

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**IDENTIFICACIÓN DE QTLs ASOCIADOS A TOLERANCIA/SENSIBILIDAD AL
DÉFICIT HÍDRICO EN *Lotus japonicus***

por

Francisco José FRANCO PICCIOLI

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

MONTEVIDEO
URUGUAY
(Diciembre 2015)

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. (PhD.) Clara Pritsch (Presidente), Ing. Agr. (PhD.) Guillermo Galván (Vocal), Ing. Agr. (PhD.) Victoria Bonnacarrère (Vocal) el 17 de diciembre de 2015. Autor: Ing. Agr. Francisco Franco. Director Ing. Agr. (PhD.) Omar Borsani, Co-director Ph.D. Jorge Monza.

A mis padres y abuelos...

A Mariana...

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Omar Borsani por haberme guiado en todo este proceso, por sus correcciones y aportes, por su buena voluntad y el apoyo brindado. A mi co-tutor Jorge Monza, por haberme dado un lugar en el laboratorio, por el apoyo en todas las etapas de la tesis y particularmente en la escritura. A Gastón Quero por su colaboración desde el diseño y análisis estadístico de los experimentos hasta la identificación de QTLs y sus aportes como integrante del comité de seguimiento. A Pedro Díaz por incluirme en su proyecto y la colaboración en los ensayos. A Lucía Gutiérrez por su asesoría en el mapeo de QTLs y sus aportes como integrante del comité de seguimiento. A Pilar Irisarri por sus aportes como integrante del comité de seguimiento. A Santiago Signorelli por su colaboración en la determinación de respuestas bioquímicas asociadas al déficit hídrico. A Manuel Diez por su colaboración en la construcción de la curva de retención del sustrato. A mis compañeros del laboratorio Mariana, Martha, Esteban, Leticia, Máximo, Florencia, Pamela, Yolanda y los que nombré anteriormente, por las cosas que me enseñaron y por el compañerismo.

A las agencias financiadoras: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), por el proyecto Fondo Clemente Estable (FCE) "Impacto del déficit hídrico sobre la eficiencia de uso del nitrógeno: Análisis de componentes bioquímicos fisiológicos" y una beca de posgrado nacional. A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por el proyecto "Búsqueda de marcadores de tolerancia/sensibilidad a sequía en plantas".

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN	IX
SUMMARY	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO	1
1.2. ADAPTACIONES A LA SEQUÍA	3
<u>1.2.1. Respuestas morfo-fisiológicas</u>	4
1.2.1.1. Desarrollo vegetativo	4
1.2.1.2. Regulación de la pérdida de agua por los estomas	5
<u>1.2.2. Respuestas bioquímicas</u>	8
1.2.2.1. Defensa antioxidante enzimática y no enzimática	8
1.2.2.2. La acumulación de prolina como indicador de déficit hídrico	 12
1.3. MEJORAMIENTO GENÉTICO DE RASGOS CUANTITATIVOS	14
1.3.1. <u>Estrategias de selección de genotipos tolerantes a sequía</u>	15
1.3.2. <u>Mapeo de QTL</u>	16
1.3.2.1. Datos genotípicos	18
1.3.2.2. Datos fenotípicos	24
1.3.2.3. Principios del análisis de QTLs	26
1.3.2.4. Métodos para detectar QTLs	28
1.3.2.5. Factores que influyen en la detección de QTLs	29
1.3.2.6. Análisis <i>multi-trait multi-environment</i>	30
1.4. <i>Lotus japonicus</i> COMO LEGUMINOSA MODELO	32
1.5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
1.5.1. <u>Hipótesis</u>	35

1.5.2. <u>Objetivos</u>	35
1.5.2.1. Objetivo general	35
1.5.2.2. Objetivos específicos	35
2. <u>MULTI-TRAIT AND MULTI-ENVIRONMENT QTL ANALYSES FOR TOLERANCE/SENSITIVITY WATER DEFICIT RESPONSES IN <i>Lotus japonicus</i></u>	36
2.1. ABSTRACT	36
2.2. INTRODUCTION	37
2.3. MATERIALS AND METHODS	39
2.3.1. <u>Plant material</u>	39
2.3.2. <u>Linkage map</u>	39
2.3.3. <u>Experimental conditions</u>	40
2.3.4. <u>Growth parameters</u>	40
2.3.5. <u>Developmental parameters</u>	41
2.3.6. <u>Correlation analysis</u>	41
2.3.7. <u>Statistical analyses</u>	41
2.4. RESULTS	43
2.4.1. <u>Phenotypic response of the RIL population under water deficit</u>	43
2.4.2. <u>Phenotypic correlation</u>	46
2.4.3. <u>Identification of QTL related to tolerance/sensitivity to water deficit responses</u>	47
2.4.3.1. Multi-trait and multi-environment QTL analysis for growth and development parameters	48
2.5. DISCUSSION	51
2.5.1. <u>Correlation among growth and development parameters</u>	51
2.5.2. <u>QTL related to tolerance/sensitivity water deficit responses in <i>Lotus</i></u>	51
2.5.3. <u>QTL effects on growth and development parameters</u>	53

2.6 CONCLUSIONS	54
2.7. ACKNOWLEDGEMENTS	55
2.8. REFERENCES	56
2.9. ADDITIONAL MATERIAL	60
2.9.1. <u>Multi-trait and multi-environment QTL analysis for shoot growth parameters in a RIL population of Lotus japonicus derived from a cross between ecotypes Gifu B-129 and Miyakojima MG-20</u>	60
2.9.2. <u>Multi-trait and multi-environment QTL analysis for root growth parameters in a RIL population of Lotus japonicus derived from a cross between ecotypes Gifu B-129 and Miyakojima MG-20</u>	61
2.9.3. <u>Multi-trait and multi-environment QTL analysis for development parameters in a RIL population of Lotus japonicus derived from a cross between ecotypes Gifu B-129 and Miyakojima MG-20</u>	62
3. <u>RESPUESTAS ASOCIADAS AL DÉFICIT HÍDRICO EN RILS CONTRASTANTES DE Lotus japonicus (Gifu x MG-20)</u>	63
3.1. RESUMEN	63
3.2. SUMMARY	64
3.3. INTRODUCCIÓN	65
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	67
3.4.1. <u>Material vegetal</u>	67
3.4.2. <u>Condiciones de crecimiento</u>	67
3.4.3. <u>Temperatura foliar</u>	68
3.4.4. <u>Cuantificación de prolina</u>	68
3.4.5. <u>Determinación <i>in situ</i> de superóxido y peróxido de hidrógeno</u> ..	68
3.4.6. <u>Peroxidación lipídica</u>	69
3.4.7. <u>Búsqueda de genes asociados a un QTL</u>	69
3.5. RESULTADOS	69
3.5.1. <u>Selección de RIL sensibles y tolerantes</u>	69

3.5.2. <u>Producción de biomasa aérea</u>	70
3.5.3. <u>Temperatura foliar</u>	71
3.5.4. <u>Acumulación de prolina durante el déficit hídrico</u>	72
3.5.5. <u>Detección de O₂^{•-}, H₂O₂ y peroxidación lipídica</u>	73
3.5.6. <u>Genes asociados a un QTL de interés</u>	74
3.6. DISCUSIÓN	76
3.7. AGRADECIMIENTOS	80
3.8. BIBLIOGRAFÍA	81
3.9. ANEXOS	87
3.9.1. <u>Curva de retención del sustrato arena vermiculita (1:1)</u>	87
4. <u>DISCUSIÓN</u>	88
5. <u>CONCLUSIONES</u>	89
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	90

RESUMEN

La identificación de loci de expresión cuantitativa (QTLs) asociados al déficit hídrico es de utilidad para definir estrategias de mejoramiento. En este trabajo se realizó el fenotipado de 100 líneas endocriadas recombinantes (RILs) de la leguminosa modelo *Lotus japonicus* derivadas de MG-20 x Gifu, en un sistema de hidroponía bajo condiciones de déficit hídrico y dos disponibilidades de nitrógeno. Se identificaron 20 QTLs asociados a parámetros de crecimiento y desarrollo. Dos QTLs, uno en el cromosoma 3 y otro en el 6 co-localizaron para parámetros de crecimiento de la parte aérea y raíz, lo que sugiere que el crecimiento de la parte aérea y la raíz pueden ser controlados por los mismos loci. En tanto, un QTL en el cromosoma 2 co-localizó para parámetros de crecimiento de raíz y de desarrollo, lo que evidencia que el crecimiento de raíz y el desarrollo pueden estar genética o pleiotrópicamente ligados. A partir de la información de los efectos de los QTLs se seleccionaron RILs tolerantes y sensibles a déficit hídrico y se realizó una evaluación de respuestas bioquímicas y fisiológicas implicadas en la superación del déficit hídrico. Este trabajo permitió identificar regiones genómicas asociadas a crecimiento y desarrollo en condiciones de déficit hídrico. Los QTLs identificados pueden ser incorporados en estrategias de mejoramiento, mientras que la información de sus efectos contribuye al conocimiento de la tolerancia a la sequía en *L. japonicus* y es de utilidad para la selección de líneas contrastantes. Por otra parte, la evaluación de respuestas bioquímicas y fisiológicas en RILs contrastantes, permitió observar que las líneas tolerantes presentan estrategias diferentes en la superación del déficit hídrico, por lo que serían un material de interés para estudiar la tolerancia a sequía. El análisis *in silico* de la región genómica de un QTL para tasa de crecimiento relativo asociado al marcador TM0186 permitió identificar cuatro genes relacionados con respuestas a estrés abiótico.

Palabras clave: déficit hídrico, *Lotus japonicus*, RILs, QTL, MTME

IDENTIFICATION OF QTLs ASSOCIATED WITH TOLERANCE / SENSITIVITY TO WATER DEFICIT IN *Lotus japonicus*

SUMMARY

QTL detection for drought tolerance is useful to define breeding strategies. In this study, the phenotyping of 100 RILs of the model legume *Lotus japonicus* (MG-20 x Gifu) was performed in a hydroponics system under conditions of drought and two conditions of nitrogen. 20 QTLs associated with growth and development parameters were identified. Two QTL, on chromosome 3 and 6 co-localized for growth parameters shoot and root, while a QTL on chromosome 2 co-localized for root growth parameters and development, suggesting that growth shoot and root can be controlled by the same loci and root growth and development traits could be genetically linked. Tolerant and sensitive to water deficit RILs were selected from the QTL effects information and an evaluation of biochemical and physiological responses involved in overcoming the water shortage was performed. This study allowed the identification of genomic regions associated with growth and development in water deficit conditions. QTL detected can be incorporated into breeding strategies, while their effect information contributes to the understanding of drought tolerance in *L. japonicus* and is useful for selecting contrasting lines. Moreover, the evaluation of biochemical and physiological responses in contrasting RILs, allowed to observe that tolerant lines have apparently different strategies in overcoming water deficit, so that would be a material of interest to study drought tolerance. The in silico analysis of the genomic region associated with TM0186, allowed the identification of four genes related to abiotic stress.

Keywords: water deficit, *Lotus japonicus*, RILs, QTL, MTME

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO

El estrés abiótico es la principal causa de pérdida en los cultivos en todo el mundo y puede reducir su rendimiento en más del 50% (Bray et al., 2000, Boyer, 1982). Entre los factores que generan estrés abiótico a las plantas se encuentran la sequía, el anegamiento, la salinidad, las temperaturas extremas y la toxicidad por distintos productos químicos que pueden desencadenar daño oxidativo. La sequía es uno de los estreses que frecuentemente afecta el rendimiento de los cultivos y se produce por insuficiencia de lluvias y por alteraciones en los patrones de precipitación (Toker et al., 2007). En la últimas décadas se constatan mayores superficies de tierras áridas y desertificación, con una reducción en el área cultivable (Lobell et al., 2011). En este sentido, se prevé que la ocurrencia de sequía aumentará significativamente a nivel mundial en muchas regiones agrícolas como consecuencia del cambio climático (Reynolds y Ortiz, 2010, Collins et al., 2008).

La sequía determina una disminución del potencial hídrico (ψ_w) del suelo, y en esa condición la planta debe evitar la pérdida de agua e incrementar su absorción para mantener su estado hídrico (Verslues et al., 2006). La magnitud del estrés generado por la sequía depende de la etapa del cultivo en que esta se impone, de su duración y de su intensidad (Serraj et al., 2005).

Las plantas pueden adaptarse a la sequía por la puesta en marcha de respuestas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas. En lo que se refiere a las adaptaciones de las plantas para resistir a la sequía se ha establecido lo que se conoce como estrategias de escape, evasión y tolerancia (Fig. 1) (Turner, 1986), aunque en la realidad las plantas presentan una combinación de esas estrategias (Ludlow, 1989).

Las plantas que escapan a la sequía presentan un alto grado de plasticidad en su desarrollo y son capaces de completar su ciclo de vida antes de que ocurra un déficit hídrico severo, por lo que dependen de una reproducción exitosa. Esta

respuesta observada en cereales (Bruce et al., 2002) y en algunas leguminosas (Chaves et al., 2002) está relacionada con la capacidad de almacenar reservas y su posterior movilización para la producción de semillas.

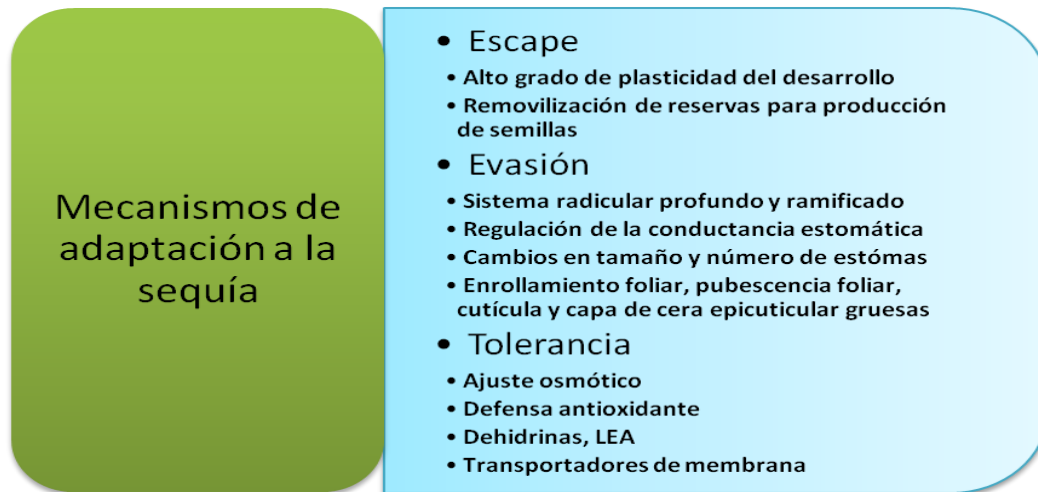


Figura 1. Mecanismos de las plantas para superar la sequía. Las plantas presentan distintas estrategias que le permiten adaptarse a la sequía y que implican distintos niveles de respuesta.

La estrategia de evasión consiste en el mantenimiento del ψ_w relativamente bajo de los tejidos y se asocia con varias características de adaptación. Una de las más eficaces es contar con un sistema radicular profundo y ramificado capaz de explorar un gran volumen de suelo (Bacelar et al., 2012). A nivel de hojas, para mantener la turgencia las plantas reducen la pérdida de agua mediante la disminución de la conductancia estomática (Farooq et al., 2009). A su vez, las hojas en crecimiento pueden desarrollar estomas más pequeños, pero más densamente distribuidos, que les permite reducir la transpiración por una regulación más rápida (Bacelar et al., 2012). Otras adaptaciones a nivel de la hoja para evitar la pérdida de agua son el enrollamiento, la pubescencia densa, cutícula y capa de cera epicuticular gruesas, células del mesófilo esponjoso con espacio intercelular pequeño (Bacelar et al., 2012). Plantas de *Lotus creticus* sometidas a déficit hídrico mostraron un aumento en la densidad de los estomas y una reducción del área foliar, en comparación con plantas en condiciones no limitantes, así como un

incremento de pelos radiculares y del número de vasos del xilema en tallo y raíz (Bañon et al., 2004).

Otra estrategia para superar el estrés es la tolerancia (Farooq et al., 2009) que se asocia principalmente con mecanismos de ajuste osmótico mediante la acumulación de solutos (iones y osmolitos compatibles), mecanismos de control de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS, reactive oxygen species) (Khan et al., 2010), síntesis de proteínas de bajo peso molecular (dehidrinas y LEA - *late embryogenesis abundant*) y de transportadores de membrana (acuaporinas) (Ingram y Bartels, 1996). En base a las respuestas observadas, la tolerancia a la sequía es un rasgo cuantitativo complejo de difícil interpretación debido a que es un carácter de base multigénica, resultado de una interrelación entre distintos mecanismos bioquímicos y fisiológicos (Fleury et al., 2010, Barnabás et al., 2008).

1.2. ADAPTACIONES A LA SEQUÍA

Las plantas presentan diferentes tipos de respuestas para superar el estrés causado por el déficit hídrico tanto morfo-fisiológicas como bioquímicas. En este sentido la diferencia entre un genotipo sensible a la sequía respecto a uno tolerante, depende de su capacidad de adaptarse a la situación de estrés (Fig. 2).

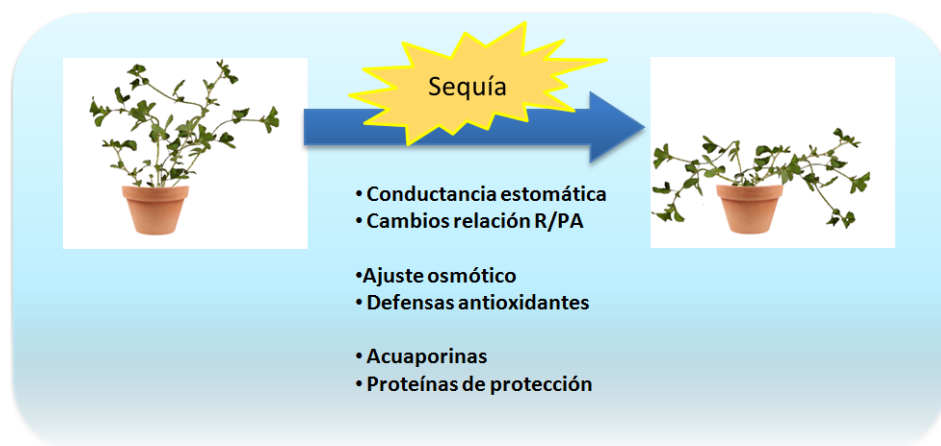


Figura 2. Respuestas morfo-fisiológicas y bioquímicas para superar la sequía. Las respuestas más comunes para superar el déficit hídrico son la regulación de la conductancia estomática, el desarrollo de un sistema radicular denso y profundo, la defensa antioxidante, el ajuste osmótico y la síntesis de proteínas de protección.

1.2.1. Respuestas morfo-fisiológicas

1.2.1.1. Desarrollo vegetativo

La modificación de las prioridades de crecimiento y la reducción del rendimiento fotosintético en condiciones de sequía, generan variaciones en la partición de carbono entre los tejidos fuente y fosa (Roitsch, 1999). Esto conduce a una disminución del crecimiento de la parte aérea y un crecimiento selectivo mayor de las raíces, lo que favorece la absorción de agua (Leport et al., 2006). Por lo tanto, los carbohidratos destinados al crecimiento de la parte aérea en condiciones normales, pasan a estar disponibles para la síntesis de solutos que participan en el ajuste osmótico (Xue et al., 2008) y para el crecimiento de la raíz principal (Xiong et al., 2006). Los cultivos que presentan mayor capacidad de regular el patrón de crecimiento de sus raíces, logran extraer agua de todo el perfil del suelo y resisten mejor la sequía (Yamauchi et al., 1996).

La relación raíz/parte aérea es utilizada para comparar genotipos sensibles y tolerantes a sequía, debido a que ocurre una reducción diferencial del crecimiento de la parte aérea con respecto a las raíces en condición de déficit hídrico en distintas especies. Yousfi et al. (2010) evaluaron dos especies del género *Medicago* y asociaron una mayor relación raíz/tallo a una mayor tolerancia a la sequía. De Souza y Da Silv (1987) interpretaron como una adaptación a la sequía la mayor relación raíz/parte aérea en plantas de algodón explicada por la partición de los asimilados hacia el sistema radicular con su consecuente mayor crecimiento. También en trigo se observó menor crecimiento de las raíces en genotipos sensibles respecto a genotipos tolerantes a la sequía (Piro et al., 2003). Del mismo modo, los genotipos de maní con mayor exploración radicular alcanzaron mayores rendimientos en condición de sequía (Jongrungklang et al., 2011). En el género *Lotus* se ha utilizado la relación raíz/parte aérea para comparar respuestas de distintos genotipos frente a la sequía y otros estreses (Quero et al., 2014, Quero et al., 2013, Melchiorre et al., 2009, Carter et al., 1997).

1.2.1.2. Regulación de la pérdida de agua por los estomas

En raíces en condición de déficit hídrico se induce la síntesis de ácido abscísico (ABA), que es transportado a las hojas donde contribuye al cierre de los estomas. Esto genera una disminución de la pérdida de agua por transpiración y también del ingreso de CO₂, por lo que se tiende a mantener el contenido hídrico de la planta pero desciende la fijación de carbono a través de la fotosíntesis (Fig. 4A) (Chaves et al., 2009). Sin embargo en plantas de *Medicago truncatula* resistentes a la sequía, sometidas a una condición de déficit hídrico severo, la disminución en la conductancia estomática les permitió mantener una elevada tasa de asimilación de CO₂ (Nunes et al., 2008). En este sentido, Yousfi et al. (2010) evaluaron líneas del género *Medicago* adaptadas a regiones con condiciones de sequía frecuente y encontraron que la línea con mayor tolerancia presentó la menor conductancia estomática y la menor reducción en la tasa de asimilación de CO₂ respecto a las demás.

Por otra parte, algunas plantas en condición de sequía mantienen los estomas abiertos conservando una elevada conductancia, de manera que la fotosíntesis y el suministro de nutrientes no se ven limitados, pero se pone en riesgo la pérdida de turgencia. Para evitar esto, las plantas sintetizan osmolitos a partir de fotoasimilados, que ayudan en la prevención de la pérdida de agua (Tardieu, 2012, Sade et al., 2012). En este tipo de plantas se ha observado que en condiciones de estrés presentan una elevada conductancia estomática, mayor tasa de crecimiento y producción de biomasa (Tardieu, 2012, Munns et al., 2010). Así, en genotipos de trigo con respuestas de tolerancia contrastantes al estrés salino se observó una relación positiva entre la conductancia estomática y la tasa de crecimiento relativo (James et al., 2008). En síntesis, estrategias que involucran la reducción de la conductancia estomática o su mantenimiento, a pesar de ser opuestas pueden conducir a tolerancia a la sequía, dependiendo de la duración e intensidad del evento. La estrategia más conservadora es ventajosa en escenarios de sequías más severas y largas. En cambio la estrategia que implica el

mantenimiento del crecimiento vegetativo y reproductivo permite un mayor rendimiento en escenarios de sequía más leves, pero con riesgo de fracaso reproductivo bajo estreses graves (Tardieu, 2012).

La conductancia estomática se determina experimentalmente en forma directa mediante el porómetro, que tiene la ventaja de ser una técnica sencilla y no destructiva. Sin embargo, cuando es necesario analizar muchas muestras, el tiempo que insume esta técnica es una limitación debido a que la conductancia estomática varía sensiblemente con las horas. Mediante el uso de porómetro Sanjuán y Rebuffo (2010) determinaron en condición control mayor conductancia estomática en *L. corniculatus* cv. San Gabriel respecto a los ecotipos Gifu y MG-20 de *L. japonicus*, y en condición de déficit hídrico un mayor cierre estomático en *L. corniculatus* respecto a los mencionados ecotipos. Sin embargo estos autores observaron que la determinación de la conductancia estomática en lotus tiene dificultades en la reproducibilidad debido a tamaño del folíolo y al tiempo insumido cuando son muchas muestras.

La conductancia estomática también se puede determinar a través de la relación isotópica de carbono $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ o discriminación isotópica del carbono ($\Delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). La $\Delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ permite estimar de manera indirecta el intercambio de CO_2 a través de los estomas. Cuando los estomas están abiertos el $^{12}\text{CO}_2$ difunde más rápido hacia el interior de la hoja que la fracción pesada $^{13}\text{CO}_2$, y además en el proceso bioquímico la RubisCO discrimina en contra de la fracción $^{13}\text{CO}_2$ (O'Leary, 1981). Cuando los estomas se cierran por el déficit hídrico la discriminación en contra del $^{13}\text{CO}_2$ disminuye y los cambios en $\Delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en los tejidos reflejan la historia del estado hídrico ocasionado por las condiciones ambientales (Yousfi et al., 2012, Farquhar y Richards, 1984, O'Leary, 1981). La $\Delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ también ha sido utilizada como indicador de la eficiencia de uso del agua (EUA) que es la relación entre la materia seca acumulada y el agua transpirada para comparar especies de *Lotus* con distinta tolerancia/sensibilidad a la sequía (Fig. 3) (Sanjuán y Rebuffo, 2010).

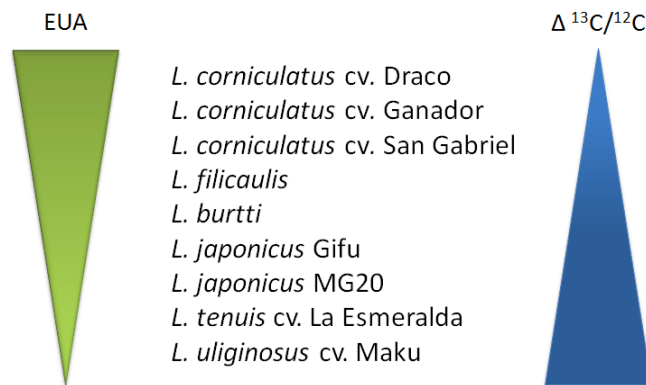


Figura 3. Ranking de diferentes genotipos de *Lotus spp.* en función de la EUA y $\Delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Tomado de (Sanjuán y Rebuffo, 2010).

El cierre estomático también se puede determinar a través de la temperatura foliar a partir de imágenes termográficas. Esto es posible por la estrecha relación entre la temperatura de la hoja y la conductancia estomática (Zaman-Allah et al., 2011, Sirault et al., 2009), debido a que esta última es el principal mecanismo de regulación de los cambios en la temperatura de las hojas (Jones, 2004). Si bien la termografía no es una determinación directa, se ha convertido en una herramienta útil para estimar diferencias en la conductancia estomática (Merlot et al., 2002) y se ha utilizado para comparar genotipos de trébol, poroto, garbanzo y maíz con diferente tolerancia-sensibilidad a sequía (Zia et al., 2013, Zaman-Allah et al., 2011, Reynolds-Henne et al., 2010).

Una ventaja del análisis de imágenes termográficas es que se pueden evaluar poblaciones, mientras que la porimetría se adapta mejor a un número de ejemplares reducido debido a que la conductancia se determina en plantas individuales. Además, cuando se mide la conductancia estomática con porómetro puede ser altamente variable (Jones, 1987), debido a que es sensible a la luz, al déficit de presión de vapor y a la concentración de CO_2 , por lo que necesitan ser controlados. Esto es particularmente problemático cuando se mide en cámaras de crecimiento, debido a que en espacios pequeños, el CO_2 respirado aumenta su concentración y causa cierre de los estomas (James et al., 2008). El impacto en la

conductancia de algunos de estos factores se puede minimizar utilizando termografía infrarroja para estimar la conductancia estomática en el laboratorio (Sirault et al., 2009) y en campo (Jones et al., 2009).

1.2.2. Respuestas bioquímicas

1.2.2.1. Defensa antioxidante enzimática y no enzimática

En las plantas, al igual que en otros organismos, se producen altos niveles de ROS en las mitocondrias y peroxisomas de sus células. A su vez, debido a las alteraciones metabólicas que ocurren en condición de sequía, los cloroplastos presentan una menor actividad del ciclo de Calvin por la disminución del CO₂ interno como resultado del cierre estomático. Esto lleva a una acumulación menor consumo de NADPH, y como consecuencia de la disminución de la actividad fotosintética se genera un exceso de poder reductor que incrementa la producción de ROS como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el radical superóxido (O₂^{•-}), el oxígeno singulete (¹O₂) y el radical hidroxilo (•OH). Estas ROS causan daño a lípidos, proteínas y ADN (Fig. 4B) (Dat et al., 2000, Hodges et al., 1996, Smirnoff, 1993).

La peroxidación de los ácidos grasos insaturados es uno de los daños más importantes generados por las ROS (Hartley et al., 1999) y su cuantificación a través de la determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) es utilizada como indicador del daño oxidativo a nivel celular (Shulaev y Oliver, 2006). En diferentes especies de leguminosas como *L. japonicus* (Díaz et al., 2010, Sainz et al., 2010), *L. uliginosus* (Ferrés, 2008), *L. corniculatus* y *Trifolium pratense* (Signorelli et al., 2013b), los TBARS han sido utilizados para estimar el daño oxidativo ocurrido cuando las plantas son sometidas a sequía. La formación de aldehídos también se ha utilizado para determinar el grado de daño oxidativo de manera semicuantitativa en raíces y hojas mediante el uso de reactivo de Schiff (Signorelli et al., 2013d, Airaki et al., 2011).

