicas se recomienda:

- aumentar el nivel de déficit hídrico, en lugar de 50% CC podría ser 25-30% CC, para intentar detectar diferencias entre genotipos,
- modificar los tiempos de crecimiento: en lugar de 30 días de crecimiento inicial y 15 de evaluación de tratamientos, podría ser 20 días de crecimiento inicial y 25 días de evaluación de tratamientos; este ítem se justifica más aún si se pasa a evaluaciones de 25% CC, ya que de lo contrario podría existir riesgo de desecación de plantas si las mismas son excesivamente grandes con relación a la maceta,
- controlar la humedad ambiental en la cámara de crecimiento, y
- mayores temperaturas (ej. 45 °C) en la evaluación de la emisión de fluorescencia del PFI, que puedan causar disminuciones significativas en la relación F_v/F_m en condiciones de estrés hídrico y térmico.

Se propone de acuerdo a los resultados obtenidos el uso de la discriminación isotópica del carbono como estimador de la EUA para esta especie y realizar otro ciclo de selección divergente para incrementar las diferencias entre los genotipos.

6. RESUMEN

L. corniculatus L. es una leguminosa perenne estival que presenta destacada resistencia a la sequía, alto valor nutritivo y elevada persistencia, por lo que es altamente recomendable su incorporación en mezclas forrajeras y en el mejoramiento de campo natural. Sin embargo, debido a la interacción entre un complejo de enfermedades y los factores climáticos, esta especie presenta problemas de persistencia en las condiciones ambientales del Uruguay. Los factores climáticos que parecen afectar más el crecimiento y persistencia de esta especie son el déficit y el exceso hídrico, así como las altas temperaturas. En este contexto esta tesis se planteó como objetivo general la evaluación de marcadores funcionales que puedan ser usados como herramienta en programas de mejoramiento genético de *Lotus corniculatus*. A partir de dos selecciones divergentes de *Lotus corniculatus*, contrastantes en su comportamiento productivo en déficit hídrico (Tolerante y Sensible), se plantearon como objetivos específicos a) evaluar las respuestas de tolerancia-sensibilidad a déficit hídrico a través de parámetros fisiológicos (conductancia estomática, eficiencia en el uso del agua y discriminación isotópica del carbono) y bioquímicos (acumulación de prolina y el estado del fotosistema II) y b) establecer entre los parámetros evaluados el más promisorio para ser usado como indicador de tolerancia-sensibilidad a déficit hídrico. Dentro de los parámetros evaluados la emisión de fluorescencia del fotosistema II, evaluada mediante la relación F_v/F_m y la concentración de prolina en hoja y raíz no evidenciaron diferencias entre los genotipos, por lo que no serían de utilidad como marcadores funcionales para estos genotipos en las condiciones ensayadas. Por otro lado, la discriminación isotópica del carbono ($\Delta^{13}C$) que permite estimar la eficiencia del uso del agua o eficiencia transpiratoria, permitió detectar diferencias significativas entre genotipos y tratamientos. Este parámetro fue estable y reproducible, con lo cual es el de mayor potencial a la hora de diferenciar genotipos sensibles y tolerantes a sequía. La eficiencia transpiratoria es un parámetro fisiológico con dificultades al estar basado en técnicas gravimétricas, sin embargo suministra información relevante, sobre todo considerando la elevada correlación entre éste y $\Delta^{13}C$ (-0,84 y -0,57, primer y segundo ensayo, respectivamente). Por último, la conductancia estomática se presenta como un parámetro útil y de fácil medición, pero el error intrínseco de la técnica implica la realización de un número elevado de determinaciones para detectar diferencias significativas entre genotipos.

Palabras clave: Tolerancia-sensibilidad al déficit hídrico; Selección divergente; Conductancia estomática; Relación F_v/F_m ; Acumulación de prolina; Eficiencia en el uso del agua; Eficiencia transpiratoria; Discriminación isotópica del carbono.