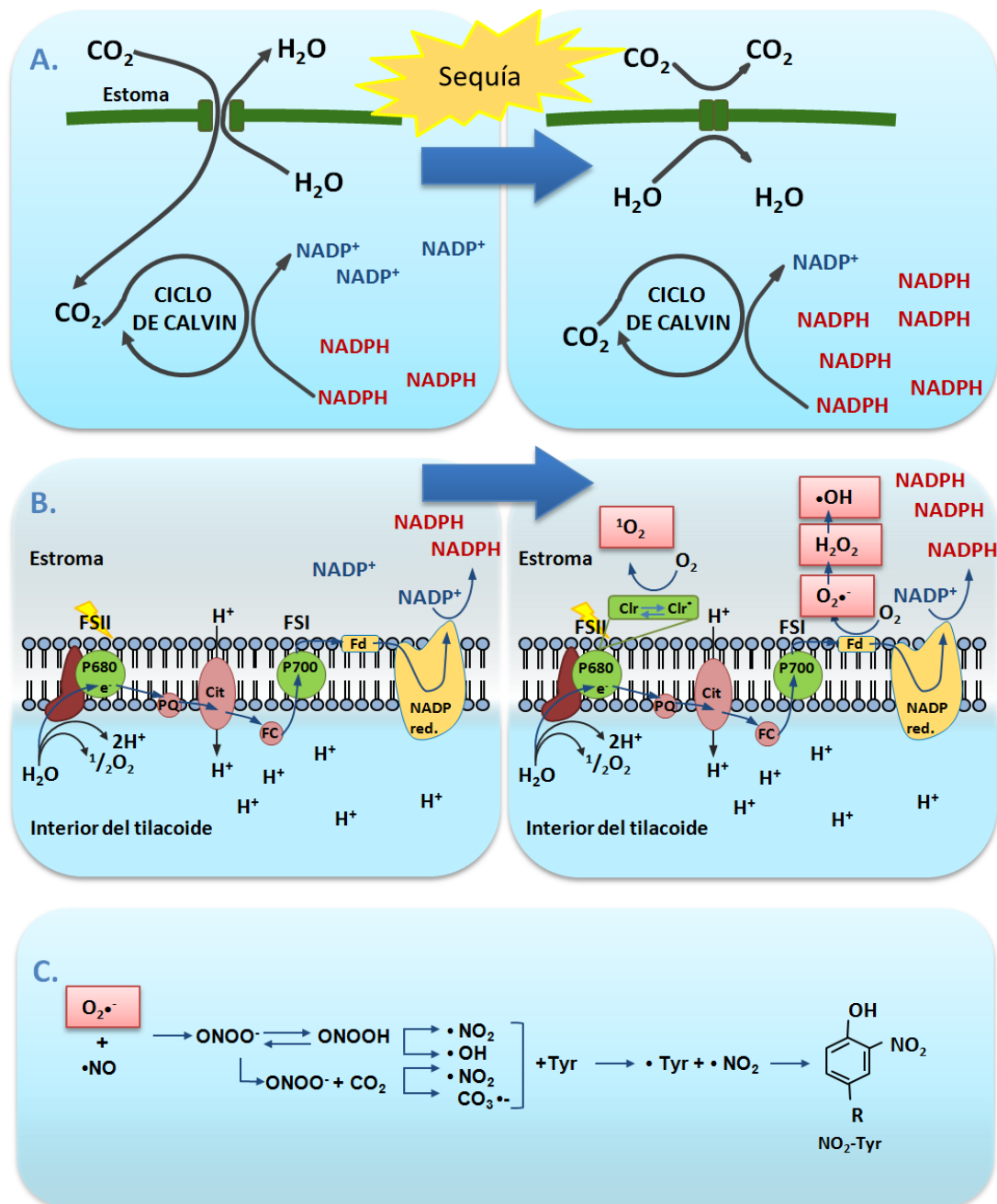


Figura 4. A. Regulación de la pérdida de agua a través de los estomas. La sequía induce el cierre estomático por lo que disminuye la pérdida de agua y el ingreso de CO_2 a la hoja, esto permite a la planta mantener la turgencia pero ocurre una disminución en la fijación de CO_2 . B. Producción de ROS en cloroplastos. Clr, clorofila; Clr^* , clorofila excitada; FC, ficocianina; Fd, ferredoxina; FSI, fotosistema I; FSII, fotosistema II; Cit, citocromo; PQ, plastoquinona, $\text{O}_2^{\bullet-}$, superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno, $\bullet\text{OH}$, radical hidroxilo; $^1\text{O}_2$, oxígeno sigulete. El cierre estomático lleva a una disminución en la fijación de CO_2 por el ciclo de Calvin y en la regeneración de NADP^+ por oxidación de NADPH . La falta de NADP^+ y una alta intensidad lumínica hace que la fotosíntesis continúe activa y

el flujo de electrones produce la acumulación de ROS. El $O_2^{\bullet-}$ es producido por transferencia electrónica de la Fd reducida. El H_2O_2 se produce por dismutación del $O_2^{\bullet-}$ catalizado por la superóxido dismutasa (SOD), o de forma espontánea. El $\bullet OH$ se genera por homólisis del H_2O_2 en presencia de luz UV-Vis, o por reacción de Fenton en presencia de Fe^{+3} . El 1O_2 , se genera por transferencia de energía de clorofilas excitadas. **C.** Nitración de residuos de tirosina. $\bullet NO$, óxido nítrico; $ONOO^-$, peroxinitrito; $ONOOH$, peroxinitroso; $CO_3^{\bullet-}$, radical carbonato; $\bullet NO_2$, dióxido de nitrógeno; Tyr, residuo de tirosina; $\bullet Tyr$, radical tirosilo; $NO_2^- Tyr$, 3-nitrotirosina. En condición sequía se generan especies reactivas del nitrógeno (RNS), como el óxido nítrico ($\bullet NO$) y el peroxinitrito ($ONOO^-$), que se produce a partir del $O_2^{\bullet-}$ y el $\bullet NO$. Este reacciona con CO_2 y puede producir radical carbonato ($CO_3^{\bullet-}$) y dióxido de nitrógeno ($\bullet NO_2$). Su forma ácida (peroxinitroso, $ONOOH$) produce de forma espontánea $\bullet OH$ y $\bullet NO_2$. Los radicales $\bullet NO_2$, $\bullet OH$ y el $CO_3^{\bullet-}$ producidos a partir del peroxinitrito pueden producir la nitración de proteínas, uniéndose a residuos de tirosina (Tyr) para producir el radical tirosilo ($\bullet Tyr$) que se puede unir a una molécula de $\bullet NO_2$ para formar 3-nitrotirosina. Adaptado de Signorelli (2014).

En condición de sequía también se generan especies reactivas del nitrógeno (RNS, *reactive nitrogen species*), como el óxido nítrico ($\bullet NO$) y el peroxinitrito ($ONOO^-$), un potente oxidante que se produce a partir del $O_2^{\bullet-}$ y el $\bullet NO$. El $ONOO^-$ reacciona con CO_2 y puede producir radical carbonato ($CO_3^{\bullet-}$) y dióxido de nitrógeno ($\bullet NO_2$). Su forma ácida (peroxinitroso, $ONOOH$) produce de forma espontánea $\bullet OH$ y $\bullet NO_2$. Los radicales $\bullet NO_2$, $\bullet OH$ y el $CO_3^{\bullet-}$ producidos a partir del peroxinitrito son capaces de oxidar a los residuos de tirosina (Tyr) y formar el radical tirosilo ($\bullet Tyr$), a partir del cual se forma la 3-nitrotirosina por adición de un $\bullet NO_2$ (Fig.4C) (Begara-Morales et al., 2013, Chaki et al., 2013, Corpas y Barroso, 2013). La nitración de residuos de tirosina puede llevar a la pérdida de la función de proteínas, y en el caso de las enzimas a inactivarlas (Corpas y Barroso, 2013, Souza et al., 2008). En plantas de *L. japonicus* se observó que la sequía produce un mayor estrés oxidativo en hojas que en raíces. Sin embargo en raíces se identificó un patrón específico de nitración de proteínas y se concluyó que el daño nitrosativo es mayor que en las hojas (Signorelli et al., 2013d).

Cuando las ROS y RNS son generadas de manera tal que sus concentraciones superan la capacidad de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, se

genera estrés nitro-oxidativo que causa daños a nivel celular. Pero por otra parte, hay que tener presente que a bajas concentraciones las ROS y el $\cdot\text{NO}$ funcionan como moléculas señalizadoras para la aclimatación a distintos estreses abióticos (Mittler et al., 2011, Molassiotis et al., 2010, Dat et al., 2000). Por ejemplo, el H_2O_2 funciona como una de las principales moléculas señal en plantas (Miller et al., 2008) y se cree que la expresión de al menos el 2% de los genes de *Arabidopsis* dependen del mismo (Desikan et al., 2001). A su vez el $\cdot\text{NO}$ ha sido relacionado con procesos de señalización, movimiento estomático, senescencia, respuesta a estrés abiótico, entre otros (León et al., 2014).

Las enzimas antioxidantes juegan un papel clave en la desintoxicación de ROS, la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR) se inducen en condición de estrés (Fig. 5) (Sade et al., 2011). Por esta razón, estas enzimas se utilizan como marcadores de tolerancia al estrés en varias especies (Sánchez-Rodríguez et al., 2012, Al-Ghamdi, 2009, Wang et al., 2009).

La síntesis de antioxidantes no enzimáticos como glutatión, ascorbato, carotenoides y tocoferol también se inducen en sequía (Zhang et al., 2004). Estas moléculas son preferentemente oxidadas por las ROS respecto a otras biomoléculas (Barroso et al., 2006).

La capacidad de respuesta de las plantas frente a las ROS y NOS es un elemento a tener en cuenta para comprender la tolerancia-sensibilidad a distintos estreses. La diferente actividad antioxidante de plantas de trébol rojo y *Lotus corniculatus* contribuye a explicar, en parte, la distinta tolerancia a sequía y alta temperatura de estas leguminosas. En *L. corniculatus*, que es más tolerante a la sequía que *Trifolium pratense*, aumentó la actividad SOD total (Mn, Fe y Cu, Zn) y también fue diferente la inducción de la actividad de esta enzima. Las actividades catalasa APX y GR también han sido utilizadas en la caracterización de cultivares sensibles y tolerantes en el género *Lotus* (Signorelli et al., 2013b).

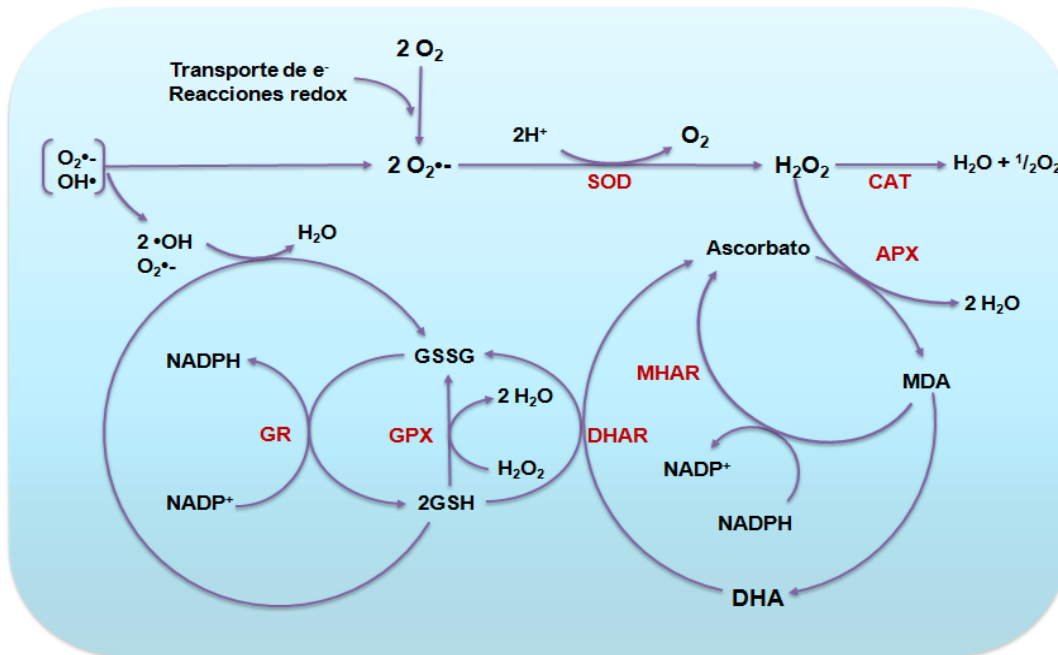


Figura 5. Principales enzimas antioxidantes en plantas. SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; APX, ascorbato peroxidasa; MHAR, monodehidroascorbato reductasa; MDA, monodehidroascorbato; DHAR, dehidroascorbato reductasa; DHA, dehidroascorbato; GR, glutatió reductasa; GPX, glutatió peroxidasa; GSH glutatió reducido; glutatió oxidado, GSSG. Adaptado de Bonnacarrère (2013) y Signorelli (2014).

1.2.2.2. La acumulación de prolina como indicador de déficit hídrico

El ajuste osmótico es una respuesta general de las plantas para hacer frente a la sequía, ya que impide la pérdida de agua y el mantenimiento de la turgencia (Parida y Das, 2005). Este mecanismo de ajuste consiste en un aumento de la concentración de solutos compatibles y de iones a nivel celular. Los iones se acumulan principalmente en las vacuolas, dado que a concentraciones elevadas en el citosol inhiben la actividad enzimática (DaCosta y Huang, 2006, Blum, 2005). Los solutos compatibles en cambio son compuestos orgánicos que a altas concentraciones no interfieren con las funciones de las enzimas y son capaces de proteger la membrana celular y la maquinaria metabólica en general en condición de estrés (Chaves et al., 2003). Los principales compuestos osmóticos sintetizados en respuesta al déficit hídrico son algunos aminoácidos, betaínas, azúcares solubles y polioles (Ingram y Bartels, 1996).

Sanchez et al., (2012) trabajando con *L. japonicus* Gifu en respuesta al déficit hídrico, reportaron un aumento significativo de ácidos orgánicos (succínico y málico), azúcares (fructosa, galactosa, glucosa y maltosa), polioles (arabitol, ononitol y galactitol) y aminoácidos (prolina, leucina e isoleucina). Por otro parte, estos autores analizaron los cambios relativos en los *pools* de diferentes metabolitos en respuesta al déficit hídrico para distintas especies de Lotus. En este caso, para *L. japonicus* Gifu y MG-20 observaron un aumento significativo de ácidos orgánicos (succínico y málico), azúcares (galactosa y maltosa), polioles (arabitol, inositol y galactitol) y aminoácidos (prolina) en respuesta al déficit hídrico.

La prolina es uno de los compuestos más comunes que se producen y acumulan en respuesta a diversos tipos de estreses abióticos (Szabados y Savouré, 2010), uno de ellos el déficit hídrico (Signorelli et al., 2013b, Betti et al., 2012, Sanchez et al., 2012, Díaz et al., 2010, Díaz, et al., 2005, Borsani et al., 1999). Si bien se la ha asociado a la acumulación de prolina con la mayor tolerancia a la sequía de algunos genotipos (Hare et al., 1998, Al-Sulaiti et al., 1990), no ha sido comprobado con evidencias sólidas (Choudhary et al., 2005). En *L. corniculatus*, *L. japonicus* y *T. pratense* se ha observado que en condición de déficit hídrico la acumulación de prolina ocurre en etapas tempranas después de la imposición del estrés, incluso cuando la variación del contenido relativo de agua en el tejido no se puede determinar, por lo cual se le considera un excelente indicador temprano del déficit hídrico (Díaz et al., 2005, 2010, Borsani et al., 2008).

A pesar de que la acumulación de prolina en condición de estrés se conoce hace mucho tiempo (Barnett y Naylor, 1966), no se le ha podido asignar una función en la respuesta al estrés, y se han manejado diferentes hipótesis. Entre los roles que se le asignaron en la respuesta a sequía en plantas, se encuentra la capacidad de actuar como osmolito compatible y proteger las estructuras subcelulares y macromoléculas, reserva de carbono y nitrógeno para la recuperación pasado el estrés, amortiguador celular del estado redox y del pH celular (Szabados y Savouré, 2010). También se le han atribuido funciones regulatorias (Mattioli et al., 2009) y

como antioxidante (Krishnan et al., 2008, Chen y Dickman, 2005). En muchos trabajos se ha considerado a la prolina como un antioxidante de bajo peso molecular (Huang et al., 2014, Semida y Rady, 2014, Wilson et al., 2014, Bandurska et al., 2013), aunque se ha demostrado que la prolina únicamente tiene capacidad de captar $\cdot\text{OH}$ (Signorelli et al., 2013c, Signorelli, 2014), pero no protege frente al oxígeno singulete (Signorelli et al., 2013a), superóxido, óxido nítrico, peroxinitrito ni dióxido de nitrógeno (Signorelli, 2014).

1.3. MEJORAMIENTO GENÉTICO DE RASGOS CUANTITATIVOS

El mejoramiento genético de plantas tiene como principal objetivo satisfacer las necesidades de alimento. La mayoría de los caracteres económicamente importantes para el mejoramiento son de naturaleza cuantitativa más que cualitativa (Bernardo, 2010). Los rasgos cualitativos son aquellos en que los fenotipos individuales se pueden clasificar en distintas categorías, como por ejemplo la forma de las hojas o el color del grano. Estos rasgos son controlados por uno o pocos genes y en general presentan poca interacción con el ambiente (MacKay, 2001).

En contraste con estos, los rasgos cuantitativos como el rendimiento o la tolerancia a la sequía son caracterizados por una variación fenotípica continua y están regulados por la acción conjunta de muchos genes (Bernardo, 2010). Por otra parte, la expresión final de estos es el resultado de una serie de interacciones causales entre la composición genética de la planta y las condiciones en las cuales la planta se desarrolla (Malosetti et al., 2013). Debido a la base multigénica y a la interacción genotipo por ambiente, es necesario contar con herramientas experimentales y analíticas que permitan discriminar los efectos genéticos en las bases de la expresión fenotípica continua. En los últimos años se vienen desarrollando plataformas de fenotipado y genotipado masivo que permitirán avanzar en el mejoramiento de rasgos cuantitativos (Mir et al., 2012, Tuberosa, 2012).

1.3.1. Estrategias de selección de genotipos tolerantes a sequía

En el mejoramiento de la tolerancia al estrés abiótico se pueden emplear distintas aproximaciones entre ellas el mejoramiento convencional, la selección asistida por marcadores (MAS, *marker-assisted selection*), la selección genómica. El mejoramiento convencional explora la variabilidad genética de una población con el objetivo de identificar a través del fenotipo nuevas combinaciones de alelos e incorporarlos en germoplasmas con buenas características agronómicas, ya sea por cruzamientos intra e inter-específicos. En este sentido se ha progresado de forma considerable en el desarrollo de líneas tolerantes a la sequía (Ashraf, 2010). Sin embargo, este enfoque requiere mucho tiempo, tiene un elevado costo, está condicionado por la variabilidad genética de los genotipos utilizados en el programa de mejoramiento y tiene como inconveniente, que en el proceso son transferidos también genes no deseados. El éxito limitado en la mejora de la tolerancia a la sequía a través de la aproximación convencional se debe a la base multigénica de efecto aditivo que regula este rasgo, que fácilmente se confunde con variaciones fenotípicas causadas por el ambiente (Ashraf, 2010).

Por otra parte, la MAS se basa en la identificación de marcadores asociados a regiones génicas de interés. Mientras que la selección genómica permite llegar a identificar genes y examinar los efectos de cada una de las regiones genómicas de plantas. Al obtener el valor genético de cada región se pueden organizar y agrupar genes con efectos similares para obtener cultivares tolerantes (Ashraf, 2010). Estas aproximaciones requieren identificar los determinantes genéticos asociados a las respuestas de tolerancia que pueden ser utilizadas para seleccionar materiales por sus características genéticas, para ello es necesario contar con una adecuada evaluación fenotípica (Munns, 2002).

1.3.2. Mapeo de QTL

Los rasgos cuantitativos son controlados por varias regiones del genoma que incluyen loci con variaciones alélicas de efectos relativamente pequeños, regiones conocidas como QTL (*quantitative trait loci*) (Asíns, 2002, Doerge, 2002). Thoday (1961) propuso usar un marcador genético para mapear poligenes que controlan un rasgo cuantitativo, basándose en que si se puede determinar la segregación de un marcador genético en el genoma, entonces es posible mapear y caracterizar el o los QTLs que afectan a un fenotipo particular. El objetivo del mapeo de QTLs es determinar la posición precisa de un QTL dentro de un cromosoma y consiste en detectar asociaciones significativas entre un rasgo cuantitativo y el genotipo, a partir de una metodología estadística. Para ello se requiere de información fenotípica y el uso de marcadores moleculares situados en un mapa de ligamiento que brindan información de la base genética del rasgo cuantitativo (Collard et al., 2005).

A mediados de la década de 1980, el desarrollo de abundantes marcadores moleculares, procedimientos estadísticos y de programas informáticos de fácil uso capaces de procesar operaciones en gran escala permitieron la detección de marcadores moleculares asociados a QTLs para rasgos complejos. En este sentido, se propuso la MAS como procedimiento para desarrollar cultivares mejorados a partir de la información de los marcadores ligados a QTLs (Bernardo, 2008).

El mapeo de QTLs es un camino efectivo en la identificación de regiones asociadas a la tolerancia a la sequía. Sin embargo debido a la complejidad de los factores genéticos y a la interacción genotipo ambiente (GEI), en la mayoría de los casos un número limitado de QTLs han sido detectados de manera estable a través de diferentes *pools* genéticos y ambientes (Ashraf, 2010). El análisis de QTL también es una herramienta básica para estudios de genómica funcional de plantas, de particular importancia en estudios fisiológicos sobre rasgos de interés agrícola como la tolerancia a la sequía (Mir et al., 2012). En este sentido, el mapeo de QTLs permitiría identificar genes específicos de respuesta al estrés abiótico, como por

ejemplo los genes involucrados en la tolerancia a la sequía (Mir et al., 2012, Ashraf, 2010).

Un mapeo exitoso de QTLs depende entre otros factores de la precisión del modelo estadístico utilizado, del diseño experimental, del tipo y tamaño de la población de mapeo, de la heredabilidad del carácter, de la GEI y de la calidad del mapa de ligamiento (Broman y Sen, 2009, Asíns, 2002, Tanksley, 1993).

El análisis de QTLs surge de la interacción de dos estructuras de datos, la información genotípica y la fenotípica (Fig. 6).

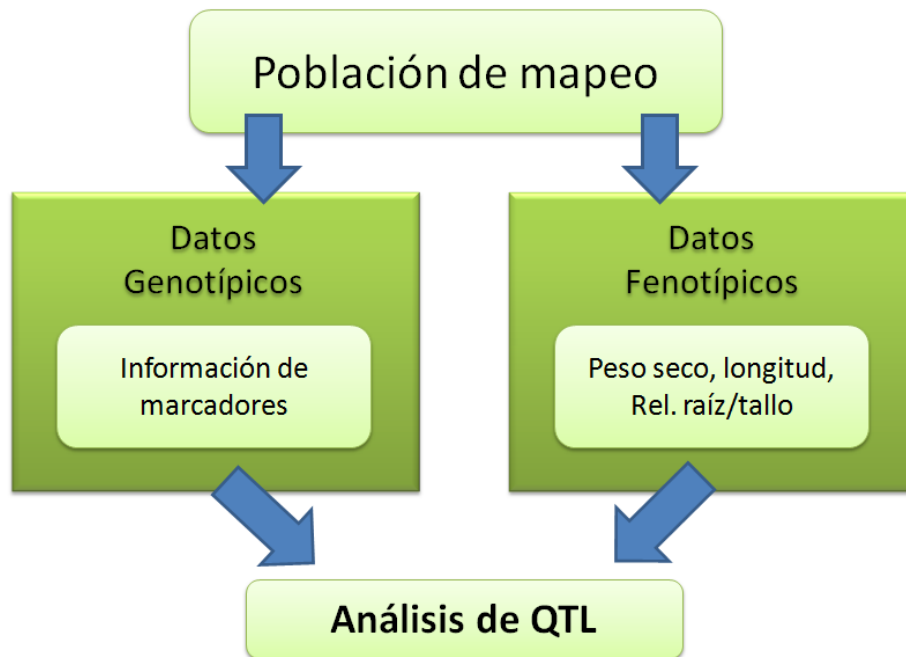


Figura 6. Estructuras de datos utilizados en el análisis de QTLs. A partir de una población de mapeo, se obtienen datos fenotípicos (peso, longitud, etc.) y datos genotípicos (alelos de cada marcador) que luego son analizados en conjunto para detectar posibles QTLs. Adaptado de Quero (2011).

La primera incluye un grupo de marcadores moleculares y la ubicación de los mismos en el mapa genético en términos de distancias genéticas. El proceso de obtención de esta información es llamado genotipado y generación de mapa de ligamiento. La segunda estructura, consiste en un grupo de características observables en la población, que incluye rasgos cuantitativos (peso, longitud, etc.) y

covariables por ejemplo el ambiente. En este caso el proceso de obtención de la información es llamado fenotipado (Broman y Sen, 2009).

1.3.2.1. Datos genotípicos

Los marcadores genéticos representan diferencias genéticas entre individuos o especies. En general los marcadores no representan a los genes en sí, sino que se encuentran en las proximidades de los mismos y estrechamente ligados sin afectar el fenotipo del rasgo de interés. Los marcadores genéticos al igual que los genes ocupan posiciones genómicas específicas (*loci*) dentro de los cromosomas (Collard et al., 2005).

Los marcadores se pueden clasificar en morfológicos o visibles (un rasgo fenotípico en particular), bioquímicos (como las isozimas) y moleculares (que revelan variaciones en el ADN) (Jones et al., 1997, Winter y Kahl, 1995). Estos últimos poseen ciertas ventajas respecto a los dos primeros. Los marcadores morfológicos y bioquímicos pueden estar limitados en número e influenciados por factores ambientales y por la etapa de desarrollo de la planta. Mientras que los marcadores moleculares son abundantes y presentan neutralidad fenotípica porque están generalmente ubicados en las regiones de ADN no codificante (Winter y Kahl, 1995). Los marcadores moleculares son polimórficos cuando permiten detectar diferencias entre individuos y especies. A su vez, los marcadores moleculares son llamados dominantes cuando revelan un solo alelo y por tanto permiten diferenciar entre individuos homocigotos diploides portadores o no del alelo, pero no distinguen individuos heterocigotos. Mientras tanto, los marcadores codominantes permiten discriminar entre homocigotos y heterocigotos (Fig 7). Estas variantes en un marcador molecular que permiten evidenciar por ejemplo diferentes bandas en un gel, se denominan alelos (Collard et al., 2005).

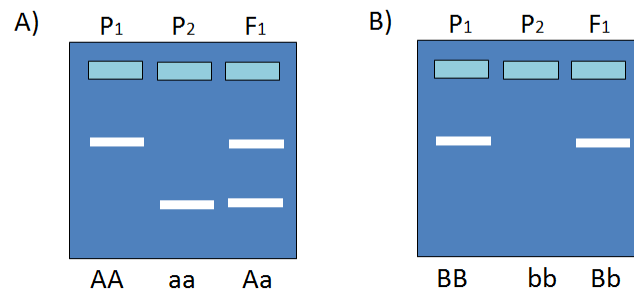


Figura 7. Comparación entre A) marcador codominante y B) marcador dominante en una especie diploide. El marcador codominante permite discriminar entre homocigotos y heterocigotos mientras que el marcador dominante no lo permite. Adaptado de Collard et al.,(2005).

Un mapa de ligamiento puede ser pensado como un mapa de ruta de los cromosomas, e indica la posición y las distancias genéticas relativas entre los marcadores genéticos a lo largo de los cromosomas (Paterson 1996). La posibilidad de generar poblaciones biparentales con decenas a cientos de individuos en plantas, es una herramienta que posibilita la segregación al azar de marcadores, la estimación del ligamiento (distancia) entre marcadores y la construcción de mapas de ligamientos. Uno de los usos más importantes de los mapas de ligamiento es identificar la ubicación de genes y QTLs asociados a rasgos de interés. El mapeo de QTLs se basa en el principio de que los genes y marcadores segregan a través de la recombinación cromosómica (*crossover*) que ocurre en la meiosis, permitiendo así su análisis en la progenie (Broman y Sen, 2009).

Los genes o marcadores que están muy juntos o ligados serán transmitidos en conjunto desde los padres hacia la progenie con más frecuencia que si se encontraran más separados. Las frecuencias de recombinación son usadas para estimar la distancia entre marcadores (Collard et al., 2005). El nivel de polimorfismo del marcador permite formar los grupos de ligamiento, ya que la variación alélica es la que hace posible estudiar la segregación del marcador en la progenie (Margarido et al., 2007).

Los tres pasos principales en la construcción de un mapa de ligamiento son la producción de una población de mapeo, la identificación de polimorfismos y el análisis de ligamiento de marcadores (Broman y Sen, 2009).

La construcción de un mapa de ligamiento requiere una población segregante, es decir producida a partir de un cruzamiento entre dos líneas parentales. En plantas autóгамas, las poblaciones pueden ser obtenidas por el cruzamiento de líneas puras (Broman, 2005). Los padres seleccionados para la población de mapeo deberán ser diferentes para el o los rasgos de interés. Las poblaciones de mapeo más utilizadas son la F2, retrocruzas, dobles haploides y líneas recombinantes puras (RILs, *recombinant inbred lines*).

Las poblaciones F2 y retrocruzas son las más utilizadas, debido a que son fáciles de construir y requieren un tiempo menor para generarlas. Por otro lado, se pueden construir poblaciones de RILs a partir de autofecundaciones sucesivas de plantas individuales de la F2, líneas homocigóticas que contienen una combinación única de segmentos cromosómicos de los parentales (Collard et al., 2005). La Fig. 8 representa la construcción de la población de RILs utilizada en este trabajo. Las RILs tienen la desventaja que requieren mayor tiempo relativo a las otras poblaciones en su producción, por lo general de seis a ocho generaciones. Sin embargo tienen algunas ventajas importantes: se pueden lograr mejores resoluciones del mapa genético, son líneas homocigotas que se pueden multiplicar y reproducir sin cambios genéticos, cada línea se tiene que genotipar una sola vez, y se pueden fenotipar múltiples individuos por cada línea en diferentes lugares y años, lo cual contribuye a separar reduce la varianza individual y ambiental (Broman y Sen, 2009, Asíns, 2002).

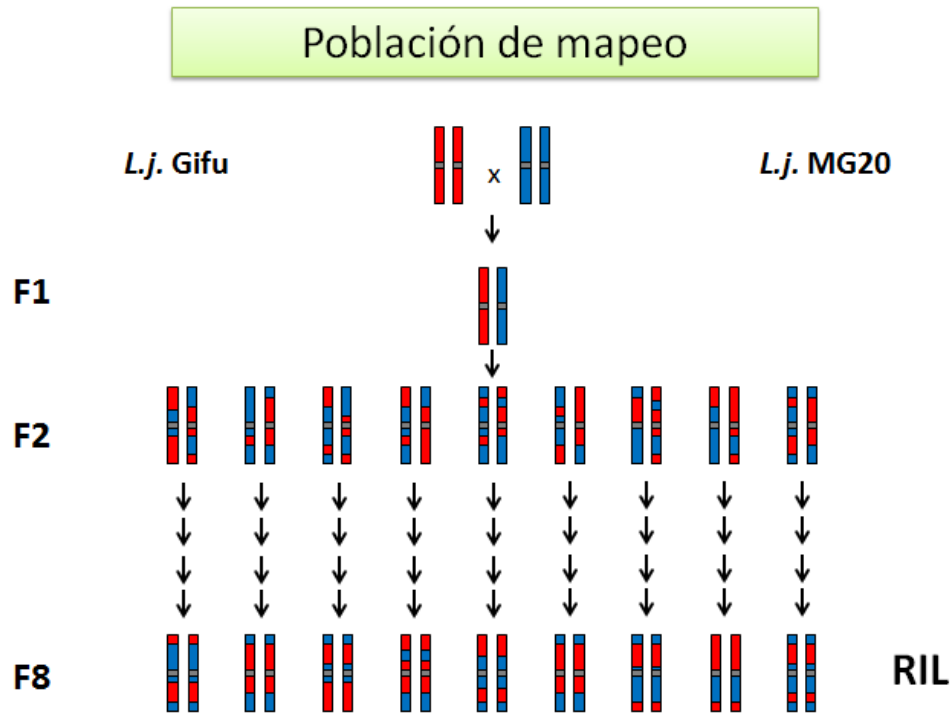


Figura 8. Representación esquemática de los cambios en la composición genética de los cromosomas durante el desarrollo de una población de RILs obtenida por autofecundación. Las dos líneas puras, parental 1 y 2, están representados por los cromosomas rojo y azul respectivamente. Mediante autofecundación de la generación F1 se genera variación genética que resulta en la F2. Cada línea de la F2 a su vez es autofecundada sucesivamente, y el resultado es la pérdida de heterocigosis en las generaciones subsiguientes. Si este proceso continúa por varias generaciones (F8-F10) se producen individuos que son completamente homocigotos en cada locus, pero con cromosomas que son un mosaico de los cromosomas parentales. Adaptado de Broman y Sen (2009).

Además se requiere identificar los marcadores moleculares que muestren diferencias entre los parentales, es decir marcadores polimórficos, que serán utilizados en toda la población de mapeo (Fig 9A). Las relaciones de segregación esperadas en una población de RILs son de 1:1, y las desviaciones significativas de las segregaciones esperadas pueden ser analizadas usando un test chi cuadrado (Broman y Sen, 2009). El paso final de la construcción de un mapa de ligamiento implica la codificación de los datos de cada marcador molecular, para cada individuo de la población y la realización de análisis de ligamiento utilizando

algoritmos disponibles en programas específicos para este propósito (Fig. 9B y C) (Margarido et al., 2007, Varshney et al., 2007).

El ligamiento entre marcadores es usualmente calculado como el logaritmo del ratio entre la probabilidad de que dos marcadores estén ligados, versus la probabilidad de que no estén ligados. Estas probabilidades de ligamiento son expresadas como *LOD score (Likelihood odds)* o *deviance*. Un *LOD score* de 3 entre dos marcadores indica que la hipótesis de ligamiento es 1000 veces más probable que la hipótesis de no ligamiento. Para la construcción de mapas de ligamiento se usan en general *LOD scores* >3 (Margarido et al., 2007). Los marcadores se agrupan en “grupos de ligamiento” los cuales representan segmentos de cromosomas o cromosomas enteros (Fig 9C). El orden de los marcadores en cada grupo, así como la distancia genética entre ellos, están afectados por el número de individuos estudiados en la población de mapeo y la calidad del genotipado. Idealmente la población de mapeo debería consistir en un mínimo de 50 individuos para construir los mapas de ligamiento (Collard et al., 2005).

Para convertir fracciones de recombinación en centiMorgans (cM) son necesarias distintas funciones de mapeo, ya que las fracciones de recombinación y las frecuencias de *crossovers* no están linealmente relacionadas. Una función de mapeo relaciona la longitud genética en un intervalo, generalmente no estimable, con la fracción de recombinación en ese intervalo, la cual sí es estimable. Las dos funciones comúnmente usadas son la función Kosambi, que asume que un evento de recombinación afecta la ocurrencia del evento de recombinación adyacente, y la función Haldane que asume que no hay interferencia entre eventos de *crossover*, es decir que ocurren al azar (Hartl y Jones, 2001). Para simplificar los cálculos se asume un modelo de no interferencia (Margarido et al., 2007).

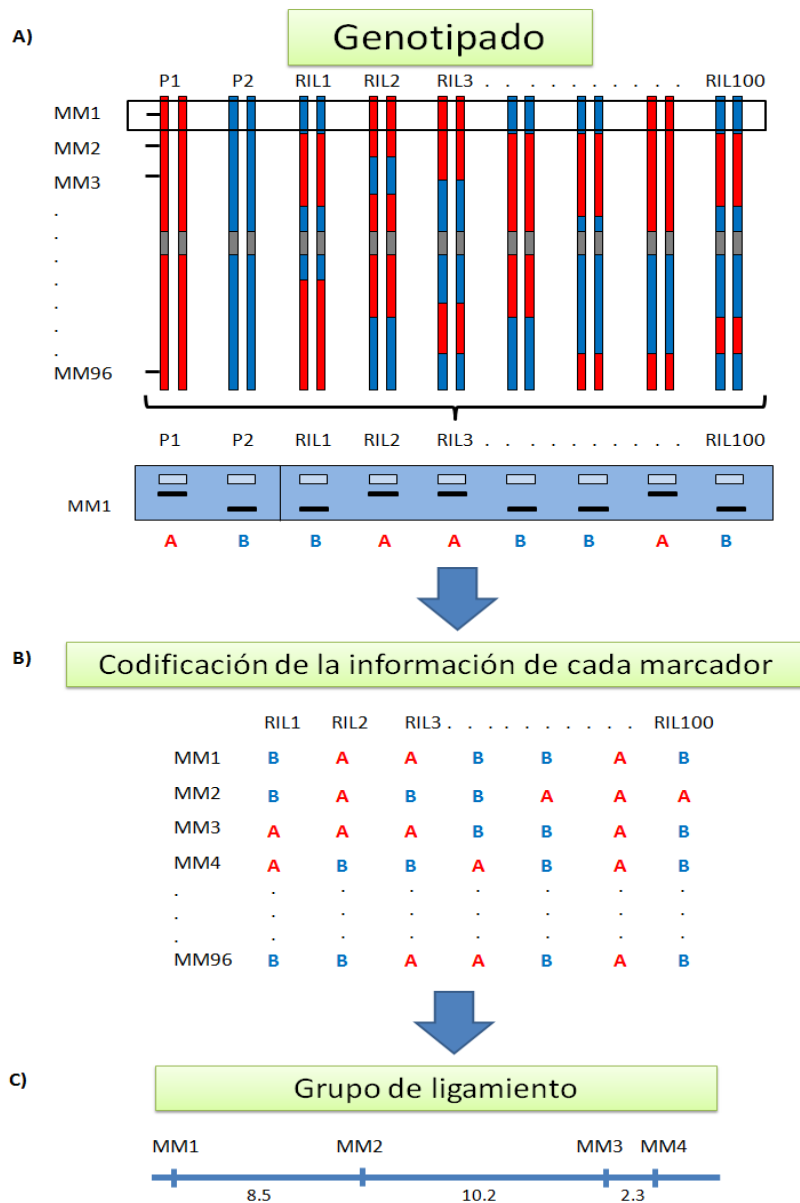


Figura 9. Ejemplo hipotético del proceso de construcción de un mapa de ligamiento en una población de RILs. A) Genotipado: se analiza la información de cada marcador (MM) para cada RIL individual y de los parentales (P1 y P2). B) Codificación de la información de los marcadores. El alelo del marcador que proviene de P1 se identifica con una **A**, mientras que el alelo proveniente P2 se identifica con una **B**. C) Construcción de un grupo de ligamiento. A partir de la información genotípica obtenida se realiza un análisis de ligamiento utilizando un software específico para este propósito y se calculan las distancias genéticas entre los marcadores en centiMorgans (cM). Adaptado de Collard et al., (2005).

En general puede ocurrir que las distancias en el mapa de ligamiento no están directamente relacionadas con la distancia física entre marcadores dentro del cromosoma, debido a la ocurrencia de regiones cromosómicas con mayor frecuencia (*hotspots*) de recombinación (Chen et al. 2002, Ohmido et al. 2010). En esos casos el mapa citogenético puede brindar información complementaria, ya que está basado en la estructura física del cromosoma (Broman y Sen, 2009, Collard et al., 2005).

1.3.2.2. Datos fenotípicos

Independientemente de la calidad del genotipado y de la confiabilidad de los mapas de ligamiento, la precisión de la evaluación fenotípica es un factor de gran importancia en la exactitud del mapeo de QTLs. Un mapeo de QTLs fiable sólo puede producirse si se utilizan datos fenotípicos fiables (Collard et al., 2005). Si se comparan dos líneas puras que crecieron en un determinado ambiente y a través de un diseño experimental adecuado muestran una diferencia fenotípica significativa, se puede considerar que la diferencia fenotípica es por causa genética. Para identificar los QTLs causantes de la diferencia fenotípica se puede analizar el fenotipo de la progenie resultante de su cruzamiento. Por otra parte si dentro de cada línea existe variación fenotípica esta no tiene base genética, sino que se debe a la combinación de errores de medida, variación ambiental y en el desarrollo individual de cada repetición, ya que todos los individuos de una línea son genéticamente idénticos (Fig. 10) (Broman y Sen, 2009).

En relación a las respuestas de adaptación a la sequía, se requiere una mejor comprensión de la fisiología y la base genética por lo cual es necesario un fenotipado preciso (Tuberosa, 2012). Un desafío importante para incrementar la producción en áreas con problemas de sequía es el desarrollo de líneas tolerantes a través de la selección y el mejoramiento (Athar y Ashraf, 2009). En este sentido las estrategias con MAS e identificación de QTL requieren el establecimiento de criterios de selección fenotípica y el desarrollo de sistemas experimentales que

permitan evaluar esos criterios de manera eficiente, rápida y sencilla (Agbicodo et al., 2009, Salekdeh et al., 2009). Tradicionalmente para seleccionar plantas tolerantes a la sequía se han utilizado rasgos como el índice de cosecha, la acumulación de prolina, la eficiencia en el uso de agua, la fluorescencia de clorofila, el ψ_w y el ajuste osmótico de la hoja (Ashraf, 2010). Sin embargo, la determinación de estos rasgos es poco eficiente cuando se requiere hacer un *screening* a un gran número de plantas en poblaciones segregantes, debido a que es costosa e insume mucho tiempo (Athar y Ashraf, 2009). Además, con este tipo de información se caracteriza la tolerancia al estrés a nivel de planta entera, lo que hace que sea demasiado complejo. Para solucionar este problema se pueden estudiar las características de tolerancia en parte aérea y en raíz de forma independiente, y así identificar genes responsables del comportamiento estomático, ajuste osmótico y arquitectura radicular, para luego combinarlos en el mejoramiento de variedades (Sharp et al., 2004).

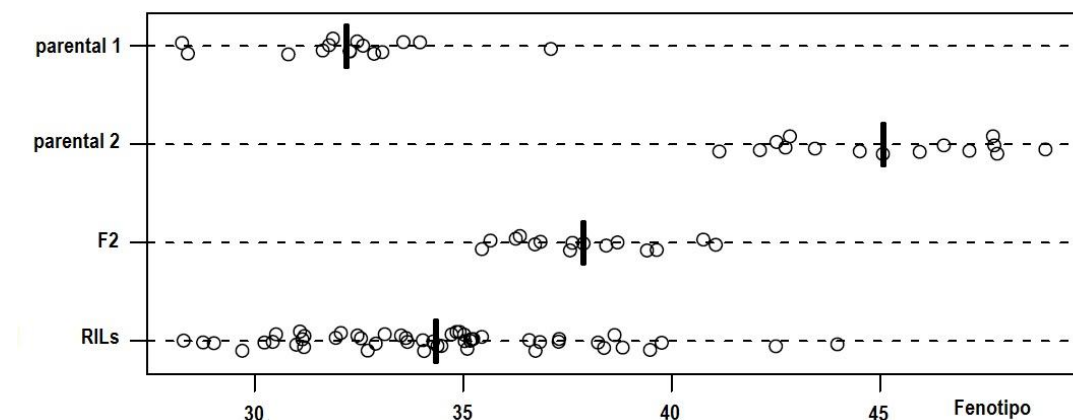


Figura 10. Simulación de datos fenotípicos para dos líneas puras, para generación F2 y para una población de líneas RILs. Los segmentos verticales dentro de cada grupo representan las medias. En este ejemplo la diferencia genotípica entre las líneas es mayor que la diferencia dentro de cada línea. La media fenotípica de la generación F2 es intermedia entre los dos parentales, mientras que la población de RILs presenta una variación más amplia y una media parecida al parental 1. Tomado de Quero (2011).

1.3.2.3. Principios del análisis de QTLs

El análisis de QTL se basa, en términos simples, en la detección de una asociación entre la información del fenotipo con el genotipo. El fenotipo es el resultado de los genes que controlan el rasgo de interés (QTLs) y posibles covariables como el ambiente (Fig. 11). El genotipo y el fenotipo pueden asociarse debido al ligamiento de los marcadores con los QTLs.

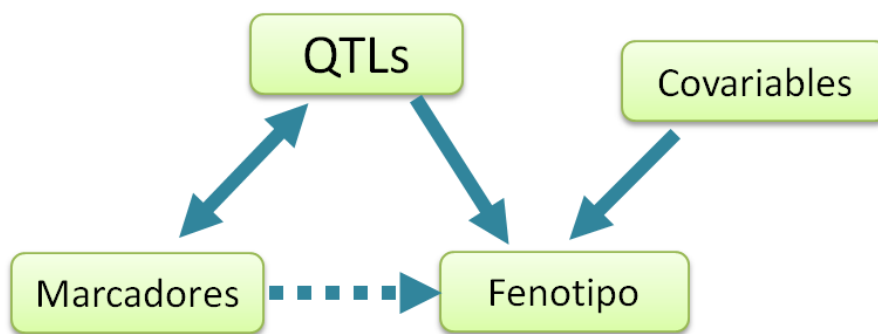


Figura 11. Estructura del análisis estadístico del mapeo de QTLs. Los QTLs y las covariables son los responsables de la variación fenotípica (indicado por la dirección de las flechas solidas). Los marcadores y los QTLs están correlacionados unos con otros debido al ligamiento (indicado por la flecha sólida bidireccional). Los marcadores en general no codifican directamente el fenotipo, estos marcadores pueden ser asociados con el fenotipo vía ligamiento del QTL indicado por la dirección de la flecha punteada. Adaptado de Broman y Sen, 2009).

Los marcadores se utilizan para dividir la población de mapeo en diferentes grupos basados en la presencia o ausencia de un *alelo* de cada marcador particular y para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos con o sin el alelo respecto a las medias del rasgo fenotípico evaluado. Si se observa una diferencia significativa entre las medias fenotípicas de los grupos, indica que el marcador está asociado a un QTL que controla el rasgo evaluado. Cuanto más cerca de un QTL se encuentre un marcador, menor es la probabilidad de recombinación entre el marcador y el QTL. De esta forma, el QTL y el marcador serán por lo general heredados juntos, y la media del grupo con el marcador ligado mostrará diferencias

significativas respecto a la media del grupo sin el marcador. Cuando un marcador no está asociado a un QTL segrega de forma independiente, por lo tanto no se observan diferencias entre las medias de los grupos ya que el marcador y el QTL son heredados de forma aleatoria. Este es el procedimiento más simple que implica el análisis de cada marcador individualmente, *single marker analysis* (Fig. 12) (Collard et al., 2005). Procedimientos más potentes basados en la información del mapa de ligamiento se describen seguidamente.

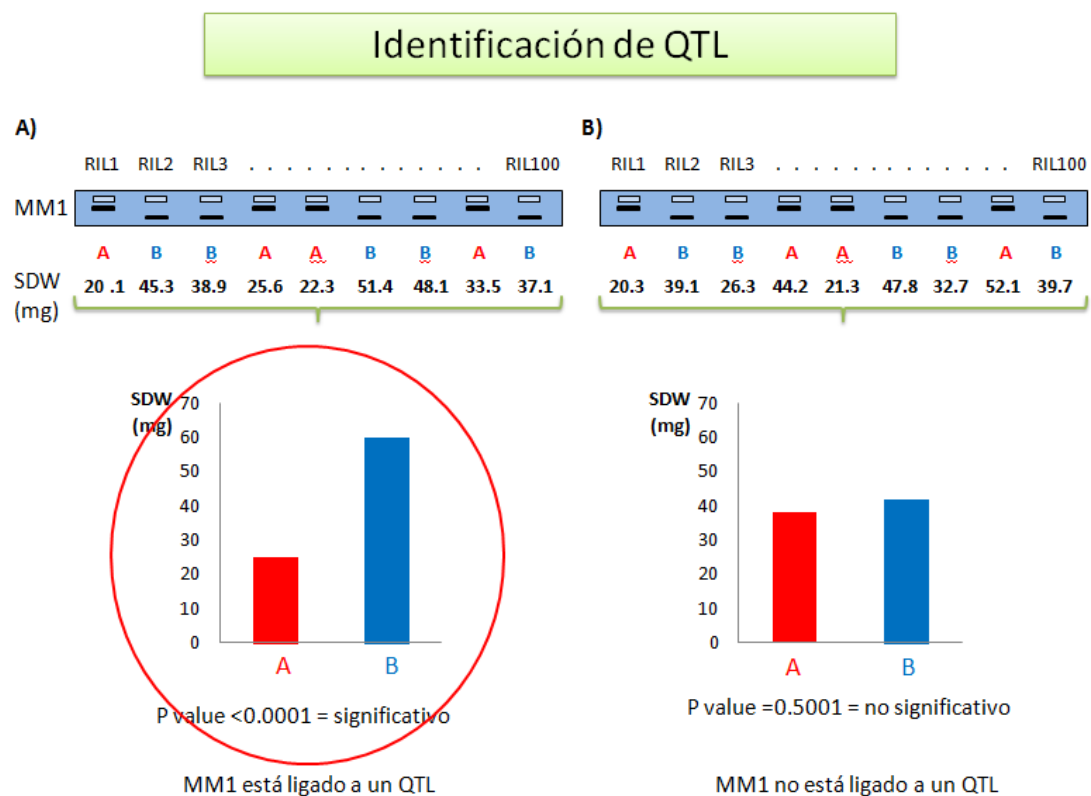


Figura 12. Principios del mapeo de QTLs. La población de mapeo se particiona de acuerdo al genotipo de un marcador MM1, si esto refleja diferencias significativas en el fenotipo indica que el marcador está ligado a un QTL. En el caso hipotético A) del ejemplo se observa que el marcador MM1 está ligado a un QTL, porque hay diferencias significativas entre las medias de los subgrupos de la población, en B) se observa que MM1 no se encuentra ligado a un QTL. Adaptado de Collard et al. (2005).

1.3.2.4. Métodos para detectar QTLs

El principal objetivo del mapeo de QTLs es detectar la presencia de un QTL asociado a un carácter fenotípico determinado. Una vez detectada la asociación entre el QTL y el fenotipo se intenta determinar la región en el genoma donde se ubica. Finalmente se trata de estimar el efecto del QTL sobre el fenotipo (MacKay, 2001).

Los métodos más utilizados para detectar QTLs son el *single-marker analysis*, *simple interval mapping* (SIM) y *composite interval mapping* (CIM). Cuando se usa el *single-marker analysis*, la hipótesis nula testeada es que la media de los valores fenotípicos es independiente del genotipo del marcador en particular. Si la hipótesis nula es rechazada con cierto nivel de significancia, implica que el QTL está ligado al marcador bajo investigación. Cada asociación marcador-fenotipo, es evaluado independientemente de todos los otros marcadores (Doerge, 2002). En los análisis puntuales estas asociaciones se determinan mediante análisis de varianza (ANOVA) o regresión lineal, o métodos no paramétricos para la comparación de dos medias como Kruskal-Wallis. En este tipo de análisis se trata de determinar cuánta de la variación fenotípica observada puede ser explicada por los QTLs ligados al marcador, para ello generalmente se usa el coeficiente de regresión R^2 (Collard et al., 2005). La desventaja más importante del análisis de regresión simple es que considera la presencia de un solo QTL, es decir no se pueden separar QTLs ligados, no se pueden determinar las posibles interacciones entre QTLs y se confunde el efecto del QTL con la posición (Broman y Sen, 2009).

El SIM utiliza el mapa de ligamiento y analiza simultáneamente los intervalos entre marcadores adyacentes a lo largo del cromosoma. El uso de marcadores ligados en el análisis compensa la recombinación entre los marcadores y el QTL, y es considerado estadísticamente más poderoso si se lo compara con el *single-marker analysis* ya que permite separar posición de efecto. Sin embargo el análisis se hace de un QTL por vez (Collard et al., 2005).

El CIM utiliza múltiples QTLs (en general identificados previamente) para realizar el análisis de interacciones. La principal ventaja del CIM es que es más preciso y efectivo en el mapeo de QTLs comparado con los otros dos métodos anteriores, especialmente cuando los QTLs involucrados están ligados. El mapeo por intervalos produce un perfil de los sitios más probables para un QTL entre marcadores ligados adyacentes. En otras palabras, el QTL es localizado en el mapa genético (Collard et al., 2005, Tanksley, 1993). Los resultados del test estadístico para CIM son típicamente representados por el LOD score. Estos perfiles de LOD score son usados para identificar la posición más probable del QTL en relación al mapa de ligamiento, la cual coincide con la posición donde el mayor LOD score fue obtenido. El pico máximo que excede un nivel de significancia específico puede ser considerado como un posible QTL. Para la determinación de los umbrales de significancia en general se usan test de permutación que tienen en cuenta el tamaño de la población de mapeo (Broman y Sen, 2009, Jones et al., 1997).

1.3.2.5. Factores que influyen en la detección de QTLs

Dentro de los factores que influyen en la identificación de QTLs, los más importantes son las propiedades genéticas de los QTLs, los efectos del ambiente, el tamaño de la población y el error experimental.

En relación a las propiedades genéticas de los QTLs, ocurre que QTLs con efectos fenotípicos pequeños pueden caer por debajo del umbral de significación y no ser detectados. Por lo cual, generalmente serán detectados menos QTLs que los existentes, pero con efectos suficientemente grandes para superar el umbral de significancia. Además QTLs que están estrechamente ligados por lo general se detectan como un solo QTL, en poblaciones con tamaños típicos (<500) (Collard et al., 2005).

Si los efectos de los distintos alelos de un QTL difieren en su magnitud o sentido (+/-) en diferentes ambientes, entonces existe interacción entre el efecto del QTL y el ambiente (QEI). Durante los últimos años, uno de los principales

desafíos en los programas de mejoramiento vegetal ha sido el desarrollo de modelos estadísticos para determinar la magnitud de la GEI sobre un rasgo de interés (Hageman et al., 2012). En este sentido, es de relevancia incorporar la GEI o QEI en los métodos de detección de QTL (Malosetti et al., 2004, 2013). Para investigar dicha interacción se deben plantear experimentos con réplicas en distintos lugares y años (Mackay et al., 2009). Para este fin se pueden realizar análisis de QTLs *multi-environment* (ME), donde se analizan en conjunto los diferentes ambientes evaluados para un rasgo fenotípico determinado (Alimi et al., 2013). De esta forma se pueden discriminar los genotipos que mantienen buen comportamiento a través de distintos ambientes, genotipos ampliamente adaptados, de aquellos genotipos que se comportan mejor en algún ambiente en particular, genotipos específicamente adaptados (Vargas et al., 2006). La adaptación de tipo específica está estrechamente relacionada con la QEI (Malosetti et al., 2013). Dentro de los modelos utilizados para la detección de QTLs, los modelos de regresión mixtos son utilizados para el modelado de la QEI. La ventaja de esta aproximación, reside en la posibilidad de modelar la correlación genética subyacente en los datos obtenidos en distintos ambientes, lo que permite testear el efecto del ambiente sobre la expresión del QTL. Esta aproximación es importante en estudios de tolerancia al déficit hídrico (Malosetti et al., 2008, 2013).

1.3.2.6. Análisis *multi-trait multi-environment*

Por lo general en los programas de mejoramiento se genera información de muchos rasgos en diferentes ambientes y años. Es importante que para un determinado germoplasma se evalúen múltiples rasgos fenotípicos en simultáneo en lugar de rasgos individuales, dado que las mejores variedades son aquellas que combinan los valores óptimos de varios rasgos de interés y de esta forma maximizan la productividad y la calidad (Malosetti et al., 2008). En dicho caso, es más apropiado utilizar análisis estadísticos multivariados que univariados y es incluso más importante cuando los procesos biológicos son interdependientes. Si

existen rasgos que están correlacionados genéticamente, un mapeo de QTLs adecuado ayuda a diferenciar si las correlaciones se deben a QTL pleiotrópicos o QTLs estrechamente ligados. Si se analizan los rasgos correlacionados por separado, se obtienen mayores varianzas muestrales de los parámetros estimados y menor potencia para pruebas de hipótesis. El análisis conjunto de múltiples rasgos se ha demostrado que mejora la potencia y precisión del análisis de QTLs. Además contribuye a mejorar la selección de algunos rasgos primarios con heredabilidades bajas o difíciles de medir a través de sus correlaciones genéticas con otros rasgos (Jiang y Zeng, 1995). En este sentido los análisis de QTLs *multi-trait* (MT) son adecuados para el mapeo de QTLs cuando se cuenta con información de múltiples rasgos y son más precisos que los análisis de QTLs de cada rasgo por separado (Alimi et al., 2013). Como se mencionó anteriormente a partir del análisis ME se puede investigar la GEI y QEI. Para ello se analiza la información conjunta de los diferentes ambientes para un rasgo fenotípico determinado (Alimi et al., 2013). Varios estudios han demostrado que los análisis ME y MT basados en modelos lineales mixtos son más potentes y eficaces para mapear QTL pleiotrópicos y evaluar la QEI en comparación con análisis de un único rasgo y ambiente (Korte et al., 2012, Sukhwinder-Singh et al., 2012, Malosetti et al., 2008, Boer et al., 2007).

Otra estrategia es realizar un análisis conjunto de los rasgos en el contexto de la GEI y QEI. Para ello, es posible realizar un análisis *multi-trait multi-environment* (MTME) que es más poderoso y preciso que los análisis ME y MT. El análisis MTME es especialmente adecuado para rasgos complejos, cuyas variaciones genéticas son generalmente debidas a un gran número de QTLs de efectos pequeños que podrían pasar desapercibidos con análisis ME o MT. Además permite una mejor detección de alelos en fase de repulsión, de la expresión diferencial de los alelos de acuerdo a los ambientes y una mayor explicación de la varianza. Esto lleva a una mejor predicción del fenotipo por el genotipo (Alimi et al., 2013).