7. SUMMARY

Birdsfoot trefoil, *Lotus corniculatus* L. is a perennial legume that has noticeable drought resistance, high nutritive value and high persistence, which makes it highly recommendable to be included in mixtures of forage species and to be used in the improvement of natural grasslands. However, due to the interaction between a disease complex and the climatic stresses, the persistence of this species is limited in Uruguay's conditions. The main climatic factors that seem to affect the growth and persistence of this species are the drought and flood stresses, as well as the high temperatures. In this context, the general objective of the present thesis is to evaluate functional parameters that can be used as tools in breeding programs of birdsfoot trefoil. Moreover, in two divergent selections of birdsfoot trefoil, contrasting in their productive behavior to water stress (Tolerant and Sensitive), were established the following specific objectives: a) to evaluate the tolerance-sensitivity response to water stress through physiological parameters (stomatal conductance, water use efficiency and carbon isotope discrimination) and biochemical parameters (proline accumulation and the maximum quantum yield of PS II), and b) to determine which of these parameters is the best to be used as an indicator of tolerance-sensitivity to water stress. Within these parameters, the maximum quantum yield of PS II (F_v/F_m) and the proline accumulation in leaves and roots did not show significant differences among genotypes. Therefore, both parameters seem to be useless as functional markers for these genotypes. On the other hand, carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}C$), which is useful to estimate water use efficiency or transpiration efficiency, showed significant differences among genotypes and treatments. This parameter was stable and reproducible, therefore, it has the highest potential to identify drought tolerant or drought sensitive genotypes. Transpiration efficiency is a physiological parameter which is difficult to be measured because it is evaluated by a gravimetric method, but, it reports important information, mainly due to the high correlation between transpiration efficiency and $\Delta^{13}C$ (-0,84 and -0,57, first and second experiment, respectively). Finally, stomatal conductance is a useful parameter that can be easily measured, but it has associated a high number of evaluations in order to detect significant differences among genotypes.

Keywords: Tolerant-sensitive to water stress; Divergent selection; Stomatal conductance; F_v/F_m relation; Proline accumulation; Water use efficiency; Transpiration efficiency; Carbon isotope discrimination.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. ACEVEDO, E. 1993. Potencial of carbon isotope discrimination as a selection criterion in barley breeding. *In*: Ehleringer, J. R.; Hall, A. E.; Farquhar, G.D. eds. Stable isotopes and plant carbon-water relations. San Diego, Academic Press. pp. 399-417.
2. ALTIER, N. 1997. Enfermedades del Lotus en el Uruguay. Montevideo, INIA. 16 p. (Serie Técnica no. 93).
3. _____.; EHLKE, N. J.; REBUFFO, M. 2000. Divergent selection for resistance to Fusarium root rot in birdsfoot trefoil. *Crop Science*. 40: 670-675.
4. AZCON-BIETO, J.; TALÓN, M. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. 3ª. reimp. Madrid, McGraw Hill. 522 p.
5. BACON, M. A. 2004. Water use efficiency in plant biology. *In*: Bacon, M.A. ed. Water use efficiency in plant biology. Oxford, Blackwell. pp. 1-26.
6. BARBOUR, M. M.; FISCHER, R. A.; SAYRE, K. D.; FARQUHAR, G. D. 2000. Oxygen isotope ratio of leaf and grain material correlates with stomatal conductance and grain yield in irrigated wheat. *Australian Journal of Plant Physiology*. 27: 625-637.
7. BLUMENTHAL, M. J.; MCGRAW, R. L. 1999. Lotus adaptation, use and management. *In*: Beuselinck, P.R. ed. Trefoil; the science and technology of Lotus. Madison, WI, American Society of Agronomy. pp. 97-119.
8. BORSANI, O.; DÍAZ, P.; MONZA, J. 1999. Proline is involved in water stress responses of Lotus corniculatus nitrogen fixing and nitrate fed plants. *Journal of Plant Physiology*. 155: 269-273.
9. _____.; _____.; AZZIZ, G.; SAINZ, M.; MONZA, J. 2006. Technical report period april-october 2006, Partner 4, Laboratory of Biochemistry, Facultad de Agronomía-UDELAR. *In*: LOTASSA Contractors Meeting (2nd, 2006, Porto Alegre, Brazil). Abstracts. Montevideo, PROCISUR. s.p.