El uso de modelos mixtos es el enfoque más utilizado en el análisis de QTLs (Vilhjálmsson y Nordborg, 2013, van Eeuwijk et al., 2010). Estos modelos permiten

afrontar muchos de los desafíos actuales, incluyendo observaciones simultáneas de muchos rasgos en múltiples ambientes, desigual número de repeticiones ya sea debido al diseño experimental y/o a datos faltantes, y mediciones fenotípicas en distintos tiempos (Malosetti et al., 2013). Además, los modelos mixtos no están basados en supuestos, como la no existencia de correlaciones genéticas entre los ambientes y los rasgos, ni la varianza homogénea a través de ambientes. Estos pueden explicar tanto la variabilidad intra e inter ensayo en la estimación de los efectos de los QTLs y en la predicción de los valores de los rasgos (van Eeuwijk et al., 2010). Este enfoque se ha aplicado extensivamente en el mapeo de QTL, desde análisis simples de un único ambiente o rasgo hasta en análisis más complejos de rasgos múltiples (MTME) con interacciones entre rasgos y/o ambientes (Klasen et al., 2012, Korte et al., 2012, Anhalt et al., 2009, Malosetti et al., 2004, 2008, Boer et al., 2007).

1.4. *Lotus japonicus* COMO LEGUMINOSA MODELO

La investigación de las respuestas asociadas a la tolerancia a la sequía requiere de una mejor comprensión de la fisiología y las bases genéticas. Si bien existe información sobre varios mecanismos fisiológicos y bioquímicos de tolerancia a la sequía, las bases genéticas son en general poco conocidas (Xiong et al., 2006, Wang et al., 2003). En este sentido, encontrar genes asociados a las respuestas bioquímicas y fisiológicas es clave para mejorar la productividad de los cultivos (Botella et al., 2005), pero el desafío actual consiste en acortar la brecha existente entre los experimentos ecofisiológicos y los realizados en organismos modelo orientados a esclarecer los mecanismos moleculares asociados a respuestas frente al estrés (Verslues et al., 2006).

Una de las plantas modelo más utilizadas actualmente es *Lotus japonicus* perteneciente a la familia *Fabaceae* (*Leguminosae*). La familia de las leguminosas, es la tercera familia más grande de las Angiospermas, comprende unos 700 géneros y alrededor de 20.000 especies, y son el segundo grupo más importante para la

agricultura después de la familia de las gramíneas. Además cumplen un rol fundamental para el desarrollo de la agricultura sostenible debido a su capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis con rizobios (Singh et al., 2007).

Arabidopsis thaliana es la planta modelo más utilizada debido a sus características y a las múltiples herramientas desarrolladas para su análisis. Sin embargo, no representa un sistema adecuado para estudiar algunos procesos fisiológicos y de desarrollo específicos de leguminosas, como por ejemplo la fijación del nitrógeno.

Las leguminosas, presentan diferencias en el tamaño del genoma, en el número de cromosomas y los niveles de ploidía (Udvardi et al., 2005, Zhu et al., 2005, Doyle y Luckow, 2003). Los primeros estudios de genómica en leguminosas se realizaron en especies de importancia agronómica como soja y poroto. Sin embargo, no son buenos sistemas modelo para estudios genéticos y genómicos, dado que presentan genomas de gran tamaño y dificultades de transformación y regeneración. En este sentido, dada la necesidad de contar con una leguminosa modelo, se seleccionaron y desarrollaron dos especies: *Lotus japonicus* (nodulación determinada) y *Medicago truncatula* (nodulación indeterminada) (Udvardi et al., 2005).

Lotus japonicus es una especie perenne nativa de Japón, Corea y China, que crece en regiones templadas. El género *Lotus* cuenta con alrededor de 200 especies en el mundo distribuidas en una diversidad de hábitats, que se dividen en dos clases según su centro de origen: procedentes de la región mediterránea (parte de Europa, África y Asia occidental) y del oeste de América del Norte (Arambarri, 2000b, 2000a). Las especies de este género más utilizadas como forrajeras en la agricultura son *L. corniculatus*, *L. tenuis* y *L. uliginosus* (Szczyglowski y Stougaard, 2008).

Lotus japonicus fue seleccionada como planta modelo debido a que presenta un genoma relativamente pequeño de 472Mb, es diploide con seis pares de cromosomas, autógama, con un ciclo de vida corto y gran producción de semillas. Es susceptible a transformaciones con *Agrobacterium tumefaciens* (Handberg y

Stougaard, 1992, Kuchuk et al., 1990). Además se ha demostrado la sintenia con leguminosas cultivables (Nelson et al., 2010, Tsubokura et al., 2008, Zhu et al., 2005), lo que hace interesante su uso como herramienta.

En los estudios genómicos realizados en esta especie fueron incorporadas varias tecnologías que incluyen la construcción de librerías genéticas, secuenciación de ADN, hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH), mapeo genético y herramientas bioinformáticas. A partir de estas se ha logrado aislar e identificar secuencias ESTs, cDNAs, segmentos de genes y construir TAC (*transformation-competent artificial chromosome*) (Sato et al., 2008, Udvardi et al., 2005). En 2000 se inició la secuenciación del genoma del ecotipo Miyakojima MG-20 y en la actualidad el 67% del genoma físico de *L. japonicus* se encuentra secuenciado esto representa el 91.3% del espacio intragénico (Sato et al., 2008). Este avance ha permitido generar más de 120.000 ESTs agrupados en 28.460 secuencias únicas. Estas ESTs se han utilizado en varios análisis del transcriptoma (Sato et al., 2008, Sato y Tabata, 2006, Asamizu et al., 2004). La información generada del genoma de *Lotus* y las secuencias de cDNAs están disponibles en bases de datos públicas y en el sitio web de Kazusa DNA Research Institute (www.kazusa.or.jp) y en el Institute for Genomic Research (TIGR) Gene Index database (www.tigr.org). Se han generado además, marcadores moleculares y tres mapas de ligamiento de alta densidad; dos a partir de las cruza interespecíficas entre *L. japonicus* x *L. filicaulis* y entre *L. japonicus* x *L. burtii* y un tercero a partir de la crusa intraespecífica de *L. japonicus* Gifu B-129 (Gifu) y *L. japonicus* Miyakojima (MG-20), los dos materiales más divergentes de dicha especie (Sandal et al., 2002, Hayashi et al., 2001, Kawaguchi et al., 2001).

La variación natural de *L. japonicus* hace que pueda ser usado en la investigación de caracteres de interés agronómico a través del mapeo de QTL. En este sentido RILs generadas a partir de la F2 de la crusa intraespecífica entre Gifu y MG-20, han sido utilizadas en varios estudios (Striker et al., 2014, Tominaga et al., 2012, Gondo et al., 2007, Sandal et al., 2006).

1.5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.5.1. Hipótesis

El uso de RILs de *L. japonicus* permitirá la identificación de QTL asociados a tolerancia/sensibilidad al déficit hídrico y relacionarlos con marcadores funcionales.

1.5.2. Objetivos

1.5.2.1. Objetivo general

Contribuir con el mejoramiento genético de leguminosas forrajeras mediante la utilización de marcadores genéticos y bioquímicos relacionados con la tolerancia/sensibilidad al déficit hídrico.

1.5.2.2. Objetivos específicos

En una población de mapeo de RIL de *L. japonicus*:

- a) Analizar variables de crecimiento y desarrollo adecuados para fenotipar la población.
- b) Detectar QTL asociados a las respuestas de tolerancia/sensibilidad al déficit hídrico.
- c) Identificar respuestas bioquímicas y fisiológicas relacionadas con la tolerancia/sensibilidad al déficit hídrico en líneas contrastantes.

2. MULTI-TRAIT AND MULTI-ENVIRONMENT QTL ANALYSES FOR TOLERANCE/SENSITIVITY WATER DEFICIT RESPONSES IN *Lotus japonicus*^a

FRANCISCO FRANCO^{1,3}, PEDRO DÍAZ¹, JORGE MONZA¹, GASTÓN QUERO¹, LUCÍA GUTIÉRREZ², OMAR BORSANI¹

¹Departamento de Biología Vegetal, Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Av. Garzón 780, 12900. Montevideo, Uruguay, ²Departamento de Biometría, Estadística y Computación, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Av. Garzón 780, 12900. Montevideo, Uruguay; ³Corresponding author, E-mail: ffrancopiccioli@gmail.com

2.1. ABSTRACT

QTL detection for drought tolerance is critical for defining breeding strategies. To understand the genetic basis of drought tolerance, a multi-trait and multi-environment QTL analysis was conducted under a hydroponic growth system with a recombinant inbred population from the model legume *Lotus japonicus* (MG-20 x Gifu). Phenotypic data for shoot and root dry weight, shoot and root relative growth rate, root to shoot ratio, and leaf development rate were collected. A total of 20 QTL were identified, some of them for different traits. A QTL close to TM1150 on chromosome 2 co-localized for root growth and development traits, while TM0246 on chromosome 3 and TM0169 on chromosome 6 co-localized for shoot and root growth, suggesting that shoot and root growth are controlled by the same loci and also root growth and development traits could be genetically linked. This study showed for the first time that this RIL population is useful for browsing genomic regions related with growth and development traits in response to water deficit.

Keywords: *Lotus japonicus*, recombinant inbred lines, Quantitative trait locus, MTME, hydroponics.

^a Artículo a publicar en: Plant Breeding

2.2. INTRODUCTION

Global climate changes are leading to alterations in rainfall patterns (Lobell et al. 2011) and drought periods are predicted to occur more frequently in many food-producing regions (Collins et al. 2008, Bhargava and Sawant 2013). Drought tolerance allows the plant to grow and maintain its performance under drought conditions; it is the result of the adaptive mechanisms of plants that enables them to resist and/or recover from stress. Crop plants show various adaptive and acclimatization strategies to drought stress, ranging from metabolic and morphological adjustments to major disruption of molecular mechanisms that regulate gene expression (Bhargava and Sawant 2013).

Tolerance to drought, like tolerance to other abiotic stresses, is a quantitative trait controlled by many minor genes that have additive effects in their expression (Mir et al. 2012) and are subjected to genotype x environment interaction (Malosetti et al. 2004). Phenotypic traits of drought tolerant crops are useful for plant breeding to identify stress-tolerant genotypes and subsequent introgression of tolerance traits into cultivated genotypes (Bhargava and Sawant 2013). QTL mapping has been successful in identifying genomic regions associated with complex quantitative traits related to drought stress (Collins et al. 2008, Mir et al. 2012, Bhargava and Sawant 2013). However, limitations to successful detection of a QTL for abiotic stress have delayed the application of this approach in crop breeding (Agbicodo et al. 2009, Salekdeh et al. 2009). Furthermore, when a genotype is subjected to different environments it produces a range of phenotypes which are the result of environmental effects on the genotype (Xu and Crouch 2008). To overcome these limitations, several considerations must be taken into account. First, it is essential to have high quality phenotypic data for an effective QTL mapping, which is necessary for an appropriate experimental system (Agbicodo et al. 2009, Salekdeh et al. 2009, Tuberosa 2012). When a genotype is subjected to different environments and produces a range of phenotypes, this is the result of the environment on genotype. Therefore, breeding crops strategies require the

evaluation of genotype x environment interactions (GEI) and therefore QTL x environment interactions (QEI) (Malosetti et al. 2004, Vargas et al. 2006) that make the interpretation of results obtained from different types of phenotyping systems difficult, especially for complex traits (Mathews et al. 2008, Ashraf 2010). The search for QTL in a multi-environment context allows the study of differential QTL expression across the different environments (Malosetti et al. 2004).

Major QTL for shoot and root growth have been identified. Bouteillé et al. (2012) working with *Arabidopsis thaliana* reported QTL for shoot and root growth and development traits and Cogann et al. (2006) working with *Trifolium repens* detected QTL for morphogenic and development traits by a multi-environment analysis. Also, Gondo et al. (2007) and Tominaga (2012) identified QTL related to vegetative and flowering traits and symbiotic nitrogen fixation activity traits, respectively, working with *L. japonicus* (MG-20 x Gifu) RIL population. Moreover, the growth and development traits can be associated with tolerance and sensitivity responses to drought stress. In this way, Quero et al. (2014) working with a *Lotus japonicus* x *Lotus burtii* RIL population identified QTL for shoot and root growth under ionic–osmotic stress. The knowledge of genomics and genetics involved in drought stress have significantly increased in crops, however we are not closer to understanding the expressed phenotype (Mifflin 2000, Verslues et al. 2006, Blum 2011). Adequate phenotyping is critical for reducing the genotype–phenotype gap, especially for quantitative traits (Mifflin 2000, Verslues et al. 2006, Tuberosa 2012). In this context, the use of model plants, such as *L. japonicus* (a perennial temperate pasture species that is closely related to agricultural relevant specie *Lotus corniculatus*), is a useful approach for improving drought tolerance (Bhargava and Sawant 2013). A linkage map based on the intraspecific cross of *L. japonicus* ecotypes Gifu B-129 by Miyakojima MG-20 (Hayashi et al. 2001) can be used to identify QTL related to agronomic traits (Gondo et al. 2007, Klein and Grusak 2009, Tominaga et al. 2012, Quero et al. 2014, Striker et al. 2014).

Our aim was to identify genomic regions associated with tolerance/sensitivity water deficit responses by using a population of *L. japonicus* recombinant inbred lines in an experimental system designed for large-scale phenotyping taking into account genotype by environment interactions to better understand the phenotype.

2.3. MATERIALS AND METHODS

2.3.1. Plant material

A total of 100 *L. japonicus* recombinant inbred lines (RIL) from a cross between the ecotypes Gifu B-129 (Gifu) and Miyakojima MG-20 (MG-20) were used for QTL mapping under water deficit conditions. These lines were self-pollinated up to the F8 generation from F2 seeds developed by Dr. M. Kawaguchi (National Institute for Basic Biology) at the Kazusa DNA Research Institute, Japan. The seeds were obtained from the National BioResource Project, Miyazaki University (www.legumebase.brc.miyazaki-u.ac.jp/index.jsp) (Gondo et al. 2007, Tominaga et al. 2012).

2.3.2. Linkage map

A total of 96 microsatellite markers were selected from a genetic linkage map of *L. japonicus* (Hayashi et al. 2001). The marker positions and genotypic data for each RIL can be found on the Web site (www.kazusa.or.jp/lotus). A linkage map for the RIL population was constructed by using the R/onemap 2.0 package (Margarido et al. 2007) in R environment (R Core Team 2014). A two-point analysis was used for estimating the recombination fraction of all marker-pair combinations. A significance threshold was set at a logarithm of odds (LOD) score of 4.0 and a maximal recombination fraction of 0.5 to assign markers to linkage groups. After markers were assigned to linkage groups, markers were re-ordered using a LOD score of 3.0 and the Kosambi mapping function to estimate genetic distances. The

genome similarity matrix from each line was obtained by a simple matching with the parental genotype using the free software Flapjack (Milne et al. 2010).

2.3.3. Experimental conditions

A Split-plot in a Randomized Complete Block Design with three replications was used to evaluate two levels of water deficit. The main plot consisted of a tray with a combination of nitrogen and water deficit and the split-plot consisted of individual RIL. Seed germination of all RIL population was conducted in Petri dishes with 0.8% (w/v) agar/water under continuous light at 28°C. Germinated seeds (radicles 2–3 mm length) were transferred to trays. Plants were grown in 1.6 L trays in a hydroponic system supplied with a Hornum solution (Handberg and Stougaard 1992) and continuously subjected to an air flux through 0.5 cm diameter tubes connected to a Champion® CX-0098 air pump. In each tray, twenty drilled acrylic rulers supported the seedlings (Quero et al. 2014). After 12 days of growing, the nitrogen treatments were established as follow: 1 and 10 mM of nitrogen as nitrate were established adding a Hornum nutrient solution with a slight modification consisting of KNO₃ as the only nitrogen source. N concentrations used were defined based on a suitable concentration for the growth of this species and a concentration 10 times higher similar to a fertilized soil. The plants grew in these nitrogen conditions for 14 days (until 26 days after germination). At day 26, the water deficit treatments were established: trays were either not stressed or stressed. Drought stress was created by the addition of *polyethylene glycol* (PEG) 8000 at 10% (w/v) which generate an osmotic potential of –0.6 MPa. All the RIL were grown at these conditions during 20 days until the assay was harvested, establishing four stress treatments for all 100 RIL: 1 mM of nitrogen not stressed (C-1) and stressed (S-1), and 10 mM of nitrogen not stressed (C-10) and stressed (S-10).

2.3.4. Growth parameters

In order to quantify plant growth and development, the length of plant shoots and roots and the number of leaves were recorded at 26 and 46 days old (just before

the addition of PEG and at the end of the assay, respectively). The plant evaluations were conducted in a nondestructive manner by image analysis of individual plants using the free software ImageJ (Abràmoff et al. 2004). Shoot dry weight (SDW) and root dry weight (RDW) were recorded at the end of the assay. Shoot and root relative growth rates (RGR_{shoot} , RGR_{root}) were calculated as:

$$RGR = (\ln L_f - \ln L_i)/(t_f - t_i)$$

where L_f and L_i are final and initial length, while t_f and t_i are final and initial time, respectively. Shoot and root initial and final lengths were used to calculate RGR_{shoot} and RGR_{root} , respectively.

2.3.5. Developmental parameters

Root/shoot ratio (RSR) was calculated as:

$$RSR = L_{Rf}/L_{Sf}$$

where L_{Rf} and L_{Sf} are the root and shoot final length, respectively. Leaf development rate (LDR) was calculated as:

$$LDR = (\ln L_n - \ln L_i)/(t_f - t_i)$$

where L_n and L_i are the final and initial number of leaves, respectively, while t_f and t_i are final and initial time.

2.3.6. Correlation analysis

Pearson's Correlation Coefficients were calculated by using the R/GGally package (Schloerke et al. 2014) of R software (R Core Team 2014).

2.3.7. Statistical analyses

A table of phenotypic means was created for each variable, by using the following linear model:

$$Y_{ijkn} = \mu + \beta_i + N_j + P_k + NP_{jk} + S_{ijk} + G_n + NG_{kn} + NPG_{jkn} + \epsilon_{ijkn}$$

where Y_{ijk} is the observed variable, β_i is the i -th block, N_j is the j -th nitrogen condition, P_k is the k -th water deficit condition, NP_{jk} is the nitrogen condition by water deficit interaction, S_{ijk} is the main plot error associated to the i -th tray in the j -th nitrogen condition and k -th water deficit treatment with $S_{ijk} \sim N(0, \sigma_s^2)$, G_n is the n -th RIL genotype, NG_{jn} is the nitrogen condition by genotype interaction, PG_{kn} is the water deficit by genotype interaction, NPG_{jkn} is the nitrogen condition and water deficit condition by genotype interaction, and ε_{ijkn} are random residual effects with $\varepsilon_{ijkn} \sim N(0, \sigma^2)$.

Having defined the environment (E) as the combination nitrogen each level with each level of PEG proceeded to perform a two-step analysis for QTL mapping. First, a table of GxE phenotypic means was created for each trait (i.e. SDW, RGR_{shoot} , RDW, RGR_{root} , LDR and RSR), and then a multi-trait multi-environment QTL mapping (MTME) procedure was used (Malosetti et al. 2008) where trait and stress-specific and trait and stress-general QTL were detected. A MTME was performed in R using mixed models following Malosetti et al. (2008). In brief, the model for the genotypic effect is partitioned into QTL main effect and residual genotypic effect. While the Genotype by Trait and Stress interaction is partitioned into QTL by trait and stress effect and residual genotype by trait and stress effect.

The R/qtl package (Broman et al. 2003) was used to obtain genotypic predictors for the RIL population at marker positions and at an additional grid of points with a maximum spacing of 10 cM. A composite-interval mapping approach was then followed where cofactors were chosen with a forward selection; markers or pseudo-markers with a significant marker-trait association in a single-interval mapping were used in subsequent rounds of the analysis as marker-cofactors to control for background genetic loci. A window of 50 cM was used for marker cofactors; within that window a cofactor was removed to avoid collinearity. A R/lme4 package (Bates and Maechler, 2010) was used to fit the linear mixed model to detect environment-specific QTLs with a compound symmetry structure for the VCOV across environments (stress-levels) and traits, and using markers-by-stress

and trait (genetic predictors by stress and trait) as explanatory variables. The threshold was defined with a corrected Li and Ji (2005) p-value with a significant level of 0.05. As a convention, a positive effect was assigned if the superior allele came from the *L. japonicus* MG-20 parent while a QTL negative effect indicated that the superior allele came from *L. japonicus* Gifu.

2.4. RESULTS

2.4.1. Phenotypic response of the RIL population under water deficit

A RIL population of *L. japonicus* (Gifu B-129 x Miyakojima MG-20) were subjected to control and water deficit treatments by 20 days. Water deficit reduced SDW, RDW, RGR_{shoot} and RGR_{root} , in average across RILs, compared with controls (Fig. 1 and 2). SDW and RGR_{root} reduction was higher in RILs grown with 10 mM nitrogen as nitrate (37 and 30%, respectively), compared to reduction with 1 mM nitrogen as nitrate (22 and 15%, respectively). Conversely water deficit increased RSR compared with control, while the increase in LDR was only observed in plants grown with 10 mM nitrogen as nitrate (Fig. 1 and 2).

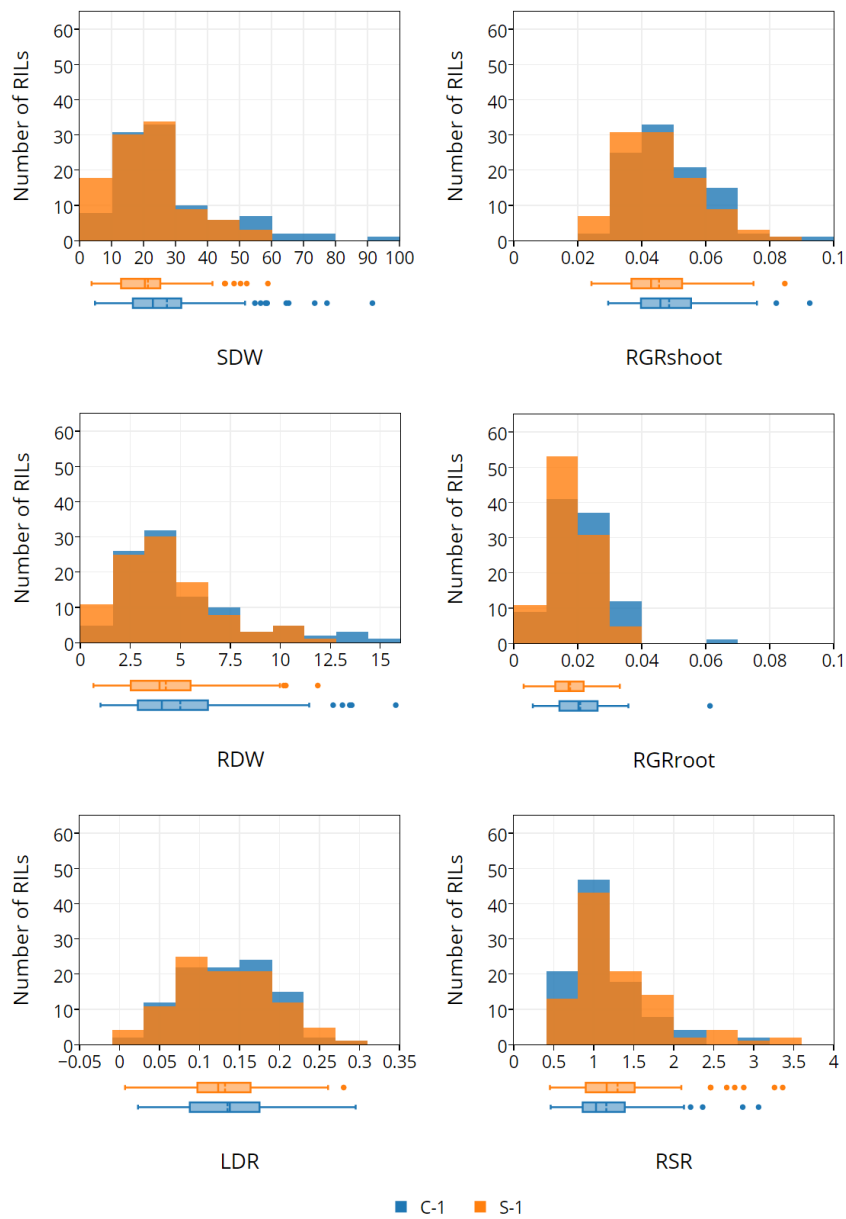


Fig. 1: Variability in water deficit impact on growth and development parameters in a RIL population of *Lotus japonicus* (Gifu x MG-20). C-1 indicates the control condition with 1 mM of nitrogen as nitrate. S-1 indicates drought stress induced by the addition of 10% polyethylene glycol (PEG) with 1 mM of nitrogen as nitrate. SDW, RDW: shoot and root dry weight (mg); RGR_{shoot} , RGR_{root} : relative growth rates of shoot and root; RSR: root/shoot ratio, LDR: leaf development rate (number of leaves per day).

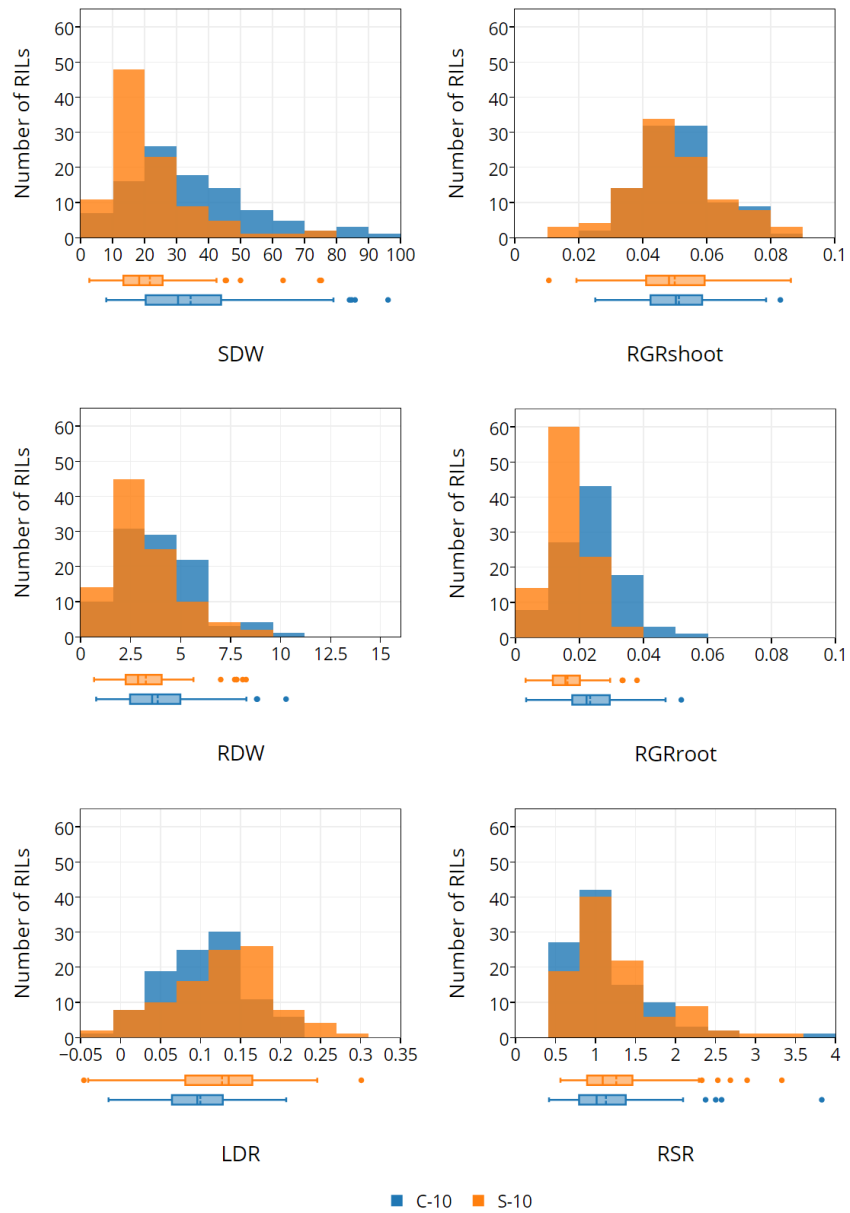


Fig. 2: Variability in water deficit impact on growth and development parameters in a RIL population of *Lotus japonicus* (Gifu x MG-20). C-10 indicates the control condition with 10 mM of nitrogen as nitrate. S-10 indicates drought stress induced by the addition of 10% polyethylene glycol (PEG) with 10 mM of nitrogen as nitrate. SDW, RDW: shoot and root dry weight (mg); RGR_{shoot} , RGR_{root} : relative growth rates of shoot and root; RSR: root/shoot ratio, LDR: leaf development rate (number of leaves per day).

2.4.2. Phenotypic correlations

The strongest correlations were between SDW and RDW regardless of environment (C-10, C-1, S-10 and S-1, Fig. 3). Moreover, SDW had a strong negative correlation with RSR, regardless of environment. Correlation between RGR_{shoot} and LDR showed higher levels of significance in the environments with 10 mM nitrogen as nitrate (C-10 and S-10), regardless of the PEG concentration. At the same time, correlation between RGR_{shoot} and RGR_{root} was only significant in 10% PEG and 10 mM nitrogen as nitrate (S-10). Moreover, correlations between RGR_{root} and LDR were significant in 10% PEG (S-10 and S-1), regardless of the nitrate concentration.

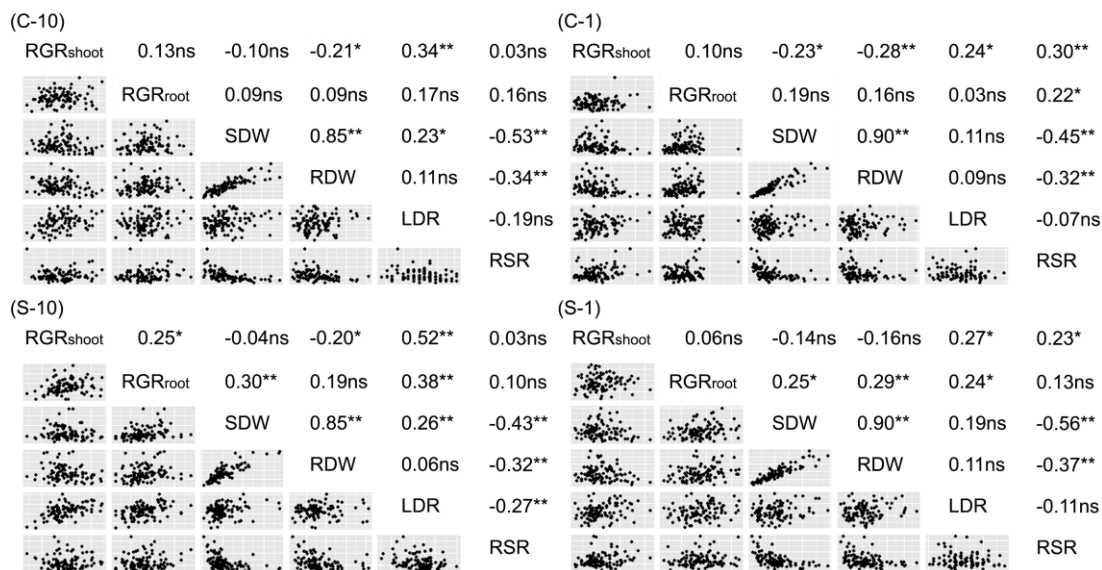


Fig. 3: Pearson's correlation coefficients between growth and development parameters in a RIL population of *Lotus japonicus* (Gifu and MG-20). Growth conditions: (S) indicates drought stress induced by the addition of 10% polyethylene glycol (PEG) and (C) indicates the control condition, the numbers 1 and 10 indicate 1 and 10 mM of nitrogen as nitrate respectively. Parameters are shown in the diagonal. Bottom left corner: diagram of correlation between parameters. Upper right corner: correlation coefficient (*= $p < 0.05$ **= $p < 0.01$ ns: Non-significant). SDW, RDW: shoot and root dry weight (mg); RGR_{shoot} , RGR_{root} : relative growth rates of shoot and root; RSR: root/shoot ratio, LDR: leaf development rate (number of leaves per day).

2.4.3. Identification of QTL related to tolerance/sensitivity to water deficit responses

A total of 20 QTL were identified; six associated with RGR_{shoot} and SDW, six associated with RGR_{root} and RDW and eight associated with RSR and LDR (Fig. 4).

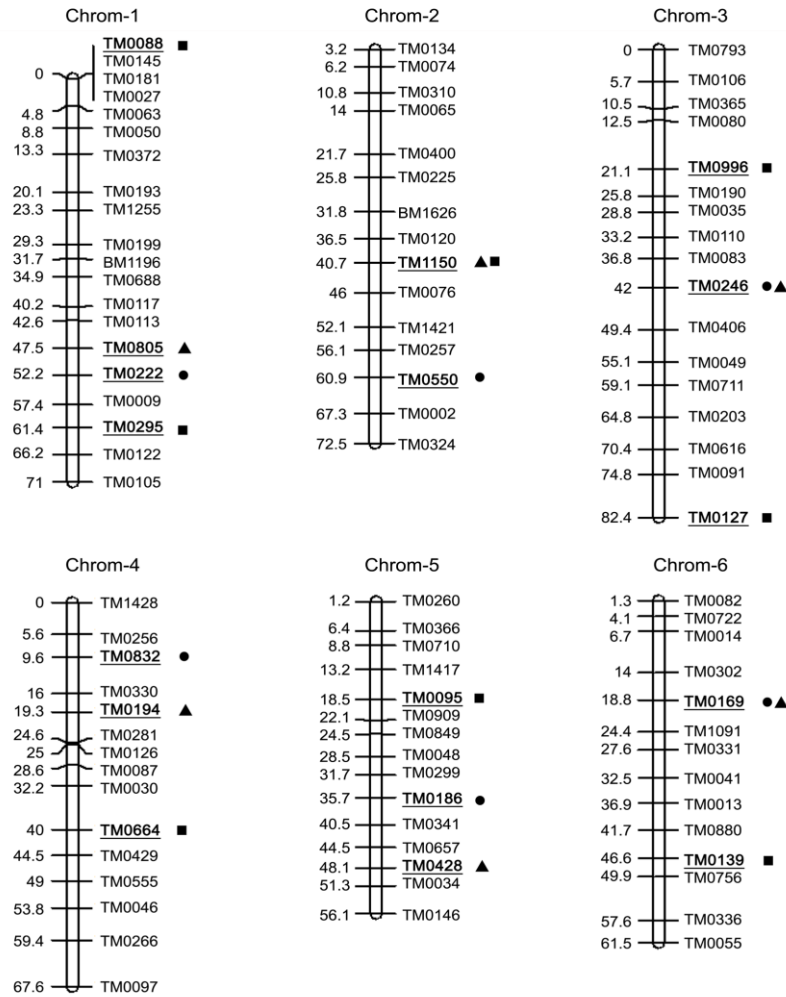


Fig. 4: Location on the genetic map of the QTL identified for tolerance/sensitivity water deficit responses in *L. japonicus* (Gifu x MG-20) RIL population. Black circles (●) indicate QTL associated with shoot parameters: shoot dry weight (SDW) and relative growth rate of shoot (RGR_{shoot}); black triangles (▲) indicate QTL associated with root parameters: root dry weight (RDW) and relative growth rate of root (RGR_{root}); black squares (■) indicate QTL associated with development parameters: root/shoot ratio (RSR) and leaf development rate (LDR).

We found three QTL co-located at TM1150 (Chr. 2) related to RGR_{root} , RDW, RSR and LDR, at TM0246 (Chr. 3) related to RGR_{shoot} , SDW, RGR_{root} and RDW and at TM0169 (Chr. 6) related to RGR_{shoot} , SDW, RGR_{root} and RDW (Fig. 4). QTL at TM1150 (Chr. 2) related to RDW and RGR_{root} was found in a region close to the marker, whereas QTL related to LDR and RSR matched with the location of the marker.

2.4.3.1. Multi-trait and multi-environment QTL analysis for growth and development parameters

Six QTL associated with RGR_{shoot} and SDW were identified (Fig. 5A). Larger additive effects for RGR_{shoot} were observed at TM0550 (Chr. 2), TM0246 (Chr. 3) and TM0832 (Chr. 4), while for SDW they were observed at TM0222 (Chr. 1), TM0550 (Chr. 2) and TM0832 (Chr. 4). MG-20 provided the positive allele for QTL on chromosomes 2 (in a region close to the marker TM0550) and 5 (marker TM0186) for SDW and RGR_{shoot} . On the other hand, Gifu provided the positive allele for QTL on chromosome 3 (marker TM0246) for SDW and RGR_{shoot} (Fig. 5A). In addition, MG-20 provided the positive allele for QTL on chromosomes 1 (in a region close to the marker TM0222), 4 (in a region close to the marker TM0832) and 6 (marker TM0169) for SDW, whereas Gifu provided the positive allele for RGR_{shoot} (Fig. 5A).

QTL related to RGR_{shoot} showed consistent effects across all environments; however QTL associated with SDW showed changes of the magnitude of effects across the environments. Overall, QTL associated with SDW presented superior effects in control environments compared to water deficit environments for each nitrogen concentration. In turn in most of QTL the effects were larger when nitrogen availability was higher.

Six QTL associated to RGR_{root} and RDW were identified (Fig. 5B). Larger additive effects for RGR_{root} were observed at TM0194 (Chr. 4), TM0428 (Chr. 5) and TM0169 (Chr. 6) while for RDW they were observed at TM0805 (Chr. 1), TM1150 (Chr. 2), TM0246 (Chr. 3) and TM0194 (Chr. 4). MG-20 provided the positive allele for QTL on chromosomes 1 (marker TM0805) and 2 (in a region close to the marker TM1150) for RDW and RGR_{root} . On the other hand, Gifu provided the positive allele

for QTL on chromosome 3 (marker TM0246) for SDW and RGR_{shoot} (Fig. 5B). In addition MG-20 provided positive alleles for QTL on chromosomes 4 (in a region close to the marker TM0194), 5 (marker TM0428) and 6 (marker TM0169) for RDW, whereas Gifu provided the positive allele for RGR_{root} (Fig. 5B). QTL related to RGR_{root} showed consistent effects across all environments; however QTL associated with RDW showed changes of the magnitude of effects across the environments. In general, QTL associated with RDW showed larger effects in 1 than in 10 mM nitrogen environments, when water deficit environments were compared and also for control environments.

Eight QTL associated with LDR and RSR were identified (Fig. 5C). Larger additive effects for RSR were observed at TM0088 (Chr. 1), TM0295 (Chr. 1) and TM0139 (Chr. 6) while for LDR they were observed at TM0088 (Chr.1), TM1150 (Chr. 2), TM0127 (Chr. 3) and TM0095 (Chr. 5). MG-20 provided the positive allele for QTL on chromosome 6 (marker TM0139) for LDR and RSR (Fig. 5C). Gifu provided the positive allele for QTL on chromosomes 1 (marker TM0088), 2 (marker TM1150), 3 (marker TM0127) and 5 (marker TM0095) for RSR, however, MG-20 provided the positive allele for QTL for LDR (Fig. 5C). QTL for RSR showed crossover interactions and/or differences in the magnitude of effects, however QTL related to LDR showed only changes in the magnitude of effects (Fig. 5C). In some cases, as the markers TM0088 (Chr. 1) and TM1150 (Chr. 2) related to RSR, the effects were larger in water deficit environments.

QTL on chromosomes 3 (in a region close to the marker TM0996) and 4 (marker TM0664) presented crossover interactions for RSR, where MG-20 provided the positive allele in S-1, S-10 and C-1 whereas Gifu provided the positive allele for C-10. However, Gifu provided the positive allele for LDR. In contrast, QTL on chromosome 1 (marker TM0295) presented crossover interactions for RSR, but in this case Gifu provided the positive allele in S-1, S-10 and C-1 whereas MG-20 provided the positive allele for C-10, and MG-20 provided the positive allele for LDR (Fig. 5C).

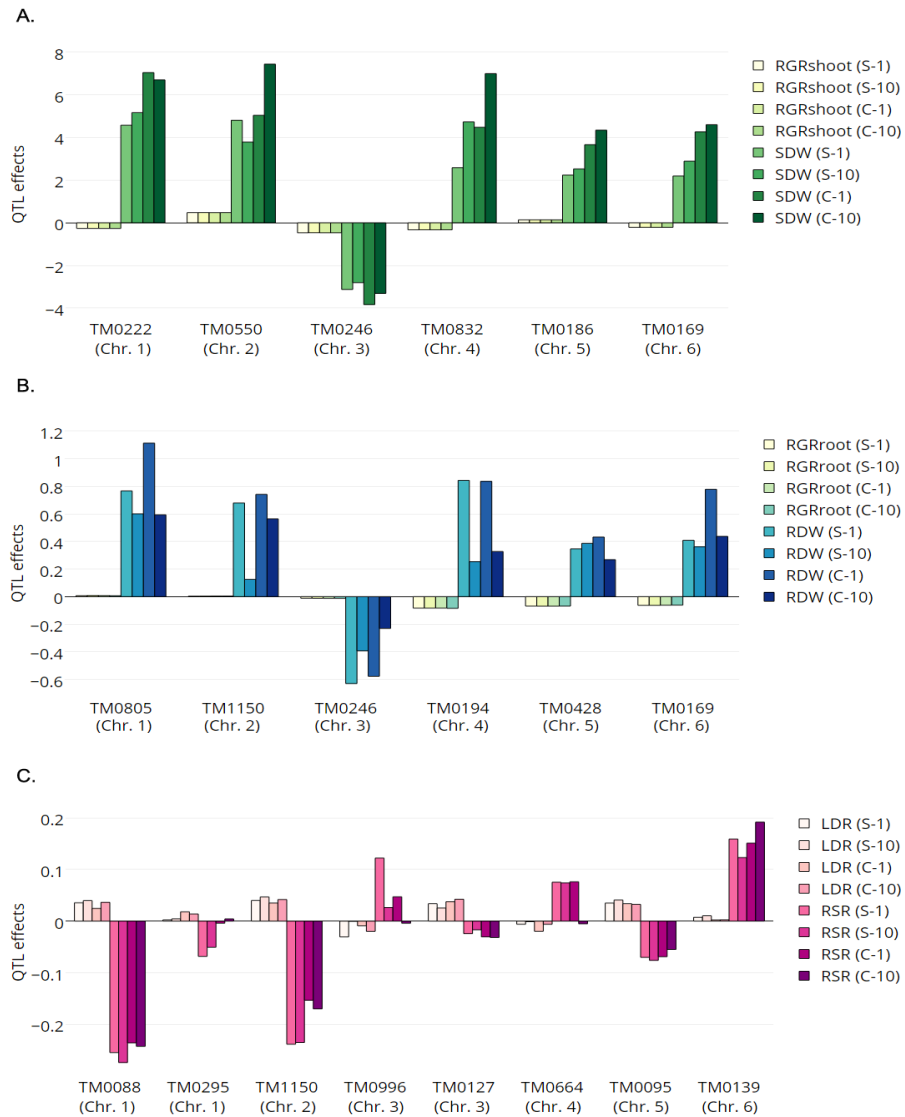


Fig. 5: Multi-trait and multi-environment QTL effects for growth and development traits of the *Lotus japonicus* RIL population (Gifu x MG-20). (A.) shoot growth parameters: relative growth rate of shoot (RGR_{shoot}) and shoot dry weight in mg (SDW). (B.) root growth parameters: relative growth rate of root (RGR_{root}) and root dry weight in mg (RDW). (C.) development parameters: leaf development rate expressed as number of leaves per day (LDR) and root/shoot ratio (RSR). Growth conditions: (S) indicates water deficit induced by the addition of 10% polyethylene glycol (PEG) and (C) indicates the control condition, the numbers 1 and 10 indicate 1 and 10mM of nitrogen as nitrate respectively. As a convention, a positive effect is assigned if the superior allele comes from the MG-20 parent and a negative effect if the superior allele comes from the Gifu parent.

2.5. DISCUSSION

2.5.1. Correlation among growth and development parameters

The strong and positive correlations between SDW and RDW across the four experimental environments were consistent with some of the results where the growth of the shoots and roots were associated with the same QTL (Fig. 3). A strong correlation between SDW and RDW in *Solanum tuberosum* and *Vigna unguiculata* under salt stress conditions have been found ($r=0.81$ and $r=0.77$ respectively) (Anithakumari et al. 2012, Gogile et al. 2013).

2.5.2. QTL related to tolerance/sensitivity water deficit responses in Lotus

Some QTL found in this study were previously reported using the same *L. japonicus* Gifu x MG-20 RIL population as used here (Gondo et al. 2007, Tominaga et al. 2012, Striker et al. 2014) and using RILs from the cross between *L. japonicus* Gifu B-129 and *L. burtti* B-303 (Quero et al. 2014). A QTL close to TM0186 (Chr. 5) has been associated with SDW (Striker et al. 2014), stem length (Tominaga et al. 2012) and RGR_{shoot} (Quero et al. 2014), while we found a QTL associated with RGR_{shoot} and SDW indicating that the region linked to this marker is highly associated with shoot growth (Fig. 4). On the other hand, Tominaga et al.(2012) identified a QTL in a region close to TM1150 (Chr. 2) associated with stem length, while we found two co-located QTL associated to RGR_{root} , RDW and RSR, LDR, indicating that the region linked to this marker is highly associated with plant growth (Fig. 4). Moreover, a QTL in a region close to TM0805 (Chr. 1) has been associated with stem length (Tominaga et al. 2012), total primary shoot length, primary shoot number and RDW (Striker et al. 2014), while in the same region we found a QTL related to RGR_{root} and RDW. We found a QTL in a region close to the marker TM0996 (Chr. 3) related to RSR and LDR (Fig. 4). This QTL has been associated with plant height (Gondo et al. 2007), stem length (Tominaga et al. 2012) and RGR_{shoot} and shoot/root ratio (Quero et al. 2014), indicating that the region linked to this marker is highly associated with plant length and development traits. As found earlier, in this study we identified a

QTL at TM0127 (Chr. 3) associated with RSR and LDR (Fig. 4), that was related to leaflet width (Gondo et al. 2007) and shoot/root ratio (Quero et al. 2014). Stem length showed a strong correlation with leaflet width and leaflet length (Gondo et al. 2007). This suggests that the region linked to this marker is highly associated with plant length and leaf growth. Moreover, Striker et al. (2014) identified a QTL associated with total primary shoot length close to TM0139 (Chr. 6), while Tominaga et al. (2012) identified QTL for stem length at TM0088 (Chr. 1), at TM0095 (Chr. 5) and at TM0139 (Chr. 6), in the same regions, we found QTL associated with RSR and LDR (Fig. 4), indicating that the regions linked to these markers are highly associated with plant length and leaf development. Gondo et al. (2007) found a QTL associated with stem thickness (strongly correlated with stem length, leaflet width and leaflet length) in a region close to TM0295 (Chr. 1). In the same region Striker et al. (2014), found a QTL associated with RDW, while we found a QTL associated to RSR and LDR (Fig. 4), indicating that the region linked to this marker is highly associated with plant and leaves growth. Striker et al (2014) found a QTL associated with total primary shoot length, primary shoot number and RDW close to TM0222 (Chr. 1), while we found a QTL related to RGR_{shoot} and SDW in the same region (Fig. 4), indicating that the region linked to this marker is highly associated with plant growth. Striker et al. (2014) found a QTL related to primary shoot and the number of secondary branches number close to TM0194 (Chr. 4) and another QTL related to SDW, stomatal conductance and secondary branches number close to TM0428 (Chr. 5), which we found associated with RGR_{root} and RDW (Fig. 4), indicating that the regions linked to these markers are highly associated with plant growth. We found a QTL related to RSR and LDR TM0664 (Chr. 4) that were previously associated to secondary branches number (Striker et al. 2014).

In our study we found some QTL associated with plant growth and development traits that have not been reported to date. Two co-located QTL for RGR_{shoot} , SDW, RGR_{root} and RDW (TM0246 on chromosome 3 and TM0169 on chromosome 6) were detected (Fig. 4). Moreover, two QTL related to RGR_{shoot} and

SDW (at regions close to markers TM0550 on chromosome 2 and TM0832 on chromosome 4) were identified.

2.5.3. QTL effects on growth and development parameters

Plant breeders are interested in genotypes that are adapted to a range of environments including drought and soil nitrogen content as well as those genotypes that are adapted to specific environments. In this way, QTL effects observed in different environments are useful to decide which regions should be prioritized in order to include the favorable alleles from both parental lines to maximize the adaptation to a wide range or specific environment (Malosetti et al. 2013).

In some of the genotypes we identified differential effects of drought depending on nitrogen status. The nitrogen availability in soils affects plant growth and it is well known that nitrogen interacts with water use efficiency (Sadras 2004, Cao et al. 2007, Guo et al. 2008, Song et al. 2010). According to Cao et al. (2007) and Malosetti et al. (2013), it is necessary to keep the nitrogen concentration in the environment in mind while searching for QTL for drought tolerance.

In some cases, despite changes in magnitude of the effects related to SDW, RDW, LDR and RSR across the environments, for breeding a specific parental allele will always be selected for each marker. MG-20 allele must be selected for QTL related to markers TM0550 (Chr. 2), TM0186 (Chr. 5) (Fig. 5A), TM0805 (Chr. 1), TM1150 (Chr. 2) (Fig. 5B), and TM0139 (Chr. 6) (Fig. 5C). Gifu allele must be selected for QTL related to marker TM0246 (Chr. 3) (Fig. 5A and B).

In other cases, MG-20 allele has to be selected to enhance the SDW, RDW and LDR; however Gifu allele will be the choice when selecting for RGR_{shoot} , RGR_{root} and RSR. This was observed for QTL related to markers TM0222 (Chr. 1), TM0832 (Chr. 4) (Fig. 5A), TM0194 (Chr. 4), TM0428 (Chr. 5) (Fig. 5B), TM0169 (Chr. 6) (Fig. 5A and B), TM0088 (Chr. 1), TM1150 (Chr. 2), TM0127 (Chr. 3) TM0095 (Chr. 5) (Fig. 5C).

Moreover, for QTL related to LDR and RSR close to markers TM0295 (Chr. 1), TM0996 (Chr. 3) and TM0664 (Chr. 4) (Fig. 5C), MG-20 allele has to be selected to enhance LDR, however these QTL showed crossover interactions for RSR. In this sense, Gifu allele has to be selected to enhance RSR in water deficit environments and control with low nitrogen availability environment, whereas MG-20 has to be selected in control and high nitrogen environment for QTL closed to marker TM0295 (Chr. 1). In contrast, MG-20 allele has to be selected to enhance RSR in water deficit environments and control with low nitrogen availability environment, whereas Gifu has to be selected in control and high nitrogen environment for QTL closed to markers 1 and 2.

In general terms, the QTL effects observed for SDW were higher in water deficit environments and at the same time when nitrogen availability was higher. From this it can be interpreted that for most of the QTL related to SDW, an increased availability of nitrogen determines that plants obtain greater biomass. Moreover, the effects observed for RDW were larger in environments with a low availability of nitrogen in water deficit and also in control environments. These suggest that the QTL effects related to RDW determines higher root biomass with low nitrogen availability because is promoted the root exploration to overcome the stress condition. This may be related to greater QTL effects observed in markers associated with RSR where an increase in water stress conditions was observed. However only the QTL close to markers TM0996 (Chr. 3) and TM0139 (Chr. 6) showed an increase in QTL effects in water deficit and low nitrogen availability environment.

2.6. CONCLUSIONS

In this study genomic regions important for plant growth and development variables were identified. Information on QTL effects found in this study contributes to the understanding of drought tolerance in *L. japonicus* and is useful to select complementary lines that include the favorable alleles from both parental lines. The

complete sequencing of the *L. japonicus* genome opens the possibility of fine mapping of the QTL and to identify the genes responsible for the QTL effects.

2.7. ACKNOWLEDGEMENTS

The first author was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) by a fellowship of national postgraduate POS_NAC_2013_1_11593. The study was partially supported by the project ANII-FCE_6918 and Universidad de la República (Grupo de Investigación CSIC 418).

2.8. REFERENCES

- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., and Ram, S. J., 2004: Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*. **11**, 36–42.
- Agbicodo, E. M., Fatokun, C. A., Muranaka, S., Visser, R. G. F., and Linden van der, C. G., 2009: Breeding drought tolerant cowpea: constraints, accomplishments, and future prospects. *Euphytica*. **167**, 353–370.
- Alimi, N. A., Bink, M. C. A. M., Dieleman, J. A., Magán, J. J., Wubs, A. M., Palloix, A., and van Eeuwijk, F. A., 2013: Multi-trait and multi-environment QTL analyses of yield and a set of physiological traits in pepper. *Theoretical and Applied Genetics*. **126**, 2597–2625.
- Anithakumari, A. M., Nataraja, K. N., Visser, R. G. F., and van der Linden, C. G., 2012: Genetic dissection of drought tolerance and recovery potential by quantitative trait locus mapping of a diploid potato population. *Molecular Breeding*. **30**, 1413–1429.
- Ashraf, M., 2010: Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology Advances*. **28**, 169–183.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*. **67**, 1-48.
- Bhargava, S., and Sawant, K., 2013: Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*. **132**, 21–32.
- Blum, A., 2011: Drought resistance - is it really a complex trait? *Functional Plant Biology*. **38**, 753–757.
- Bouteillé, M., Rolland, G., Balsera, C., Loudet, O., and Muller, B., 2012: Disentangling the intertwined genetic bases of root and shoot growth in *Arabidopsis*. *PLoS One*. **7**, e32319.
- Broman, K. W., Wu, H., Sen, S., and Churchill, G. A., 2003: R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*. **19**, 889–890.
- Cao, H. X., Zhang, Z. B., Xu, P., Chu, L. Y., Shao, H. B., Lu, Z. H., and Liu, J. H., 2007: Mutual physiological genetic mechanism of plant high water use efficiency and nutrition use efficiency. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **57**, 1–7.

- Cogan, N. O. I., Abberton, M. T., Smith, K. F., Kearney, G., Marshall, A. H., Williams, A., Michaelson-Yeates, T. P. T., Bowen, C., Jones, E. S., Vecchies, A. C., and Forster, J. W., 2006: Individual and multi-environment combined analyses identify QTLs for morphogenetic and reproductive development traits in white clover (*Trifolium repens* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. **112**, 1401–1415.
- Collins, N. C., Tardieu, F., and Tuberosa, R., 2008: Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant Physiology*. **147**, 469–486.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., and Robledo, C., 2013: Infostat - Software estadístico. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Gogile, A., Andargie, M., and Muthuswamy, M., 2013: Screening Selected Genotypes of Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] for Salt Tolerance During Seedling Growth Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. **16**, 671–679.
- Gondo, T., Sato, S., Okumura, K., Tabata, S., Akashi, R., and Isobe, S., 2007: Quantitative trait locus analysis of multiple agronomic traits in the model legume *Lotus japonicus*. *Genome*. **637**, 627–637.
- Guo, S., Zhou, Y., Li, Y., Gao, Y., and Shen, Q., 2008: Effects of different Nitrogen forms and osmotic stress on water use efficiency of rice (*Oryza sativa*). *Annals of Applied Biology*. **153**, 127–134.
- Handberg, K., and Stougaard, J., 1992: *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*. **2**, 487–496.
- Hayashi, M., Miyahara, A., Sato, S., Kato, T., Yoshikawa, M., Taketa, M., Pedrosa, A., Onda, R., Imaizumi-Anraku, H., Bachmair, A., Sandal, N., Stougaard, J., Murooka, Y., Tabata, S., Kawasaki, S., Kawaguchi, M., and Harada, K., 2001: Construction of a genetic linkage map of the model legume *Lotus japonicus* using an intraspecific F2 population. *DNA Research*. **8**, 301–310.
- Klein, M. A., and Grusak, M. A., 2009: Identification of nutrient and physical seed trait QTL in the model legume *Lotus japonicus*. *Genome*. **52**, 677–691.
- Li, J., and Ji, L., 2005: Adjusting multiple testing in multilocus analyses using the eigenvalues of a correlation matrix. *Heredity*. **95**, 221–227.
- Lobell, D., Schlenker, W., and Costa-Roberts, J., 2011: Climate trends and global crop production since 1980. *Science*. **333**, 616–620.

- Malosetti, M., Ribaut, J. M., and van Eeuwijk, F. A., 2013: The statistical analysis of multi-environment data: modeling genotype-by-environment interaction and its genetic basis. *Frontiers in Physiology*. **4**, 44.
- Malosetti, M., Ribaut, J. M., Vargas, M., Crossa, J., and van Eeuwijk, F. A., 2008: A multi-trait multi-environment QTL mixed model with an application to drought and nitrogen stress trials in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica*. **161**, 241–257.
- Malosetti, M., Voltas, J., Romagosa, I., Ullrich, S. E., and van Eeuwijk, F. A., 2004: Mixed models including environmental covariables for studying QTL. *Euphytica*. **137**, 139–145.
- Margarido, G. R. A., Souza, A. P., and Garcia, A. A. F., 2007: OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas*. **144**, 78–79.
- Mathews, K. L., Malosetti, M., Chapman, S., McIntyre, L., Reynolds, M., Shorter, R., and van Eeuwijk, F., 2008: Multi-environment QTL mixed models for drought stress adaptation in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. **117**, 1077–1091.
- Mifflin, B., 2000: Crop improvement in the 21st century. *Journal of Experimental Botany*. **51**, 1–8.
- Milne, I., Shaw, P., Stephen, G., Bayer, M., Cardle, L., Thomas, W. T. B., Flavell, A. J., and Marshall, D., 2010: Flapjack—graphical genotype visualization. *Bioinformatics*. **26**, 3133–3134.
- Mir, R. R., Zaman-Allah, M., Sreenivasulu, N., Trethowan, R., and Varshney, R. K., 2012: Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops. *Theoretical and Applied Genetics*. **125**, 625–645.
- Quero, G., Gutiérrez, L., and Lascano, R., 2014: Identification of QTLs for shoot and root growth under ionic–osmotic stress in *Lotus*, using a RIL population. *Crop and Pasture Science*. **65**, 139–149.
- R Core Team, 2014: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Sadras, V. O., 2004: Yield and water-use efficiency of water- and nitrogen-stressed wheat crops increase with degree of co-limitation. *European Journal of Agronomy*. **21**, 455–464.