10. _____.; _____.; _____.; _____.; _____. 2007. Technical report period october 06-october 07, Partner 4, Laboratory of Biochemistry, Facultad de Agronomía-UDELAR. In: LOTASSA Contractors Meeting (3rd, 2007, Granada, Spain). Abstracts. Montevideo, PROCISUR. s.p.
11. _____.; CASARETTO, E.; DÍAZ, P.; MÁRQUEZ, A.; REBUFFO, M.; MONZA, J. 2008. Búsqueda de marcadores fisiológicos asociados con tolerancia-sensibilidad a déficit hídrico en leguminosas. In: Taller de Divulgación del Proyecto LESIS; Leguminosas para Sistemas Sustentables (1^o., 2008, Montevideo). Resúmenes. Montevideo, FONTAGRO. p. 5.
12. CARÁMBULA, M. 1977. Producción y manejo de pasturas sembradas. Montevideo, Hemisferio Sur. 464 p.
13. _____. 1996. Pasturas naturales mejoradas. Montevideo, Hemisferio Sur. 524 p.
14. _____. 2002. Pasturas y forrajes; potenciales y alternativas para producir forraje. Montevideo, Hemisferio Sur. t. 1, 357 p.
15. CASTRO, M.; VILARO, D. 2002. Evaluación de cultivares de *Lotus corniculatus* y *Lotus pedunculatus*. (en línea). In: Programa Nacional de Evaluación de Cultivares-Convenio INASE-INIA. La Estanzuela, Colonia, INIA. s.p. Consultado 2 oct. 2008. Disponible en http://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/resultados/
16. CLEWER, A. G.; SCARISBRICK, D. H. 2001. Practical statistics and experimental design for plant and crop science. New York, Wiley. 332 p.
17. CONDON, A. G.; RICHARDS, R. A. 1993. Exploiting genetic variation in transpiration efficiency in wheat; an agronomic view. In: Ehleringer, J. R.; Hall, A. E.; Farquhar, G.D. eds. Stable isotopes and plant carbon-water relations. San Diego, Academic Press. pp. 435-450.
18. _____.; _____.; FARQUHAR, G. D.; REBETZKE, G. J. 2002. Improving intrinsic water-use efficiency and crop yield. *Crop Science*. 42: 122-131.

19. CONDÓN, F.; REBUFFO, M.; MESSA, A. 2007. Una oportunidad para la investigación cooperativa; la colección de germoplasma del consorcio LOTASSA. In: Clausen, A.; Condón, F.; Berretta, A. eds. Avances de investigación en recursos genéticos en el Cono Sur II. Montevideo, PROCISUR-IICA. pp. 203-206.
20. CHAVES, M. M.; OSÓRIO, J.; PEREIRA, J. S. 2004. Water use efficiency and photosynthesis. In: Bacon, M.A. ed. Water use efficiency in plant biology. Oxford, Blackwell. pp. 1-26.
21. DIAZ, P. 2005a. Acumulación de prolina en *Lotus* sp. en condiciones de estrés hídrico. Tesis de Maestría. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 75 p.
22. _____; MONZA, J.; MÁRQUEZ, A. J. 2005b. Drought and saline stress in *Lotus japonicus* In: Márquez, A. J. ed. *Lotus japonicus* handbook. Dordrecht, Springer. pp. 39-50.
23. _____; BORSANI, O.; MONZA, J. 2005c. Lotus-related species and their agronomic importance. In: Márquez, A. J. ed. *Lotus japonicus* handbook. Dordrecht, Springer. pp. 25-37.
24. _____; _____; MÁRQUEZ, A. J.; MONZA, J. 2005d. Osmotically induced proline accumulation in *Lotus corniculatus* leaves is affected by light and nitrogen source. *Plant Growth Regulation*. 46: 223-232.
25. DONOVAN, L. A.; EHLERINGER, J. R. 1994. Potential for selection on plants for water-use efficiency as estimated by carbon isotope discrimination. *American Journal of Botany*. 81: 927-935.
26. EBDON, J. S.; KOPP, K. L. 2004. Relationships between water use efficiency, carbon isotope discrimination, and turf performance in genotypes of kentucky bluegrass during drought. *Crop Science*. 44: 1754-1762.
27. EHLERINGER, J. R.; OSMOND, C. B. 1989a. Stable isotopes. In: Percy, R. W.; Ehleringer, J. R.; Mooney, H. A.; Rundel, P.W. eds. *Plant physiological ecology field methods and instrumentation*. London, Chapman and Hall. pp. 281-300.

28. _____; RUNDEL, P. W. 1989b. Stable isotopes; history, units, and instrumentation. In: Rundel, P. W.; Ehleringer, J. R.; Nagy, K. A. eds. Stable isotopes in ecological research. New York, Springer-Verlag. pp. 1-15.
29. _____; WHITE, J. W.; JOHNSON, D. A.; BRICK, M. 1990a. Carbon isotope discrimination, photosynthetic gas exchange, and transpiration efficiency in beans and range grasses. *Acta Oecologica*. 11 (4): 611-625.
30. _____. 1990b. Correlations between carbon isotope discrimination and leaf conductance to water vapor in common beans. *Plant Physiology*. 93 (4): 1422-1425.
31. _____; VOGEL, J. C. 1993a. Historical aspects of stable isotopes in plant carbon and water relations. In: Ehleringer, J. R.; Hall, A. E.; Farquhar, G.D. eds. Stable isotopes and plant carbon-water relations. San Diego, Academic Press. pp. 9-18.
32. _____; HALL, A. E.; FARQUHAR, G. D. eds. 1993b. Stable isotopes and plant carbon-water relations. San Diego, Academic Press. pp. 3-8.
33. FARQUHAR, G. D.; O'LEARY M. A.; BERRY, J. A. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*. 9: 121-137.
34. _____, RICHARDS, R. A. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology*. 11: 539-552.
35. _____; EHLERINGER, J. R.; HUBICK, K. T. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 40: 503-537.
36. _____; LLOYD, J. P. 1993. Carbon and oxygen isotope effects in the exchange of carbon dioxide between terrestrial plants and the atmosphere. In: Ehleringer, J. R.; Hall, A. E.; Farquhar, G. D.

- eds. Stable isotopes and plant carbon-water relations. San Diego, Academic Press. pp. 47-70.
37. FERRES, F. 2008. Marcadores bioquímicos y fisiológicos de respuesta a estrés hídrico en *Lotus uliginosus*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 43 p.
 38. FORMOSO, F. 1993. Lotus corniculatus I. Performance forrajera y características agronómicas asociadas. Montevideo, INIA. 20 p. (Serie Técnica no. 37).
 39. GARCÍA, J. A.; FORMOSO, F.; REBUFFO, M. 1991. Las forrajeras de La Estanzuela. Montevideo, INIA. 15 p. (Boletín de Divulgación no. 7).
 40. _____. 1992. Persistencia de leguminosas. Revista INIA de Investigaciones Agronómicas. no. 1 (t. 2): 143-156.
 41. _____. 2003. Variedades forrajeras en el Uruguay; rol del INIA, la industria y el impacto al productor. Montevideo, INIA. 19 p. (Boletín de Divulgación no. 81).
 42. GREGORY, P. J. 2004. Agronomic approaches to increasing water use efficiency. In: Bacon, M.A. ed. Water use efficiency in plant biology. Oxford, Blackwell Publishing. pp. 142-170.
 43. GRIFFITHS, H. 1993. Carbon isotope discrimination. In: Hall, D. O.; Scurlock, J. M. O.; Bolhàr-Nordenkamp, H. R.; Leegood, S. R.; Long, S. P. eds. Photosynthesis and production in a changing environment; a field and laboratory manual. London, Chapman and Hall. pp. 181-92.
 44. HANDBERG, K.; STOUGAARD, J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. Plant Journal. 2: 487-496.
 45. HUBICK, K. T.; FARQUHAR, G. D.; SHORTER, R. 1986. Correlation between water-use efficiency and carbon isotope discrimination in diverse peanut (*Arachis*) Germplasm. Australian Journal of Plant Physiology. 13(6): 803-816.