- Salekdeh, G. H., Reynolds, M., Bennett, J., and Boyer, J., 2009: Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding. *Trends in Plant Science*. **14**, 488–496.
- Schloerke, B., Crowley, J., Cook, D., Hofmann, H., Wickham, H., Briatte, F., and Marbach, M., 2014: GGally: Extension to ggplot2. R Package Version 0.4.6. <http://CRAN.R-project.org/package=GGally>.
- Song, C. J., Ma, K. M., Qu, L. Y., Liu, Y., Xu, X. L., Fu, B. J., and Zhong, J. F., 2010: Interactive effects of water, nitrogen and phosphorus on the growth, biomass partitioning and water-use efficiency of *Bauhinia faberi* seedlings. *Journal of Arid Environments*. **74**, 1003–1012.
- Striker, G. G., Casas, C., Manzur, M. E., Ploschuk, R. A., Casal, J. J. 2014: Phenomic networks reveal largely independent root and shoot adjustment in waterlogged plants of *Lotus japonicus*. *Plant, Cell and Environment*. **37**, 2278–2293.
- Tominaga, A., Gondo, T., and Akashi, R., 2012: Quantitative trait locus analysis of symbiotic nitrogen fixation activity in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research*. **125**, 395–406.
- Tuberosa, R., 2012: Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. *Frontiers in Physiology*. **3**, 1–26.
- Vargas, M., van Eeuwijk, F. A., Crossa, J., and Ribaut, J. M., 2006: Mapping QTLs and QTL x environment interaction for CIMMYT maize drought stress program using factorial regression and partial least squares methods. *Theoretical and Applied Genetics*. **112**, 1009–1023.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., and Zhu, J. K., 2006: Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*. **45**, 523–539.
- Xu, Y., and Crouch, J. H., 2008: Marker-Assisted Selection in Plant Breeding: From Publications to Practice. *Crop Science*. **48**, 391-407.

2.9. ADDITIONAL MATERIAL

2.9.1. Multi-trait and multi-environment QTL analysis for shoot growth parameters in a RIL population of *Lotus japonicus* derived from a cross between ecotypes Gifu B-129 and Miyakojima MG-20

	Chr 1	Chr 2	Chr 3	Chr 4	Chr 5	Chr 6
	TM0222	TM0550	TM0246	TM0832	TM0186	TM0169
RGR _{shoot} (S-1)	-0.264	0.474	-0.473	-0.332	0.138	-0.216
RGR _{shoot} (S-10)	-0.264	0.475	-0.47	-0.331	0.138	-0.215
RGR _{shoot} (C-1)	-0.265	0.473	-0.473	-0.332	0.139	-0.216
RGR _{shoot} (C-10)	-0.266	0.475	-0.473	-0.331	0.138	-0.216
SDW (S-1)	4.571	4.804	-3.127	2.58	2.237	2.19
SDW (S-10)	5.16	3.78	-2.805	4.725	2.524	2.886
SDW (C-1)	7.036	5.034	-3.834	4.473	3.66	4.262
SDW (C-10)	6.693	7.431	-3.312	6.989	4.338	4.596

Traits: RGR_{shoot}: relative growth rate of shoot, SDW: and shoot dry weight in mg. Growth conditions: (S) indicates drought stress induced by the addition of 10% polyethylene glycol (PEG) and (C) indicates the control condition, the numbers 1 and 10 indicate 1 and 10 mM of nitrogen as nitrate respectively. As a convention, a positive effect is assigned if the superior allele comes from the *Lotus japonicus* Miyakojima MG-20 parent and a negative effect if the superior allele comes from the *L. j.* Gifu B-129 parent.

2.9.2. Multi-trait and multi-environment QTL analysis for root growth parameters in a RIL population of *Lotus japonicus* derived from a cross between ecotypes Gifu B-129 and Miyakojima MG-20

	Chr 1	Chr 2	Chr 3	Chr 4	Chr 5	Chr 6
	TM0805	TM1150	TM0246	TM0194	TM0428	TM0169
RGR _{root} (S-1)	0.0073	0.0035	-0.0112	-0.0832	-0.0686	-0.0632
RGR _{root} (S-10)	0.0083	0.0039	-0.0118	-0.0831	-0.0689	-0.0632
RGR _{root} (C-1)	0.0079	0.0047	-0.0122	-0.0831	-0.0689	-0.0621
RGR _{root} (C-10)	0.0068	0.0047	-0.0123	-0.085	-0.0686	-0.0616
RDW (S-1)	0.7665	0.679	-0.6303	0.8428	0.346	0.4084
RDW (S-10)	0.6002	0.1253	-0.3932	0.2536	0.3867	0.3617
RDW (C-1)	1.1127	0.7412	-0.5773	0.8362	0.4321	0.7781
RDW (C-10)	0.5935	0.5635	-0.2305	0.3273	0.2683	0.4369

Traits: RGR_{root}: relative growth rate of root, RDW: and root dry weight in mg. Growth conditions: (S) indicates drought stress induced by the addition of 10% polyethylene glycol (PEG) and (C) indicates the control condition, the numbers 1 and 10 indicate 1 and 10 mM of nitrogen as nitrate respectively. As a convention, a positive effect is assigned if the superior allele comes from the *Lotus japonicus* Miyakojima MG-20 parent and a negative effect if the superior allele comes from the *L. j.* Gifu B-129 parent.

2.9.3. Multi-trait and multi-environment QTL analysis for development parameters in a RIL population of *Lotus japonicus* derived from a cross between ecotypes Gifu B-129 and Miyakojima MG-20

	Chr1	Chr1	Chr2	Chr3	Chr3	Chr4	Chr5	Chr6
	TM0088	TM0295	TM1150	TM0996	TM0127	TM0664	TM0095	TM0139
LDR (S-1)	0.0356	0.0025	0.04	-0.0306	0.0337	-0.0061	0.035	0.0076
LDR (S-10)	0.0398	0.0043	0.0469	-0.0002	0.0256	-0.001	0.0409	0.0104
LDR (C-1)	0.0247	0.0181	0.0351	-0.009	0.0377	-0.0197	0.0337	0.0024
LDR (C-10)	0.0365	0.0139	0.0419	-0.0198	0.0425	-0.0062	0.0325	0.0026
RSR (S-1)	-0.2546	-0.0683	-0.2385	0.1222	-0.0243	0.0754	-0.0702	0.1591
RSR (S-10)	-0.274	-0.0505	-0.2352	0.0264	-0.0168	0.074	-0.0761	0.1232
RSR (C-1)	-0.2359	-0.004	-0.1533	0.0472	-0.0305	0.0763	-0.0689	0.151
RSR (C-10)	-0.2426	0.0042	-0.17	-0.0041	-0.0317	-0.0051	-0.0549	0.1918

Traits: LDR: leaf development rate expressed as number of leaves per day, RSR: and root/shoot ratio. Growth conditions: (S) indicates drought stress induced by the addition of 10% polyethylene glycol (PEG) and (C) indicates the control condition, the numbers 1 and 10 indicate 1 and 10 mM of nitrogen as nitrate respectively. As a convention, a positive effect is assigned if the superior allele comes from the *Lotus japonicus* Miyakojima MG-20 parent and a negative effect if the superior allele comes from the *L. j.* Gifu B-129 parent.

3. RESPUESTAS ASOCIADAS AL DÉFICIT HÍDRICO EN RILs CONTRASTANTES DE *Lotus japonicus* (Gifu x MG-20)^b

Franco Francisco¹, Monza Jorge¹, Quero Gastón¹, Borsani Omar¹

¹Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República.

Av. Garzón 780, 12900 Montevideo, Uruguay.

Correo electrónico: ffrancopiccioli@gmail.com

3.1. RESUMEN

Se seleccionaron RILs de *Lotus japonicus* (Gifu x MG-20) tolerantes (RIL43 y RIL77) y sensibles (RIL176 y RIL51) a déficit hídrico a partir de información genotípica y fenotípica. En este material se evaluaron respuestas bioquímicas y fisiológicas asociadas al déficit hídrico, que se impuso a partir de los 36 días desde la siembra. Las determinaciones se hicieron 2 y 6 días después de impuesto el déficit hídrico. Las RIL sensibles en condiciones de déficit hídrico tuvieron menor peso fresco y mayor temperatura foliar que sus controles sin estrés hídrico, probablemente asociado a un cierre estomático rápido y sostenido evaluado. La acumulación de prolina y el daño oxidativo indican que las RIL sensibles se mantuvieron estresadas durante el período evaluado. Las RILs tolerantes presentaron comportamientos diferentes. La RIL43 en condición de déficit hídrico tuvo menor diferencia en el peso fresco respecto a su control que la RIL77. La RIL43 presentó un cierre estomático inicial, que se revirtió en el tiempo final. Además, presentó un aumento del daño oxidativo a los dos días que disminuyó a los seis días, lo que interpretamos como la adaptación a la condición de estrés. La RIL77 presentó un comportamiento similar a las líneas sensibles respecto al peso fresco y daño oxidativo, pero mantuvo los estomas abiertos y acumuló prolina al tiempo inicial, que disminuyó en el tiempo final. La RIL43 y la RIL77 presentarían estrategias diferentes para adaptarse a eventos de sequía de distinta intensidad y duración. La región del cromosoma 5

^b Artículo a publicar en: Agrociencia Uruguay

asociada al marcador TM0186, identificado como QTL para tasa de crecimiento, se analizó mediante una aproximación *in silico*. El análisis de la región, permitió identificar cuatro genes relacionados con respuestas a estrés abiótico.

Palabras clave: déficit hídrico, RILs, *Lotus japonicus*

3.2. SUMMARY

Tolerant (RIL43 and RIL77) and sensitive (RIL176 and RIL51) to water deficit RILs of *Lotus japonicus* (Gifu x MG-20) were selected from genotypic and phenotypic information. In this material were evaluated biochemical and physiological responses associated to water deficit, which was imposed after 36 days of growth. The determinations were made 2 and 6 days after the drought imposed. Sensitive lines under water deficit had lower fresh weight and greater leaf temperature than their controls due to rapid stomatal closure and sustained. Proline accumulation and oxidative damage indicate that the plants were kept stressed during the evaluation period. Tolerant RILs showed different behaviors. The line RIL43 in water deficit condition had lower fresh weight reduction relative to control condition due to initial stomatal closure, which was reversed in the final time. This line also presented an initial increase of oxidative damage that then decreased, which can be interpreted as adaptation to the stress condition. The line RIL77 presented a similar behavior to sensitive lines respect to the fresh weight and oxidative damage, but remained open stomata and the proline accumulation to initial time, decreasing the latest in final time. The RIL43 and RIL77 could present two different strategies that would allow them to adapt to different drought intensity and duration. The *in silico* analysis of genomic region associated with TM0186 marker, allowed to identify four genes related to abiotic stress responses.

Keywords: water deficit, RILs, *Lotus japonicus*

3.3. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son fuente de proteínas en la dieta humana, en la alimentación del ganado (Graham y Vance, 2003) y para mejorar la fertilidad del suelo (Howieson y Ballard, 2004). El género *Lotus* es utilizado en el mejoramiento de pasturas en regiones con períodos de déficit hídrico, donde otras leguminosas forrajeras no tienen éxito (Dear et al., 2003). *Lotus corniculatus*, *L. tenuis*, *L. uliginosus* y *L. subbiflorus* son especies de importancia agronómica utilizadas como forrajeras en todo el mundo, con capacidad de crecer en suelos de baja fertilidad en ambientes desfavorables (Díaz et al., 2005). La sequía es el estrés abiótico que con más frecuencia afecta la productividad de los cultivos (Toker et al., 2007) y en el contexto mundial actual, se prevé un aumento significativo en la ocurrencia de sequía en muchas regiones agrícolas. Por esto es necesario mejorar la tolerancia de las leguminosas a esta condición de estrés (Reynolds y Ortiz, 2010).

Las plantas pueden superar el déficit hídrico a través de respuestas adaptativas como el escape, la evasión y la tolerancia (Turner, 1986). La plasticidad en el ciclo de vida de algunas plantas les permite escapar a períodos de sequía a través del adelanto de la floración. También pueden evadirla regulando la absorción y pérdida de agua a través de cambios en la arquitectura de la planta, reducción del crecimiento de hojas, cierre estomático y senescencia prematura (Tardieu y Simonneau, 1998).

El mantenimiento de una alta conductancia estomática permite el crecimiento en condición de déficit hídrico y es favorable cuando el estrés es leve o moderado, pero desfavorable cuando es severo y terminal. Las plantas cierran los estomas para minimizar la pérdida de agua, lo que conduce a una disminución de la tasa de crecimiento por reducción de la fotosíntesis. Algunas plantas tienen una estrategia diferente, mantienen el crecimiento vegetativo con elevada conductancia estomática, y arriesgan su sobrevivencia en estrés severo (Tardieu, 2012). De esta forma, el mejoramiento de cultivares para afrontar el cambio climático requiere conocer las estrategias de las plantas para afrontar la sequía (Harb et al., 2010).

La acumulación de solutos compatibles como aminoácidos, betaínas, azúcares y polioles es un mecanismo para evitar la pérdida de agua y mantener la actividad metabólica (Parida y Das, 2005). La prolina es uno de los compuestos que más se acumulan en las células vegetales en respuesta a diferentes estreses abióticos (Szabados y Saviouré, 2010), y en *L. corniculatus* es un buen indicador de sequía (Díaz, et al., 2005). Su acumulación se asocia a diferentes funciones, como mantener el equilibrio redox celular, amortiguar el pH, estabilizar estructuras subcelulares y ser una fuente de nitrógeno y carbono (Szabados y Saviouré, 2010, Verbruggen y Hermans, 2008).

Cuando la acumulación de solutos no es suficiente para evitar el déficit hídrico, se induce a nivel celular una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden generar daño oxidativo (Mittler, 2002). En condición de déficit hídrico, en hojas de plantas del género *Lotus* se ha evidenciado la acumulación de ROS, por lo que la defensa antioxidante debe ser considerada en la tolerancia a este tipo de estrés (Signorelli et al., 2013, Sainz et al., 2010). A su vez, los sistemas de defensa antioxidante se inducen y sobreexpresan en cultivares tolerantes al déficit hídrico y que dicha inducción se asocia a la aclimatación al mismo (Wang et al., 2012, Sánchez-Rodríguez et al., 2012).

L. japonicus, relacionada taxonómicamente con especies de *Lotus* de uso agronómico (Young et al., 2003), es utilizada como leguminosa modelo (Pajuelo y Stougaard, 2005). En este sentido, se están desarrollando un conjunto de recursos genéticos y herramientas para el mejoramiento de *Lotus* que incluyen la generación de poblaciones de RILs (*recombinant inbred lines*) interespecíficas e intraespecíficas (Sandal y Sato, 2014) que se utilizan para el mapeo de QTLs asociados a distintas condiciones ambientales (Quero et al., 2014, Striker et al., 2014, Tominaga et al., 2012). También Chen et al. (2013) y Yousfi et al. (2012) caracterizaron RILs con respuestas contrastantes seleccionadas en base a su fenotipo. Esta estrategia les permitió aportar al conocimiento de respuestas de sensibilidad/tolerancia al déficit hídrico. Por tanto, el mapeo de QTLs permite identificar marcadores que pueden ser

utilizados para la selección de genotipos por caracteres complejos. De esta forma, se pueden utilizar QTLs de efecto mayor para ser introgresados en otro germoplasma, así como también utilizar varios QTLs de efecto menor como base para la acumulación de efectos favorables en germoplasma de elite (Bernardo, 2008). Es posible entonces, seleccionar RILs con comportamientos contrastantes a partir de la información fenotípica y de la presencia/ausencia de los alelos favorables de los QTLs identificados (Agarwal et al., 2014).

Con el objetivo de identificar respuestas bioquímicas y fisiológicas que expliquen la tolerancia a sequía, evaluamos de RILs de *L. japonicus* contrastantes, seleccionadas en base a la información de QTLs asociados a déficit hídrico y a información fenotípica. Asimismo, en la región del cromosoma 5 en la que se identificó un QTL asociado al marcador TM0186 se analizó in silico la presencia de genes candidatos.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Material vegetal

Se usaron RILs, provenientes de la cruce intraespecífica de *Lotus japonicus* Gifu B-129 (Gifu) y *Lotus japonicus* Miyakojima MG-20 (MG-20), desarrolladas por M. Kawaguchi (National Institute for Basic Biology) en el Kazusa DNA Research Institute, Japón (www.legumebase.brc.miyazaki-u.ac.jp/index.jsp). A partir de la información de los QTLs identificados por Franco et al. (Cap. 2), se seleccionaron líneas tolerantes (RIL43 y RIL77) y sensibles (RIL176 y RIL51) al déficit hídrico.

3.4.2. Condiciones de crecimiento

Las semillas se escarificaron con papel lija fino, se esterilizaron según Batista et al. (2013) y se transfirieron a placas de Petri con agar-agua 0.8% (p/v) estéril. La germinación se realizó a temperatura ambiente y en oscuridad, hasta que el largo de radícula fue de 2-5 mm (1-2 días). Las semillas germinadas se sembraron en macetas con una mezcla de arena:vermiculita (1:1) y crecieron a 23-25 °C con 16 h

luz ($150 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y humedad relativa ambiente de 50%. Como solución de riego se usó medio Hornum (Handberg y Stougaard, 1992) modificado, con KNO_3 como única fuente de nitrógeno.

Las líneas seleccionadas como sensibles y tolerantes a sequía fueron evaluadas en un ensayo con un diseño completamente al azar con 3 repeticiones y en cada maceta (repetición) se sembraron cuatro plantas. A los 36 días de crecimiento se impuso la condición de déficit hídrico, que consistió en mantener el contenido volumétrico de agua del sustrato entre un 3 y 5% (Anexo 1). Los controles se mantuvieron a capacidad de campo a lo largo de todo el ensayo. Las plantas se cosecharon 2 y 6 días después de impuesto el déficit hídrico, considerados como tiempo inicial y final respectivamente.

3.4.3. Temperatura foliar

La temperatura foliar se determinó con una cámara termográfica (FLIR E50). Las imágenes obtenidas se analizaron con el software FLIR Tools (www.flir.com). Se tomaron registros térmicos de cada línea, en 5 hojas de cada repetición seleccionadas al azar, en condición control y en déficit hídrico en cada tiempo.

3.4.4. Cuantificación de prolina

La prolina se extrajo de 100 mg de hojas con etanol-cloroformo-agua, según lo descrito por Charest y Phan (1990) y se cuantificó de acuerdo a Borsani et al. (1999).

3.4.5. Determinación *in situ* de superóxido y peróxido de hidrógeno

La detección del radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) se realizó según Jabs et al. (1996). Se colectó una hoja de cada maceta, la tercera desde el ápice, y se infiltraron en una campana de vacío, en oscuridad durante 5 min, con 3 mL de buffer fosfato de potasio pH 7.8 10 mM, NaN_3 10 mM, nitro blue tetrazolium (NBT) 0.1% (p/v) y Tween 20, 0.05% (v/v). Las hojas se expusieron a un tubo luz (20 W) durante 30 min.

La detección de H₂O₂ se realizó según Thordal-Christensen et al. (1997). Se colectó una hoja de cada maceta, la tercera desde el ápice y se infiltraron en una campana de vacío, en oscuridad durante 5 min, con 3 mL de buffer fosfato de potasio pH 7.8 10 mM, NaN₃ 10 mM y 3,3'-diaminobencidina (DAB) 0.1% (p/v).

Las hojas tratadas con NBT o DAB se decoloraron con ácido tricloroacético 0.15% (p/v) en etanol:cloroformo 4:1 (v/v) a las 24 y 48h. Seguidamente se lavaron con etanol 50% (v/v) y se incubaron en glicerol en agua 70% (v/v) durante aproximadamente 1 h.

3.4.6. Peroxidación lipídica

La extracción se realizó de muestras de 100 mg de hoja, que se maceraron en frío, y se analizaron 3 réplicas de cada una. Los lípidos peroxidados se determinaron como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico por determinación de molonaldehído midiendo la absorbancia a 532 nm según Minotti y Aust, (1987). La concentración se determinó usando un coeficiente de extinción de 156 mM⁻¹·cm⁻¹ (Rusterucci et al. 1996).

3.4.7. Búsqueda de genes asociados a un QTL

La búsqueda de genes reportados para *L. japonicus* en la región del marcador molecular seleccionado se realizó en la base de datos Kazusa DNA Research Institute (www.kazusa.or.jp/lotus). Los genes candidatos se clasificaron en categorías funcionales mediante el software *Blast2GO* (Conesa et al., 2005) de acuerdo a la información de *L. japonicus Gene Ontology* (GO), obtenida de la plataforma Legume IP (plantgrn.noble.org/LegumeIP) (Li et al., 2012).

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Selección de RIL sensibles y tolerantes

A partir de 100 RILs utilizadas en la identificación de QTLs relacionados con la tolerancia al déficit hídrico (Cap. 2) se seleccionaron dos líneas tolerantes (RIL43 y

RIL77) y dos sensibles (RIL176 y RIL51). Para realizar esta selección primero se generó un ranking de la población de RILs según el número de alelos favorables de marcadores asociados a la tasa de crecimiento del tallo. Las líneas con mayor número de alelos favorables fueron consideradas tolerantes y las líneas con mayor número de alelos desfavorables fueron consideradas sensibles (Cuadro 1). Además, se consideró para la selección la magnitud del efecto de los alelos. Finalmente, se seleccionaron las cuatro líneas utilizando la información fenotípica.

Cuadro 1. Marcadores utilizados para la selección de RILs sensibles y tolerantes.

Marcador	Chr 1 TM0222	Chr 2 *TM0550	Chr 3 *TM0246	Chr 4 *TM0832	Chr 5 TM0186	Chr 6 TM0169
RIL176	B	A	B	A	B	B
RIL51	B	B	B	B	B	A
RIL43	B	B	A	A	A	A
RIL77	A	B	A	A	B	B

A: alelo aportado por el parental Gifu. B: alelo aportado por el parental MG-20.

Se indican los alelos favorables (blanco) y desfavorables (gris) para tasa de crecimiento relativo de tallo. Los * indican alelos con mayor efecto.

3.5.2. Producción de biomasa aérea

En el tiempo inicial (dos días después de impuesto el estrés) las líneas sensibles RIL176, RIL51 y la tolerante RIL77 presentaron menor peso fresco de la parte aérea que los respectivos controles, pero la línea tolerante RIL43 presentó el mismo peso fresco en ambas condiciones (Fig. 1A). La biomasa aérea en el tratamiento control fue la mayor para las líneas sensibles RIL176 y RIL51 y la línea RIL77 (tolerante), mientras que la biomasa aérea de la línea tolerante RIL43 fue menor y sin diferencia significativa de la RIL51.

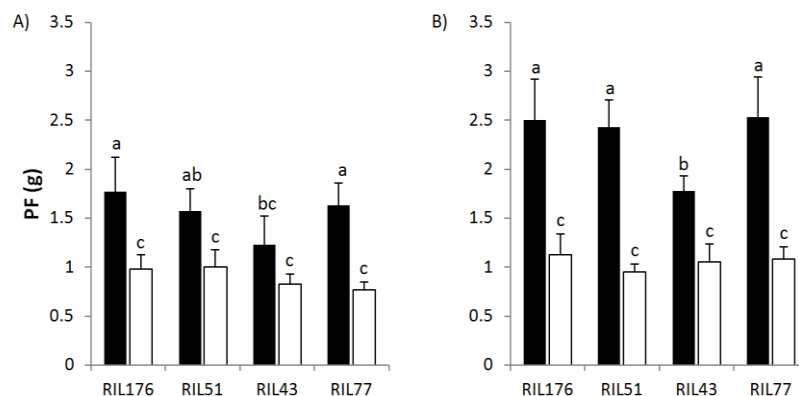


Figura 1. Peso fresco de la parte aérea. A. Tiempo inicial: 2 días después de impuesto el estrés. B. Tiempo final: 6 días después de impuesto el estrés. RIL176, RIL51 sensibles y RIL43, RIL77 tolerantes. Barras negras condición control y blancas déficit hídrico. La comparación de medias se realizó mediante contrastes, letras diferentes indican diferencias significativas ($p > 0.01$).

En el tiempo final todas las líneas en condición control tuvieron mayor peso fresco que las que estaban en condición de déficit hídrico. Si se compara la biomasa de los controles, en este tiempo la RIL43 presentó menor peso fresco que las demás líneas (Fig. 1B). Esta RIL presentó la menor tasa de reducción del peso fresco (41%). Las RIL176, RIL51 y RIL77 presentaron una reducción del peso fresco de 55, 61 y 57%, respectivamente.

3.5.3. Temperatura foliar

Las líneas sensibles RIL176, RIL51 y la línea tolerante RIL43 presentaron en el tiempo inicial mayor temperatura foliar en condición de déficit hídrico respecto a cada control. El aumento de la temperatura foliar en la línea tolerante RIL77 no fue significativo (Fig. 2A). En el tiempo final, sólo las líneas sensibles en condición de déficit hídrico mostraron mayor temperatura foliar respecto a sus controles (Fig. 2B).

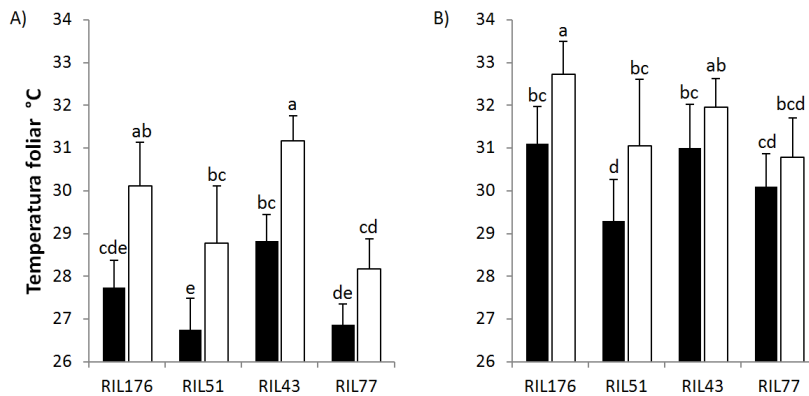


Figura 2. Temperatura foliar. A. Tiempo inicial: 2 días después de impuesto el estrés. B. Tiempo final: 6 días después de impuesto el estrés. RIL176, RIL51 sensibles y RIL43, RIL77 tolerantes. Barras negras corresponden a la condición control y blancas a la condición de déficit hídrico. La comparación de medias se realizó mediante contrastes, letras diferentes indican diferencias significativas ($p > 0.01$).

3.5.4. Acumulación de prolina durante el déficit hídrico

Las líneas sensibles RIL176, RIL51 y la línea tolerante RIL77 en el tiempo inicial en condición de estrés acumularon más prolina en hojas que sus respectivos controles, pero en la RIL43 no se incrementó la concentración de prolina (Fig. 3A). En el tiempo final, las líneas sensibles en condición de déficit hídrico acumularon más prolina que sus controles, mientras que en las líneas tolerantes no se incrementó su concentración (Fig. 3B).

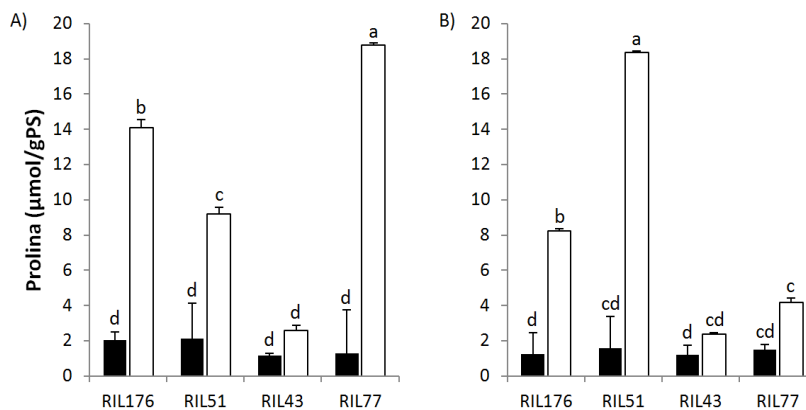


Figura 3. Concentración de prolina en hojas. A. Tiempo inicial: 2 días después de impuesto el estrés. B. Tiempo final: 6 días después de impuesto el estrés. RIL176, RIL51 sensibles y RIL43, RIL77 tolerantes. Barras negras condición control y blancas condición de déficit hídrico. La comparación de medias se realizó mediante contrastes, letras diferentes indican diferencias significativas ($p > 0.01$).

3.5.5. Detección de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y peroxidación lipídica

La acumulación de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en hojas se realizó mediante aproximaciones *in situ*. En el tiempo inicial el $O_2^{\cdot-}$ se incrementó en la condición de déficit hídrico en las RIL51 y RIL77, pero no en las RIL176 y RIL43 (Fig. 4A). En el tiempo final las RIL176, RIL51 y RIL77 acumularon más $O_2^{\cdot-}$ en condición de déficit hídrico, mientras que no hubo acumulación de $O_2^{\cdot-}$ la RIL43 (Fig. 4B).