46. _____.; _____.; 1989. Carbon isotope discrimination and the ratio of carbon gained to water lost in barley cultivars. *Plant Cell and Environment*. 12: 795-804.
47. _____.; 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. 47-70.
48. IMPA, S. M.; NADARADJAN, S.; BOOMINATHAN, P.; SHASHIDHAR, G.; BINDUMADHAVA, H.; SHESHSHAYEE, M. S. 2005. Carbon isotope discrimination accurately reflects variability in WUE measured at a whole plant level in rice. *Crop Science*. 45: 2517-2522.
49. IZAGUIRRE, P.; BEYHAUT, R. 1998. Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte I. Papilionoideae. Montevideo, Hemisferio. 549 p.
50. JOHNSON, D. A.; ASAY, K. H.; TIESZEN, L. L.; EHLERINGER, J. R.; JEFFERSON, P. G. 1990. Carbon isotope discrimination; potential in screening cool-season grasses for water-limited environments. *Crop Science*. 30 (2): 338-343.
51. JONES, H. 2004. What is water use efficiency? In: Bacon, M. A. ed. *Water use efficiency in plant biology*. Oxford, Blackwell. pp. 1-26.
52. KAUTSKY, H.; APPEL, W.; AMANN, H. 1960. Chlorophyllfluoreszenz und kohlenassimilation. XIII. Die fluoreszenzkurve und die photochemie der pflanze. *Biochemische Zeitschrift*. 322: 277-292.
53. KRAMER, P. J. 1983. *Water relations of plants*. New York, Academic Press. 489 p.
54. KRAUSE, G. H.; WEIS, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis; the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42: 313-249.

55. LIN, G.; EHLERINGER, J. R. 1997. Carbon isotopic fractionation does not occur during dark respiration in C₃ and C₄ plants. *Plant Physiology*. 114: 391-394
56. LU, C.; ZHANG, J. 1999. Effect of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *Journal of Experimental Botany*. 50 (336): 1199-1206.
57. MCDOWELL, N. G.; BOWLING, D. R.; SCHAUER, A.; IRVINE, J.; BOND, B. J.; LAW, B. E.; EHLERINGER, J. R. 2004. Associations between carbon isotope ratios of ecosystem respiration, water availability, and canopy conductance. *Global Change Biology*. 10: 1767-1784.
58. MARTIN, B.; THORSTENSON, Y. R. 1988. Stable carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$), water use efficiency, and biomass productivity of *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pennellii*, and the F₁ hybrid. *Plant Physiology*. 88: 213-217.
59. _____; TAUER, C. G.; LIN, R. K. 1999. Carbon isotope discrimination as a tool to improve water-use efficiency in tomato. *Crop Science*. 39: 1775-1783.
60. MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51 (345): 659-668.
61. MESSA, A.; REBUFFO, M.; SALDIAS, R.; BEMHAJA, M.; MONZA, J. 2007. Divergent selection of *Lotus corniculatus* and *Lotus uliginosus* for water stress and root characteristic. *Lotus Newsletter*. 37 (1): 20-21.
62. MONTOSI, F. 1996. El valor nutricional de los taninos condensados en el género *Lotus*. In: Risso, D. F.; Berretta, E. J.; Morón, A. eds. *Producción y manejo de pasturas*. Montevideo, INIA. pp. 145-149 (Serie Técnica no. 80).
63. O'LEARY M. A. 1981. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*. 20: 553-567.
64. _____. 1993. Biochemical basis of carbon isotope fractionation. In: Ehleringer, J. R.; Hall, A. E.; Farquhar, G. D. eds. *Stable isotopes*