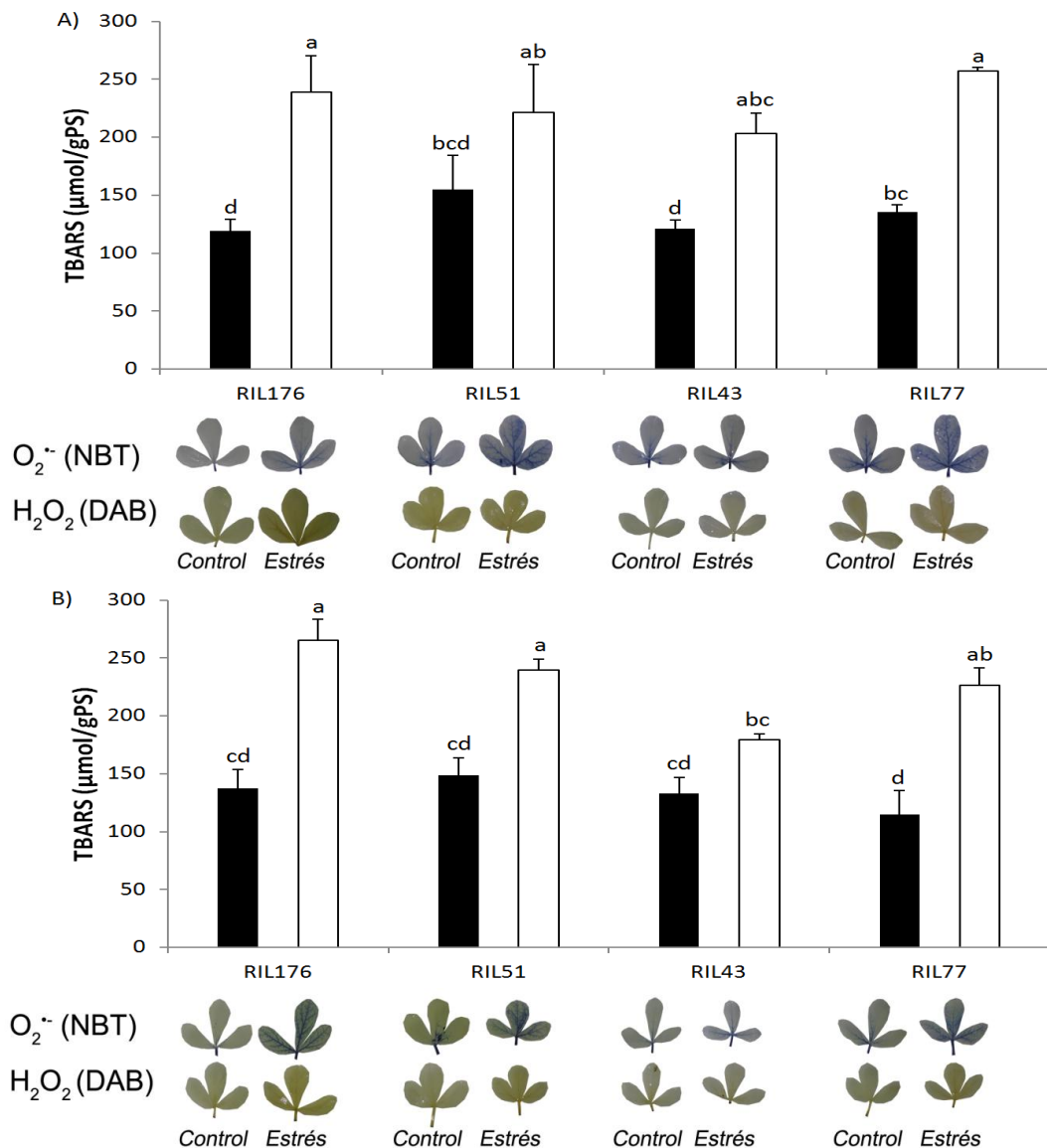


Figura 4. Daño oxidativo en hojas estimado a través de TBARS. A. Tiempo inicial: 2 días después de impuesto el estrés. B. Tiempo final: 6 días después de impuesto el estrés. RIL176, RIL51 sensibles y RIL43, RIL77 tolerantes. Barras negras condición control y blancas déficit hídrico. Las imágenes

muestran, para cada tiempo, la acumulación de $O_2^{\bullet-}$ y de H_2O_2 en folíolos evidenciadas mediante tinciones con NBT y DAB respectivamente. La comparación de medias se realizó mediante contrastes, letras diferentes indican diferencias significativas ($p > 0.01$).

En el tiempo inicial la acumulación de H_2O_2 fue evidente sólo en la RIL176 en condición de déficit hídrico (Fig. 4A). En el tiempo final, la RIL176, RIL51 y RIL77 acumularon H_2O_2 en condición de déficit hídrico, mientras que la RIL43 no acumuló (Fig. 4B).

Para estimar la peroxidación lipídica se determinó la concentración de TBARS. En el tiempo inicial en condición de estrés la concentración de TBARS se incrementó en la RIL176, RIL43 y RIL77 (Fig. 4A). Por otra parte, en el tiempo final y en condición de estrés, la concentración de TBARS en la RIL43 fue la misma que el control (Fig. 4B).

3.5.6. Genes asociados a un QTL de interés

La región del cromosoma 5 asociada al marcador TM0186, identificado como QTL para tasa de crecimiento relativo de tallo, se analizó mediante una aproximación *in silico*. En relación a la producción de biomasa, temperatura foliar, daño oxidativo y acumulación de prolina, la RIL43 presentó un comportamiento diferente a las otras líneas y fue la única en la que el alelo del marcador TM0186 lo aportó el parental Gifu (Cuadro 1). Esto hizo que resultara interesante la búsqueda de genes relacionados con la tolerancia al déficit hídrico en la región del marcador. La búsqueda se hizo en la base de datos de Kazusa DNA Research Institute y se encontraron 42 genes presentes en la región del contig definido por el marcador TM0186. Seguidamente se realizó una caracterización funcional de estos genes a partir de la información de *L. japonicus Gene Ontology* (GO). Este análisis permitió agruparlos en distintas categorías según los procesos biológicos a los que están relacionados (Fig. 5A).

Las categorías que agruparon mayor número de secuencias fueron *cellular process*, *single-organism process* y *metabolic process* seguidas por *response to*

stimulus, biological regulation, developmental process y cellular component organization or biogenesis.

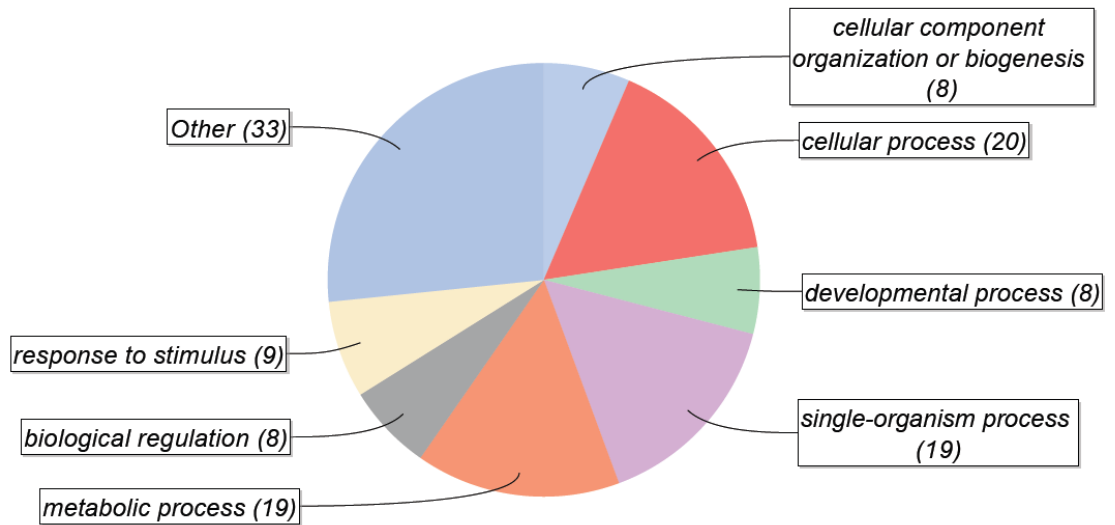


Figura 5. Categorización funcional de genes ubicados en la región del marcador TM0186, basada en la ontología de genes, según proceso biológico. Forma gráfica generada por el software *Blast2GO*.

Dentro de la categoría *response to stimulus*, que incluye a los genes asociados a respuestas a estrés, se encontraron 4 genes implicados en esa función (Cuadro 2).

Cuadro 2. Genes asociados a respuestas de estrés

<i>L. japonicus</i> ID	<i>A. thaliana</i> ID	% similitud	<i>A. thaliana</i> : anotaciones funcionales	
Lj5g3v1329790.1	AT3G04580.2	56.4	Receptor de etileno (EIN4)	(Ge et al., 2015, Liu y Wen, 2012)
Lj5g3v1341940.1	AT3G04530.1	55.4	Fosfoenol piruvato carboxilasa kinasa (PPCK2)	(Lehmann et al., 2009)
Lj5g3v1356090.2	AT1G32450.1	42.9	Transportador de nitrato (NRT1.5)	(Chen et al., 2012)
Lj5g3v1355050.1	AT1G03220.1	60.3	Aspartil-proteasa	(Jiang et al., 2007, Betti et al., 2012)

3.6. DISCUSIÓN

Para seleccionar las RILs tolerantes y sensibles a déficit hídrico se partió del resultado del análisis de QTLs realizado por Franco (Cáp. 2), en el que se utilizó como método de fenotipado para poblaciones de mapeo el sistema propuesto por Quero et al. (2013). El criterio de selección utilizado se basó en el número de alelos favorables de QTLs asociados a la TCRT, la magnitud de sus efectos (Cuadro 1) y la información fenotípica. La evaluación de las RILs seleccionadas se realizó en un ensayo macetero, para que las condiciones de crecimiento en déficit hídrico fueran similares a las que ocurren en el campo.

Una de las adaptaciones más frecuentes de las plantas para enfrentar el déficit hídrico es minimizar la pérdida de agua mediante cierre estomático (Nunes et al., 2008, Chaves et al., 2003), lo que genera disminución en la fijación de CO₂ y del crecimiento de la planta (Yousfi et al., 2010, Nunes et al., 2008). La RIL43 en condición de déficit hídrico a tiempo inicial se comportó como tolerante, dado que el peso fresco de la parte aérea fue igual al control a capacidad de campo. Sin embargo, la línea tolerante RIL77 al igual que las sensibles, presentó menor peso fresco que los respectivos controles (Fig. 1A). El peso fresco de la RIL43 a tiempo final fue menor que el del control, pero la diferencia fue inferior a la observada en la otra tolerante, RIL77, y en las sensibles RIL176 y RIL51 (Fig. 1B).

La temperatura foliar puede ser utilizada como criterio para comparar la respuesta al déficit hídrico entre genotipos, dada su alta correlación con la conductancia estomática (Zia et al., 2013). La RIL43 a tiempo inicial en condición de déficit hídrico presentó mayor temperatura foliar que el control, lo que indica un mayor cierre estomático. A tiempo final no se observaron diferencias entre ambos tratamientos, lo que indica que la RIL43 se adaptó a la condición de déficit hídrico a través de la regulación estomática. Yousfi et al. (2010) observaron que en condición de déficit hídrico hubo menor reducción del peso seco de la parte aérea en plantas de *Medicago* tolerantes respecto a las sensibles y que el cierre estomático habría

determinado la disminución de la asimilación de CO₂ y la menor producción de biomasa.

Adicionalmente, el déficit hídrico conduce a situaciones de estrés oxidativo, generado por la sobreproducción de ROS (Gill y Tuteja, 2010). La RIL43, que en condición de déficit hídrico en el tiempo inicial aumentó la temperatura foliar como consecuencia del cierre estomático (Fig. 2A), presentó daño oxidativo estimado a través de TBARS (Fig. 4A). Sin embargo en el tiempo final, al igual que la temperatura foliar, el contenido de TBARS fue igual al control (Fig. 2B y 4B). El hecho que en condición de déficit hídrico y a tiempo final la RIL43 tenga la misma temperatura foliar y concentración de TBARS que el control, evidencia la capacidad de esta línea de adaptarse a la condición de estrés. También la menor biomasa aérea a tiempo final en la condición control puede representar una ventaja adaptativa para esta RIL, porque reduciría la pérdida de agua por transpiración (Fig. 1B y 2B), pero tendría menor productividad. Esta estrategia es común en plantas de ambientes xerófilos que resisten al déficit hídrico, que presentan una tasa de crecimiento y biomasa relativamente bajas (Sinclair y Muchow, 2001). Esas plantas aumentan la absorción de agua y minimizan las pérdidas por transpiración a través de adaptaciones morfológicas como mayor relación raíz/tallo, menor número de hojas y área foliar, estomas más pequeños pero densamente distribuidos y mayor resistencia cuticular (Sinclair y Muchow, 2001).

La RIL43 también presentó un comportamiento particular en la acumulación de prolina, ya que en ninguno de los tiempos hubo diferencias con el control sin estresar (Fig. 4A y B). La acumulación de prolina es una respuesta temprana a déficit hídrico, común en especies del género *Lotus* (Díaz et al., 2010, Borsani et al., 1999). La RIL43 en condición de déficit hídrico tendría una cinética de pérdida de agua diferente a las otras, lo que explicaría que durante este período de estrés no se observe acumulación de prolina.

En contraste con la RIL43, las RIL176 y RIL51 consideradas sensibles a déficit hídrico, presentaron en los dos tiempos evaluados menor peso fresco, mayor

temperatura foliar y mayor acumulación de prolina respecto a sus controles (Fig. 1A y B; 2A y B y 3A y B). Esto indica que son líneas sensibles al déficit hídrico, dado que en condición de estrés tuvieron mayor temperatura foliar que el control como consecuencia de una baja conductancia estomática, lo que explica la menor producción de biomasa aérea. El hecho que la concentración de prolina en folíolos se mantenga, indica que la situación de estrés se establece tempranamente y permanece en el tiempo, al igual que el daño oxidativo observado en el tiempo final (Fig. 4B).

La RIL77, considerada tolerante, tuvo un comportamiento similar a las líneas sensibles en cuanto al peso fresco y daño oxidativo (Fig. 1A y B; 4A y B). Esta RIL mantuvo los estomas abiertos, dado que la temperatura foliar fue la misma que la del control y la acumulación de prolina fue mayor al inicio del estrés, con reducción en el tiempo final. El descenso de la concentración de prolina en condición de estrés sería consecuencia de la inhibición de su síntesis, del aumento de su oxidación, o de la traslocación a la raíz.

La acumulación de biomasa está intrínsecamente ligada a la transpiración, ya que la apertura de los estomas y el área foliar determinan las tasas de ambos procesos. Cuando la sequía es severa y de larga duración, los genotipos que reducen la transpiración y el crecimiento de las hojas se encuentran en ventaja, ya que ahorran agua en el suelo para las fases posteriores del ciclo de cultivo. Sin embargo, si el suelo vuelve a su condición original, disminuye la acumulación de biomasa durante las fases posteriores respecto a las plantas que no redujeron su transpiración durante el estrés (Tardieu, 2012).

En este sentido, la RIL43 parece presentar una respuesta estomática rápida que le permite mantener su estado hídrico. Esto puede representar una desventaja si ocurre un estrés de corta duración, porque podría limitar la asimilación de CO₂. La RIL77 presentaría una respuesta estomática menos eficiente en el control del agua, riesgosa en el caso de una sequía severa, pero representa una ventaja en el caso de un período de sequía corto. Además, esta estrategia de evasión favorece la

disminución de la temperatura foliar mediante la disipación de la energía incidente, y contribuye a evitar el estrés por calor (Tardieu, 2012).

La RIL43, que presentó un comportamiento distinto a las otras RILs, fue la única en la que el alelo del marcador TM0186 lo aportó el parental Gifu, con un efecto negativo sobre la tasa de crecimiento relativo de tallo (Cuadro 1). Sin embargo el crecimiento menor de esta RIL por la presencia del alelo Gifu le confiere ventajas para superar el déficit hídrico. Esto llevó a que se realizara la búsqueda de genes que pudieran estar relacionados con la tolerancia al déficit hídrico en la región del marcador, en el genoma de *L.j.* MG-20. La categorización funcional de los 42 genes ubicados en la región asociada al marcador TM0186 (Fig. 5A) mostró que algunos de ellos están relacionados a respuestas de estrés abiótico (Cuadro 2). Los genes Lj5g3v1329790.1, Lj5g3v1341940.1, Lj5g3v1356090.2 y Lj5g3v1355050.1 presentan homología con genes que en *A. thaliana* están relacionados con respuestas vinculadas al estrés abiótico (AT3G04580.2, AT3G04530.1, AT1G32450.1 y AT1G03220.1). El gen AT3G04580.2 codifica para un receptor de etileno (EIN4) y participa en la vía de señalización del cierre estomático dependiente de etileno (Ge et al., 2015, Liu y Wen, 2012). El gen AT3G04530.1 codifica para una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PPCK2) que se induce en respuesta al estrés oxidativo (Lehmann et al., 2009). El gen AT1G32450.1 codifica para un transportador (NRT1.5) de células xilemáticas involucrado en el transporte de nitrato desde las raíces a los tallos y está relacionado con mecanismos de tolerancia a la sequía y al estrés salino (Chen et al., 2012). El gen AT1G03220.1 codifica para una aspartil-proteasa, y ha sido relacionado a respuestas de estrés salino en *A. thaliana* (Jiang et al., 2007) y a sequía en *L. japonicus* (Betti et al., 2012).

A partir de la información generada en un ensayo hidropónico con 100 RILs Gifu x MG20 en el que se evaluaron parámetros de crecimiento (Franco et al., Cap. 2), se identificaron RILs contrastantes en su respuesta a déficit hídrico. Esas líneas, crecidas en un ensayo macetero y evaluadas en respuestas bioquímicas y fisiológicas implicadas en la superación del déficit hídrico permitieron identificar

diferentes estrategias para superar dicha condición. Esto confirma la utilidad del sistema propuesto por Quero et al. (2013) como un método efectivo para identificar QTLs a partir de parámetros fácilmente medibles.

Las RILs seleccionadas como tolerantes al parecer presentan estrategias diferentes para superar el déficit hídrico, por lo que serían un material de interés para estudiar la tolerancia a sequía y permitirían establecer si los genes presentes en la región del marcador TM0186 están relacionados con el comportamiento diferencial de las líneas.

Algunos marcadores moleculares basados en la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) desarrollados a partir de *L. japonicus* (Gifu x MG-20) se probaron en el genoma de *L. corniculatus*, *L. tenuis* y *L. uliginosus* y en muchos casos los productos se amplificaron correctamente. Por lo tanto, dado el grado de sintenia del genoma de *L. japonicus* con especies del género utilizadas en agricultura, hace potencialmente útiles a esos marcadores para ser incorporados en estrategias de mejoramiento de Lotus (Sato et al., 2008a).

3.7. AGRADECIMIENTOS

La investigación que da origen a los resultados presentados en la presente publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código POS_NAC_2013_1_11593. A Santiago Signorelli por su colaboración en la determinación de respuestas bioquímicas asociadas al déficit hídrico. A Manuel Diez por la colaboración en la construcción de la curva de retención del sustrato arena:vermiculita.

3.8. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal S, Tripura Venkata VGN, Kotla A, Mangrauthia S K, Neelamraju S. 2014. Expression patterns of QTL based and other candidate genes in Madhukar × Swarna RILs with contrasting levels of iron and zinc in unpolished rice grains. *Gene*, 546(2): 430–436.
- Batista L, Tomasco I, Lorite M J, Sanjuán J, Monza J. 2013. Diversity and phylogeny of rhizobial strains isolated from *Lotus uliginosus* grown in Uruguayan soils. *Applied Soil Ecology*, 66: 19–28.
- Bernardo R. 2008. Molecular markers and selection for complex traits in plants: Learning from the last 20 years. *Crop Science*, 48(5): 1649–1664.
- Betti M, Pérez-Delgado C, García-Calderón M, Díaz P, Monza J, Márquez A J. 2012. Cellular Stress Following Water Deprivation in the Model Legume *Lotus japonicus*. *Cells*, 1(4): 1089–106.
- 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(2): 269–273.
- Charest C, Phan C. 1990. Cold acclimation of wheat (*Triticum aestivum*): properties of enzymes involved in proline metabolism. *Physiologia Plantarum*, 80(2): 159–168.
- Chaves M, Maroco J P, Pereira J S. 2003. Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30(3): 239–264.
- Chen C-Z, Lv X-F, Li J-Y, Yi H-Y, Gong J-M. 2012. Arabidopsis NRT1.5 Is Another Essential Component in the Regulation of Nitrate Reallocation and Stress Tolerance. *Plant Physiology*, 159(4): 1582–1590.
- Chen J, Chang S X, Anyia A O. 2013. Physiological characterization of recombinant inbred lines of barley with contrasting levels of carbon isotope discrimination. *Plant and Soil*, 369(1-2): 335–349.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez J M, Terol J, Talón M, Robles M. 2005. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18): 3674–3676.

- Dear B S, Moore G A, Hughes S J. 2003. Adaptation and potential contribution of temperate perennial legumes to the southern Australian wheatbelt: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 43(1): 1–18.
- Díaz P, Betti M, Sánchez D H, Udvardi M K, Monza J, Márquez A J. 2010. Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress. *The New Phytologist*, 188(4): 1001–13.
- Díaz P, Borsani O, Márquez A, Monza J. 2005. Osmotically induced proline accumulation in *Lotus corniculatus* leaves is affected by light and nitrogen source. *Plant Growth Regulation*, 46(3): 223–232.
- Díaz P, Monza J, Márquez A. 2005. Drought and saline stress in *Lotus japonicus*. En: Márquez A J (Ed.). *Lotus japonicus handbook*. Dordrecht, Netherlands: Springer. 39-50.
- Ge X-M, Cai H-L, Lei X, Zhou X, Yue M, He J-M. 2015. Heterotrimeric G protein mediates ethylene-induced stomatal closure via hydrogen peroxide synthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 82(1): 138–150.
- Gill S S, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 909–930.
- Graham P H, Vance C P. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131(3): 872–877.
- Handberg K, Stougaard J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2(4): 487–496.
- Harb A, Krishnan A, Ambavaram M M R, Pereira A. 2010. Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimatation in plant growth. *Plant Physiology*, 154: 1254–1271.
- Howieson J, Ballard R. 2004. Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia - Some contemporary thoughts. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8): 1261–1273.
- Jabs T, Dietrich R A, Dangl J L. 1996. Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science*, 273: 1853–1856.

- Jiang Y, Yang B, Harris N S, Deyholos M K. 2007. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in Arabidopsis roots. *Journal of Experimental Botany*, 58(13): 3591–3607.
- Lehmann M, Schwarzländer M, Obata T, Sirikantaramas S, Burow M, Olsen C E, Laxa M. 2009. The metabolic response of Arabidopsis roots to oxidative stress is distinct from that of heterotrophic cells in culture and highlights a complex relationship between the levels of transcripts, metabolites, and flux. *Molecular Plant*, 2(3): 390–406.
- Li J, Dai X, Liu T, Zhao P X. 2012. LegumeIP: An integrative database for comparative genomics and transcriptomics of model legumes. *Nucleic Acids Research*, 40: 1–9.
- Liu Q, Wen C-K. 2012. Arabidopsis ETR1 and ERS1 Differentially Repress the Ethylene Response in Combination with Other Ethylene Receptor Genes. *Plant Physiology*, 158(3): 1193–1207.
- Minotti G, Aust S D. 1987. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 1098–1104.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9): 405–410.
- Nunes C, de Sousa Araújo S, da Silva J M, Feveireiro M P S, da Silva A B. 2008. Physiological responses of the legume model *Medicago truncatula* cv. Jemalong to water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, 63(1-3): 289–296.
- Pajuelo E, Stougaard J. 2005. Lotus japonicus as model system. En: Márquez A J (Ed.). *Lotus japonicus handbook*. Dordrecht, Netherlands: Springer. 3–24.
- Parida A K, Das A B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol Environ Saf*, 60(3): 324–349.
- Quero G E, Borsani O, Gutiérrez L, Melchiorre M, Monza J, Lascano R. 2013. Sistemas de fenotipado para la evaluación de las respuestas al estrés salino en Lotus. *Phenotyping Systems for Evaluating Saline Stress Response in Lotus*. *Agrociencia Uruguay*, 17(1): 11–21.
- Quero G E, Gutiérrez L, Lascano R. 2014. Identification of QTLs for shoot and root growth under ionic–osmotic stress in Lotus, using a RIL population. *Crop and Pasture Science*, 65(2): 139–149.

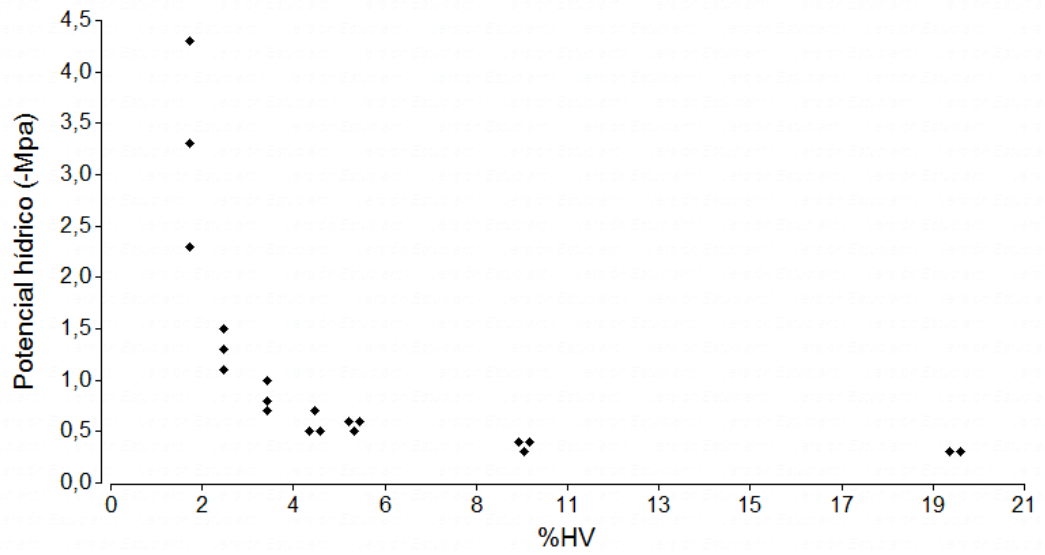
- Reynolds M P, Ortiz R. 2010. Adapting Crops to Climate Changes: a Summary. En: Reynolds M P (Eds). Climate change and crop production. Wallingford: CAB International. 1–8.
- Rusterucci C, Stallaert V, Milat M L, Pugin A, Ricci P, Blein J P. 1996. Relationship between Active Oxygen Species, Lipid Peroxidation, Necrosis, and Phytoalexin Production Induced by Elicitins in *Nicotiana*. *Plant Physiology*, 111: 885–891.
- Sainz M, Díaz P, Monza J, Borsani O. 2010. Heat stress results in loss of chloroplast Cu/Zn superoxide dismutase and increased damage to Photosystem II in combined drought-heat stressed *Lotus japonicus*. *Physiologia Plantarum*, 140(1): 46–56.
- Sánchez-Rodríguez E, Rubio-Wilhelmi M del M, Blasco B, Leyva R, Romero L, Ruiz J M. 2012. Antioxidant response resides in the shoot in reciprocal grafts of drought-tolerant and drought-sensitive cultivars in tomato under water stress. *Plant Science*, 188: 89–96.
- Sandal N, Sato S. 2014. Genetic Linkage Maps, Synteny and Map-based Cloning. En: Tabata S, Stougaard J (Eds.). *The Lotus japonicus Genome*. Berlin Heidelberg: Springer. 21-31
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Kato T, Nakao M, Sasamoto S, Watanabe A, Ono A, Kawashima K, Fujishiro T, Katoh M, Kohara M, Kishida Y, Minami C, Nakayama S, Nakazaki N, Shimizu Y, Shinpo S, Takahashi C, Wada T, Yamada M, Ohmido N, Hayashi M, Fukui K, Baba T, Nakamichi T, Mori H, Tabata S. 2008. Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research*, 15(4): 227–239.
- Signorelli S, Casaretto E, Sainz M, Díaz P, Monza J, Borsani O. 2013. Antioxidant and photosystem II responses contribute to explain the drought-heat contrasting tolerance of two forage legumes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70: 195–203.
- Sinclair T R, Muchow R C. 2001. System analysis of plant traits to increase grain yield on limited water supplies. *Agronomy Journal*, 93(2): 263–270.
- Striker G G, Casas C, Manzur M E, Ploschuk R A, Casal J J. 2014. Phenomic networks reveal largely independent root and shoot adjustment in waterlogged plants of *Lotus japonicus*. *Plant, Cell and Environment*, 37: 2278–2293.
- Szabados L, Savouré A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2): 89–97.

- Tardieu F. 2012. Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: Just design the right drought scenario. *Journal of Experimental Botany*, 63(1): 25–31.
- Tardieu F, Simonneau T. 1998. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany*, 49: 419–432.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge D B. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal*, 11: 1187–1194.
- Toker C, Canci H, Yildirim T. 2007. Evaluation of perennial wild Cicer species for drought resistance. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(8): 1781–1786.
- Tominaga A, Gondo T, Akashi R. 2012. Quantitative trait locus analysis of symbiotic nitrogen fixation activity in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research*, 125(3): 395–406.
- Turner N C. 1986. Crop water deficits: a decade of progress. *Advances in Agronomy in Agronomy*, 39: 1–51.
- Verbruggen N, Hermans C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35: 753–759.
- Wang S, Liang D, Li C, Hao Y, Ma F, Shu H. 2012. Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*, (51): 81–89.
- Young N D, Mudge J, Ellis T H N. 2003. Legume genomes: More than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(2): 199–204.
- Yousfi N, Slama I, Ghnaya T, Savouré A, Abdelly C. 2010. Effects of water deficit stress on growth, water relations and osmolyte accumulation in *Medicago truncatula* and *M. laciniata* populations. *Comptes Rendus - Biologies*, 333(3): 205–213.
- Yousfi S, Serret M D, Márquez A J, Voltas J, Araus J L. 2012. Combined use of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{15}\text{N}$ tracks nitrogen metabolism and genotypic adaptation of durum wheat to salinity and water deficit. *The New Phytologist*, 194(1): 230–44.