- and plant carbon-water relations. San Diego, Academic Press. pp. 19-28.
65. PATAKI, D.; EHLERINGER, J. R.; COOK, C. s.f. Ehleringer Lab-Stable Isotope Ratio Facility for Environmental Research (SIRFER) Education. (en línea). Salt Lake City, Department of Biology-University of Utah. 8 p. Consultado 10 may. 2008. Disponible en http://ecophys.biology.utah.edu/sirfer_education.php
66. REBETZKE, G. J.; CONDON, A. G.; RICHARDS, R. A.; FARQUHAR, G. D. 2002. Selection for reduced carbon isotope discrimination increases aerial biomass and grain yield of rainfed bread wheat. *Crop Science*. 42: 739-745.
67. REBUFFO, M.; ALTIER, N. 1996. Mejoramiento genético de *Lotus corniculatus* L. por persistencia. In: Risso, D. F.; Berretta, E. J.; Morón, A. eds. Producción y manejo de pasturas. Montevideo, INIA. pp. 145-149 (Serie Técnica no. 80).
68. _____; CONDÓN, F.; ALZUGARAY, R. 2005. Variedades criollas de forrajeras templadas; conservación y uso en mejoramiento genético. *Agrociencia*. 9 (1-2): 105-114.
69. _____. 2007. Characterization of model Lotus and selection of *Lotus corniculatus* and *Lotus uliginosus* for tolerance to drought and root morphology. In: LOTASSA Contractors Meeting (3rd, 2007, Granada, Spain). Abstracts. Montevideo, PROCISUR. s.p.
70. SAINZ, M. 2006. Asimilación de nitrato por plantas de *Lotus corniculatus* bajo condiciones de estrés hídrico. Trabajo Especial II. Lic. Bioq. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. 38 p.
71. SQUEO, F. A.; EHLERINGER, J. R. 2004. Isótopos estables; una herramienta común para la ecofisiología vegetal y animal. In: Cabrera, H. M. ed. Fisiología ecológica en plantas mecanismos y respuestas a estrés en los ecosistemas. Valparaíso, EUV. pp. 59-80.
72. TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2006. Plant physiology. 4th ed. Massachusetts, Sinauer Associates. 764 p.

73. TUBEROSA, R. 2004. Molecular approaches to unravel the genetic basis of water use efficiency. *In*: Bacon, M.A. ed. Water use efficiency in plant biology. Oxford, Blackwell. pp. 228-301.
74. UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA (ARGENTINA). FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS (FCA-UNC). 2008. Infostat-software estadístico. Estadística y biometría. Diseño de experimentos. Versión 2008. (en línea). Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba. s.p. Consultado 20 oct. 2008. Disponible en <http://www.infostat.com.ar/>
75. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN DE INVESTIGACIONES ESTADÍSTICAS AGROPECUARIAS. 2000. Censo general agropecuario 2000. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado 14 nov. 2008. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/Diea/CENSOVOL2/data/40.htm>
76. WHEELER, D.; EDMEADES, D.; CHRISTIE, R.; GARDNER, R. 1992. Effect of aluminium on the growth of 34 plant species; a summary of results obtained in low ionic strength solution culture. *Plant and Soil*. 146: 61-66.
77. WHITE, J. W.; CASTILLO, J. A.; EHLERINGER, J. R. 1990. Associations between productivity, root growth and carbon isotope discrimination in *Phaseolus vulgaris* under water deficit. *Australian Journal of Plant Physiology*. 17(2): 189-198.
78. WRIGHT, G. C.; HUBICK, K. T.; FARQUHAR, G. D.; NAGESWARA RAO, R. C. 1993. Genetic and environmental variation in transpiration efficiency and its correlation with carbon isotope discrimination and specific leaf area in Peanut. *In*: Ehleringer, J. R.; Hall, A. E.; Farquhar, G. D. eds. Stable isotopes and plant carbon-water relations. San Diego, Academic Press. pp. 247-267.