Zia S, Romano G, Spreer W, Sanchez C, Cairns J, Araus J L, Müller J. 2013. Infrared Thermal Imaging as a Rapid Tool for Identifying Water-Stress Tolerant Maize Genotypes of Different Phenology. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 199(2): 75–84.

3.9. ANEXOS

3.9.1. Curva de retención del sustrato arena:vermiculita (1:1)



4. DISCUSIÓN

El fenotipado de 100 RILs en un sistema de hidroponía bajo condiciones de déficit hídrico y dos condiciones de nitrógeno permitió identificar 20 QTLs asociados a parámetros de crecimiento y desarrollo. Seis se asociaron a parámetros de crecimiento de la parte aérea, seis a parámetros de crecimiento de la raíz y ocho a parámetros de desarrollo. Dos QTLs co-localizaron para parámetros de crecimiento de parte aérea y raíz mientras que un QTL lo hizo para parámetros de crecimiento de raíz y de desarrollo. Varios de los QTLs identificados en este trabajo fueron previamente asociados a parámetros de crecimiento y desarrollo, sin embargo algunos de ellos no han sido reportados hasta el momento. Los marcadores moleculares desarrollados a partir de *L. japonicus* (Gifu x MG-20) son potencialmente útiles para ser incorporados en estrategias de mejoramiento de Lotus dado que el genoma de *L. japonicus* presenta sintenia con *L. corniculatus*, *L. tenuis* y *L. uliginosus*

A partir de análisis *multi-trait multi-environment*, se cuantificaron los efectos de los QTLs en los ambientes evaluados, información de utilidad para decidir que regiones deberían ser priorizadas para incluir los alelos favorables de ambos parentales y maximizar la adaptación en un ambiente específico o rango de ambientes. En este sentido, a partir de la información de los efectos de los QTLs se seleccionaron RILs tolerantes y sensibles a déficit hídrico. La evaluación de dichas líneas se realizó en un ensayo macetero, para que las condiciones de crecimiento en déficit hídrico fueran más similares a las que ocurren en el campo. De esta forma se pasó de un sistema hidropónico de un sustrato sólido y de un déficit hídrico impuesto por el agregado de un agente osmótico a un déficit hídrico generado por reducción del suministro de agua. A partir de la evaluación de respuestas bioquímicas y fisiológicas implicadas en la superación del déficit hídrico, se observó que las RILs seleccionadas como tolerantes al parecer presentan estrategias diferentes para superar el déficit hídrico, por lo que serían un material de interés para estudiar la tolerancia a sequía. En un ensayo en macetas, la RIL43 que presentó

un comportamiento diferente a las otras RILs evaluadas en cuanto al efecto del estrés hídrico sobre la biomasa y en las respuestas bioquímicas y fisiológicas evaluadas. Esta respuesta diferencial se asocia con que fue la única RIL evaluada en la que el alelo del marcador TM0186 lo aportó el parental Gifu. Esto llevó a realizar un análisis *in silico* de la región asociada al marcador TM0186 que permitió identificar genes relacionados con respuestas al estrés que podrían estar involucrados con el comportamiento diferencial de las líneas.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo fueron identificados importantes regiones genómicas asociadas a crecimiento y desarrollo, la información de los marcadores puede ser incorporados en estrategias de mejoramiento. La información de los efectos de los QTLs contribuye al conocimiento de la tolerancia a la sequía en *L. japonicus* y es de utilidad para la selección de líneas contrastantes. El secuenciado del genoma de *L. japonicus* posibilita el mapeo fino y la identificación de genes responsables de los efectos de los QTLs.

A partir de la información generada en un ensayo hidropónico, en el que se evaluaron parámetros de crecimiento, se identificaron RILs contrastantes en su respuesta a déficit hídrico. Esas líneas, crecidas en un ensayo macetero y evaluadas en relación a respuestas bioquímicas y fisiológicas implicadas en la superación del déficit hídrico permitieron identificar diferentes estrategias para superar dicha condición. Lo anterior confirma la utilidad del sistema de hidroponía como un método efectivo para identificar QTLs a partir de parámetros fácilmente medibles. Por otra parte, a partir de los resultados del análisis *in silico* realizado, es posible profundizar en el estudio de los genes asociados al marcador TM0186.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7): 36–42.
- Agarwal S, Tripura Venkata VGN, Kotla A, Mangrauthia SK, Neelamraju S. 2014. Expression patterns of QTL based and other candidate genes in Madhukar × Swarna RILs with contrasting levels of iron and zinc in unpolished rice grains. *Gene*, 546(2): 430–436.
- Agbicodo EM, Fatokun CA, Muranaka S, Visser RGF, Linden van der CG. 2009. Breeding Drought Tolerant Cowpea: Constraints, Accomplishments, and Future Prospects. *Euphytica*, 167(3): 353–370.
- Airaki M, Sánchez-Moreno L, Leterrier M, Barroso JB, Palma JM, Corpas FJ. 2011. Detection and Quantification of S-nitrosoglutathione (GSNO) in Pepper (*Capsicum annuum* L.) plant organs by LC-ES/MS. *Plant and Cell Physiology*, 55(11): 2006–2015.
- Al-Ghamdi AA. 2009. Evaluation of Oxidative Stress Tolerance in Two Wheat (*Triticum aestivum*) Cultivars in Response to Drought. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11(1): 7–12.
- Alimi NA, Bink MCAM, Dieleman JA, Magán JJ, Wubs AM, Palloix A, van Eeuwijk FA. 2013. Multi-Trait and Multi-Environment QTL Analyses of Yield and a Set of Physiological Traits in Pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, 126: 2597–2625.
- Al-Sulaiti A, Blackwell RD, Lea PJ, Davies WJ. 1990. Capacity For Proline Accumulation During Water Deficit and Its Relation with the Growth of Barley Photorespiratory Mutants. *Journal of Experimental Botany*, 41: 4–14.
- Anhalt UCM, Heslop-Harrison JS, Piepho HP, Byrne S, Barth S. 2009. Quantitative Trait Loci Mapping For Biomass Yield Traits in a *Lolium* Inbred Line Derived F2 Population. *Euphytica*, 170(1): 99–107.
- Anithakumari AM, Nataraja KN, Visser RGF, van der Linden CG. 2012. Genetic dissection of drought tolerance and recovery potential by quantitative trait locus mapping of a diploid potato population. *Molecular Breeding*, 30(3): 1413–1429.
- Arambarri AM. 2000a. A Cladistic Analysis of the New World Species of Lotus L.(Fabaceae, Loteae). *Cladistics*, 16(3): 283–297.

- Arambarri AM. 2000b. A Cladistic Analysis of the Old World Species of Lotus L.(Fabaceae: Loteae). *Canadian Journal of Botany*, 78(3): 351–361.
- Asamizu E, Nakamura Y, Sato S, Tabata S. 2004. Characteristics of the Lotus Japonicus Gene Repertoire Deduced From Large-Scale Expressed Sequence Tag (EST) Analysis. *Plant Molecular Biology*, 54(3): 405–14.
- Ashraf M. 2010. Inducing Drought Tolerance in Plants: Recent Advances. *Biotechnology Advances*, 28(1): 169–183.
- Asíns MJ. 2002. Review Present and Future of Quantitative Trait Locus Analysis in Plant Breeding. *Plant Breeding*, 121: 281–291.
- Athar HR.; Ashraf M. 2009. Strategies for Crop Improvement Against Salinity and Drought Stress: An Overview. En: Ashraf M, Ozturk MÑ, Athar HR eds. *Salinity and Water Stress Improving Crop Efficiency*. Osnabrueck, Germany, Springer. 1-16.
- Bacelar EL, Moutinho-Pereira JM, Gonçalves BM, Brito CV., Gomes-Laranjo J, Ferreira HM, Correia CM. 2012. Water Use Strategies of Plants Under Drought Conditions. En: Aroca R (Ed.). *Plant Responses to Drought Stress: from morphological to molecular features*. Berlin. Springer. 145–170
- Bandurska H, Niedziela J, Chadzinikolau T. 2013. Separate and Combined Responses to Water Deficit and UV-B Radiation. *Plant Science*, 213: 98–105.
- Bañon S, Fernandez JA, Franco JA, Torrecillas A. 2004. Effects of Water Stress and Night Temperature Preconditioning On Water Relations and Morphological and Anatomical Changes of Lotus Creticus Plants. *Scientia Horticulturae*, 101: 333–342.
- Barnabás B, Jäger K, Fehér A. 2008. The Effect of Drought and Heat Stress On Reproductive Processes in Cereals. *Plant, Cell & Environment*, 31(1): 11–38.
- Barnett NM, Naylor AW. 1966. Amino Acid and Protein Metabolism in Bermuda Grass During Water Stress. *Plant Physiology*, 41(7): 1222–1230.
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Rodríguez-Serrano M, Esteban FJ, Fernández-Ocaña A, Chaki M, Romero-Puertas MC, Valderrama R, Sandalio LM, del Río LA. 2006. Localization of S-nitrosoglutathione and Expression of S-nitrosoglutathione Reductase in Pea Plants Under Cadmium Stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(8): 1785–1793.

- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67, 1-48.
- Batista L, Tomasco I, Lorite MJ, Sanjuán J, Monza J. 2013. Diversity and phylogeny of rhizobial strains isolated from *Lotus uliginosus* grown in Uruguayan soils. *Applied Soil Ecology*, 66: 19–28.
- Begara-Morales JC, Chaki M, Sánchez-Calvo B, Mata-Pérez C, Leterrier M, Palma JM, Barroso JB, Corpas FJ. 2013. Protein Tyrosine Nitration in Pea Roots During Development and Senescence. *Journal of Experimental Botany*, 64(4): 1121–1134.
- Bernardo R. 2010. *Breeding For Quantitative Traits in Plants*. Woodbury, Minnesota. Stemma Press. 1-380
- Bernardo R. 2008. Molecular Markers and Selection For Complex Traits in Plants: Learning From the Last 20 Years. *Crop Science*, 48(5): 1649–1664.
- Betti M, Pérez-Delgado C, García-Calderón M, Díaz P, Monza J, Márquez AJ. 2012. Cellular Stress Following Water Deprivation in the Model Legume *Lotus japonicus*. *Cells*, 1(4): 1089–106.
- Bhargava S, Sawant K. 2013. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*, 132(1): 21–32.
- Blum A. 2011. Drought resistance - is it really a complex trait? *Functional Plant Biology*, 38(10): 753–757.
- Blum A. 2005. Drought Resistance, Water-Use Efficiency, and Yield Potential - Are They Compatible, Dissonant, Or Mutually Exclusive?. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56(11): 1159–1168.
- Boer MP, Wright D, Feng L, Podlich DW, Luo L, Cooper M, Van Eeuwijk FA. 2007. A Mixed-Model Quantitative Trait Loci (QTL) Analysis For Multiple-Environment Trial Data Using Environmental Covariables For QTL-By-Environment Interactions, with An Example in Maize. *Genetics*, 177(3): 1801–1813.
- Bonnecarrère V. 2013. Análisis de mecanismos de tolerancia a frío en arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis Doctorado en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay. PEDECIBA. 103p.
- Borsani O, Casaretto E, Diaz P, Marquez A, Rebuffo M, Monza J. 2008. Búsqueda de marcadores fisiológicos asociados con tolerancia-sensibilidad a déficit hídrico en leguminosas. En: Taller de Divulgacion del Proyecto LESIS; Leguminosas

para Sistemas Sustentables (1o., 2008, Montevideo). Resúmenes. Montevideo, FONTAGRO. 5 p

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(2): 269–273.

Botella M, Rosado A, Ray AB, Paul MH. 2005. Plant Adaptive Responses to Salinity Stress. En: Matthew AJ, Paul MH. (Eds.). *Plant Abiotic Stress*. Indiana, USA: Chichester: Backwell Publishing. 37–70.

Bouteillé M, Rolland G, Balsera C, Loudet O, Muller B. 2012. Disentangling the intertwined genetic bases of root and shoot growth in Arabidopsis. *PLoS One*, 7(2): e32319.

Boyer J. 1982. Plant Productivity and Environment. *Science*, 218(4571): 443–448.

Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E. 2000. Responses to Abiotic Stresses. En: Gruissem W, Buchanan B, y Jones R. (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD. American Society of Plant Physiologists. 1158–1249

Broman KW, Sen S. 2009. *A Guide to QTL Mapping with R/qtl*. New York. Springer. 1-177

Broman KW. 2005. The Genomes of Recombinant Inbred Lines. *Genetics*, 169(2): 1133–46.

Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19: 889–890.

Bruce WB, Edmeades GO, Barker TC. 2002. Molecular and Physiological Approaches to Maize Improvement For Drought Tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366): 13–25.

Cao H-X, Zhang Z-B, Xu P, Chu L-Y, Shao H-B, Lu Z-H, Liu J-H. 2007. Mutual physiological genetic mechanism of plant high water use efficiency and nutrition use efficiency. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 57(1): 1–7.

Carter EB, Theodorou MK, Morris P. 1997. Responses of Lotus corniculatus to Environmental Change. *New Phytologist*, 136(2): 245–253.

Chaki M, Carreras A, López-Jaramillo J, Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Valderrama R, Corpas FJ, Barroso JB. 2013. Tyrosine Nitration Provokes

- Inhibition of Sunflower Carbonic Anhydrase (β -CA) Activity Under High Temperature Stress. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 29: 30–33.
- Charest C, Phan C. 1990. Cold acclimation of wheat (*Triticum aestivum*): properties of enzymes involved in proline metabolism. *Physiologia Plantarum*, 80(2): 159–168.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. 2009. Photosynthesis Under Drought and Salt Stress: Regulation Mechanisms From Whole Plant to Cell. *Annals of Botany*, 103(4): 551–560.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003. Understanding Plant Responses to Drought—From Genes to the Whole Plant. *Functional Plant Biology*, 30(3): 239–264.
- Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osório ML, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C. 2002. How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and growth. *Annals of Botany*, 89(7): 907–916.
- Chen C-Z, Lv X-F, Li J-Y, Yi H-Y, Gong J-M. 2012. Arabidopsis NRT1.5 Is Another Essential Component in the Regulation of Nitrate Reallocation and Stress Tolerance. *Plant Physiology*, 159(4): 1582–1590.
- Chen C, Dickman MB. 2005. Proline Suppresses Apoptosis in the Fungal Pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9): 3459–3464.
- Chen J, Chang SX, Anyia AO. 2013. Physiological characterization of recombinant inbred lines of barley with contrasting levels of carbon isotope discrimination. *Plant and Soil*, 369(1-2): 335–349.
- Choudhary NL, Sairam RK, Tyagi A. 2005. Expression of Delta1-pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Gene During Drought in Rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 42: 366–370.
- Cogan NOI, Abberton MT, Smith KF, Kearney G, Marshall AH, Williams A, Michaelson-Yeates TPT, Bowen C, Jones ES, Vecchies AC, Forster JW. 2006. Individual and multi-environment combined analyses identify QTLs for morphogenetic and reproductive development traits in white clover (*Trifolium repens* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 112(8): 1401–1415.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK. 2005. An Introduction to Markers, Quantitative Trait Loci (QTL) Mapping and Marker-Assisted Selection For Crop Improvement: The Basic Concepts. *Euphytica*, 142(1-2): 169–196.

- Collins NC, Tardieu F, Tuberosa R. 2008. Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand?. *Plant Physiology*, 147(2): 469–486.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. 2005. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18): 3674–3676.
- Corpas FJ, Barroso JB. 2013. Nitro-Oxidative Stress Vs Oxidative Or Nitrosative Stress in Higher Plants. *New Phytologist*, 1999(3): 633–635.
- DaCosta M, Huang B. 2006. Deficit Irrigation Effects On Water Use Characteristics of Bentgrass Species. *Crop Science*, 46(4): 1779–1786.
- Dat J, Vandenameele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. 2000. Dual Action of the Active Oxygen Species During Plant Stress Responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(5): 779–795.
- De Souza JG, Da Silv JV. 1987. Partitioning of Carbohydrates in Annual and Perennial Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 38(7): 1211–1218.
- Dear BS, Moore GA, Hughes SJ. 2003. Adaptation and potential contribution of temperate perennial legumes to the southern Australian wheatbelt: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 43(1): 1–18.
- Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ. 2001. Regulation of the Arabidopsis Transcriptome By Oxidative Stress. *Plant Physiology*, 127(1): 159–172.
- Díaz P, Betti M, Sánchez DH, Udvardi MK, Monza J, Márquez AJ. 2010. Deficiency in Plastidic Glutamine Synthetase Alters Proline Metabolism and Transcriptomic Response in Lotus Japonicus Under Drought Stress. *The New Phytologist*, 188(4): 1001–13.
- Díaz P, Borsani O, Márquez A, Monza J. 2005. Osmotically Induced Proline Accumulation in Lotus corniculatus Leaves Is Affected By Light and Nitrogen Source. *Plant Growth Regulation*, 46(3): 223–232.
- Díaz P, Monza J, Márquez A. 2005. Drought and Saline Stress in Lotus japonicus. En: Márquez AJ (Ed.). Dordrecht, the Netherlands. *Lotus japonicus Handbook*. Springer. 39–50.

- Doerge RW. 2002. Mapping and Analysis of Quantitative Trait Loci in Experimental Populations. *Nature Reviews Genetics*, 3(1): 43–52.
- Doyle JJ, Luckow MA. 2003. The Rest of the Iceberg. Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context. *Plant Physiology*, 131: 900–910.
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. 2009. Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29(1): 185–212.
- Farquhar G, Richards R. 1984. Isotopic Composition of Plant Carbon Correlates with Water-Use Efficiency of Wheat Genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology*, 11(6) 539–552
- Ferrés F. 2008. Marcadores bioquímicos y fisiológicos de respuesta a estrés hídrico en *Lotus uliginosus*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 39 p.
- Fleury D, Jefferies S, Kuchel H, Langridge P. 2010. Genetic and Genomic Tools to Improve Drought Tolerance in Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 61(12): 3211–22.
- Ge X-M, Cai H-L, Lei X, Zhou X, Yue M, He J-M. 2015. Heterotrimeric G protein mediates ethylene-induced stomatal closure via hydrogen peroxide synthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 82(1): 138–150.
- Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 909–930.
- Gogile A, Andargie M, Muthuswamy M. 2013. Screening Selected Genotypes of Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] for Salt Tolerance During Seedling Growth Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16(14): 671–679.
- Gondo T, Sato S, Okumura K, Tabata S, Akashi R, Isobe S. 2007. Quantitative Trait Locus Analysis of Multiple Agronomic Traits in the Model Legume *Lotus Japonicus*. *Genome*, 637(50): 627–637.
- Graham PH, Vance CP. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131(3): 872–877.
- Guo S, Zhou Y, Li Y, Gao Y, Shen Q. 2008. Effects of different Nitrogen forms and osmotic stress on water use efficiency of rice (*Oryza sativa*). *Annals of Applied Biology*, 153(1): 127–134.

- Hageman JA, Malosetti M, van Eeuwijk FA. 2012. Two-Mode Clustering of Genotype By Trait and Genotype By Environment Data. *Euphytica*, 183(3): 349–359.
- Handberg K, Stougaard J. 1992. *Lotus japonicus*, An Autogamous, Diploid Legume Species For Classical and Molecular Genetics. *The Plant Journal*, 2(4): 487–496.
- Harb A, Krishnan A, Ambavaram MMR, Pereira A. 2010. Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimatation in plant growth. *Plant Physiology*, 154: 1254–1271.
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J. 1998. Dissecting the Roles of Osmolyte Accumulation During Stress. *Plant, Cell and Environment*, 21(6), 535–553.
- Hartl D, Jones E. 2001. *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA. 204–205
- Hartley DP, Kolaja KL, Reichard J, Petersen DR. 1999. 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde Hepatic Protein Adducts in Rats Treated with Carbon Tetrachloride: Immunochemical Detection and Lobular Localization. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 161(1): 23–33.
- Hayashi M, Miyahara A, Sato S, Kato T, Yoshikawa M, Taketa M, Pedrosa A, Onda R, Imaizumi-Anraku H, Bachmair A, Sandal N, Stougaard J, Murooka Y, Tabata S, Kawasaki S, Kawaguchi M, Harada K. 2001. Construction of a Genetic Linkage Map of the Model Legume *Lotus japonicus* Using An Intraspecific F2 Population. *DNA Research*, 8: 301–310.
- Hodges DM, Andrews CJ, Johnson DA, Hamilton RI. 1996. Antioxidant Compound Responses to Chilling Stress in Differentially Sensitive Inbred Maize Lines. *Physiologia Plantarum*, 98(4): 685–692.
- Howieson J, Ballard R. 2004. Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia - Some contemporary thoughts. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8): 1261–1273.
- Huang C, Wei G, Jie Y, Wang L, Zhou H, Ran C, Huang Z, Jia H, Anjum SA. 2014. Effects of Concentrations of Sodium Chloride On Photosynthesis, Antioxidative Enzymes, Growth and Fiber Yield of Hybrid Ramie. *Plant Physiology and Biochemistry*, 76: 86–93.
- Ingram J, Bartels D. 1996. The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47(1): 377–403.

- Jabs T, Dietrich RA, Dangl JL. 1996. Initiation of runaway cell death in an Arabidopsis mutant by extracellular superoxide. *Science*, 273: 1853–1856.
- James RA, Von Caemmerer S, Condon AG, Zwart AB, Munns R. 2008. Genetic Variation in Tolerance to the Osmotic Stress Component of Salinity Stress in Durum Wheat. *Functional Plant Biology*, 35(2): 111–123.
- Jiang CJ, Zeng ZB. 1995. Multiple Trait Analysis of Genetic Mapping For Quantitative Trait Loci. *Genetics*, 140(3): 1111–27.
- Jiang Y, Yang B, Harris NS, Deyholos MK. 2007. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in Arabidopsis roots. *Journal of Experimental Botany*, 58(13): 3591–3607.
- Jones HG, Serraj R, Loveys B R, Xiong L, Wheaton A, Price AH. 2009. Thermal Infrared Imaging of Crop Canopies For the Remote Diagnosis and Quantification of Plant Responses to Water Stress in the Field. *Functional Plant Biology*, 36(11): 978–989.
- Jones HG. 2004. Irrigation Scheduling: Advantages and Pitfalls of Plant-Based Methods. *Journal of Experimental Botany*, 55(407): 2427–2436.
- Jones HG. 1987. Breeding For Stomatal Characters. En: *Stomatal Function*. Zeiger E, Farquhar GD y Cowan IR. (Eds.). Stanford, CT, USA. Stanford University Press. 431–443.
- Jones N, Ougham H, Thomas H. 1997. Markers and Mapping: We Are All Geneticists Now. *New Phytologist*, 137(1), 165-177.
- Jongrunklang N, Toomsan B, Vorasoot N, Jogloy S, Boote, KJ, Hoogenboom, G., Patanothai A. 2011. Rooting Traits of Peanut Genotypes with Different Yield Responses to Pre-Flowering Drought Stress. *Field Crops Research*, 120(2): 262–270.
- Kawaguchi M, Motomura T, Imaizumi-Anraku H, Akao S, Kawasaki S. 2001. Providing the Basis For Genomics in Lotus Japonicus: The Accessions Miyakojima and Gifu Are Appropriate Crossing Partners For Genetic Analyses. *Molecular Genetics and Genomics*, 266: 157–166.
- Khan HR, Paull JG, Siddique KH M, Stoddard FL. 2010. Faba Bean Breeding For Drought-Affected Environments: a Physiological and Agronomic Perspective. *Field Crops Research*, 115(3): 279–286.

- Klasen JR, Piepho H-P, Stich B. 2012. QTL Detection Power of Multi-Parental RIL Populations in *Arabidopsis thaliana*. *Heredity*, 108(6), 626-632.
- Klein MA, Grusak MA. 2009. Identification of nutrient and physical seed trait QTL in the model legume *Lotus japonicus*. *Genome*, 52(8): 677–691.
- Korte A, Vilhjálmsson BJ, Segura V, Platt A, Long Q, Nordborg M. 2012. A Mixed-Model Approach For Genome-Wide Association Studies of Correlated Traits in Structured Populations. *Nature Genetics*, 44(9): 1066–1071.
- Krishnan N, Dickman MB, Becker DF. 2008. Proline Modulates the Intracellular Redox Environment and Protects Mammalian Cells Against Oxidative Stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(4): 671–681.
- Kuchuk N, Komarnitski I, Shakhovsky A, Gleba Y. 1990. Genetic-Transformation of *Medicago* Species By *Agrobacterium-Tumefaciens* and Electroporation of Protoplasts. *Plant Cell Reports*, 8: 660–663.
- Lehmann M, Schwarzländer M, Obata T, Sirikantaramas S, Burow M, Olsen CE, Tohge T, Fricker MD, Møller BL, Fernie AR, Sweetlove LJ, Laxa M. 2009. The metabolic response of *Arabidopsis* roots to oxidative stress is distinct from that of heterotrophic cells in culture and highlights a complex relationship between the levels of transcripts, metabolites, and flux. *Molecular Plant*, 2(3): 390–406.
- León J, Castillo MC, Coego A, Lozano-Juste J, Mir R. 2014. Diverse Functional Interactions Between Nitric Oxide and Abscisic Acid in Plant Development and Responses to Stress. *Journal of Experimental Botany*, 65(4), 907-921.
- Leport L, Turner N C, Davies SL, Siddique KHM. 2006. Variation in Pod Production and Abortion Among Chickpea Cultivars Under Terminal Drought. *European Journal of Agronomy*, 24(3): 236–246.
- Li J, Dai X, Liu T, Zhao PX. 2012. LegumeIP: An integrative database for comparative genomics and transcriptomics of model legumes. *Nucleic Acids Research*, 40: 1–9.
- Li J, Ji L. 2005. Adjusting multiple testing in multilocus analyses using the eigenvalues of a correlation matrix. *Heredity*, 95(3): 221–227.
- Liu Q, Wen C-K. 2012. *Arabidopsis* ETR1 and ERS1 Differentially Repress the Ethylene Response in Combination with Other Ethylene Receptor Genes. *Plant Physiology*, 158(3): 1193–1207.

- Lobell D, Schlenker W, Costa-Roberts J. 2011. Climate Trends and Global Crop Production Since 1980. *Science*, 333(6042): 616–620.
- Ludlow MM. 1989. Strategies of Response to Water Stress. En: Kreeb KH, Richter H y Hinckley TM (Eds.). *Structural and functional responses to environmental stresses*. The Hague. SPB Academic. 269–281.
- Mackay TFC, Stone EA, Ayroles JF. 2009. The Genetics of Quantitative Traits: Challenges and Prospects. *Nature Reviews. Genetics*, 10(8): 565–77.
- Mackay TFC. 2001. The Genetic Architecture of Quantitative Traits. *Annual Review of Genetics*, 35: 303–339.
- Malosetti M, Ribaut JM, van Eeuwijk FA. 2013. The Statistical Analysis of Multi-Environment Data: Modeling Genotype-By-Environment Interaction and Its Genetic Basis. *Frontiers in Physiology*, 4:1-17.
- Malosetti M, Ribaut JM, Vargas M, Crossa J, van Eeuwijk FA. 2008. A Multi-Trait Multi-Environment QTL Mixed Model with An Application to Drought and Nitrogen Stress Trials in Maize (*Zea mays* L.). *Euphytica*, 161(1-2): 241–257.
- Malosetti M, Voltas J, Romagosa I, Ullrich SE, Eeuwijk FA Van. 2004. Mixed Models Including Environmental Covariables For Studying QTL. *Euphytica*, 137: 139–145.
- Margarido GRA, Souza AP, Garcia AAF. 2007. OneMap: Software For Genetic Mapping in Outcrossing Species. *Hereditas*, 144(3): 78–79.
- Mathews KL, Malosetti M, Chapman S, McIntyre L, Reynolds M, Shorter R, van Eeuwijk F. 2008. Multi-environment QTL mixed models for drought stress adaptation in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*., 117(7): 1077–1091.
- Mattioli R, Costantino P, Trovato M. 2009. Proline Accumulation in Plants: Not Only Stress. *Plant Signaling & Behavior*, 4(11): 1016–1018.
- Melchiorre M, Quero GE, Parola R, Racca R, Trippi VS, Lascano R. 2009. Physiological Characterization of Four Model Lotus Diploid Genotypes: *L. japonicus* (MG20 and Gifu), *L. filicaulis*, and *L. burttii* Under Salt Stress. *Plant Science*, 177(6): 618–628.
- Merlot S, Mustilli A-C, Genty B, North H, Lefebvre V, Sotta B, Vavasseur A, Giraudat J. 2002. Use of Infrared Thermal Imaging to Isolate Arabidopsis Mutants Defective in Stomatal Regulation. *The Plant Journal*, 30(5): 601–9.

- Miflin B. 2000. Crop improvement in the 21st century. *Journal of Experimental Botany*, 51(342): 1–8.
- Miller G, Shulaev V, Mittler R. 2008. Reactive Oxygen Signaling and Abiotic Stress. *Physiologia Plantarum*, 133(3): 481–489.
- Milne I, Shaw P, Stephen G, Bayer M, Cardle L, Thomas WTB, Flavell AJ, Marshall D. 2010. Flapjack--graphical genotype visualization. *Bioinformatics*, 26(24): 3133–3134.
- Minotti G, Aust SD. 1987. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 1098–1104.
- Mir RR, Zaman-Allah M, Sreenivasulu N, Trethowan R, Varshney RK. 2012. Integrated Genomics, Physiology and Breeding Approaches For Improving Drought Tolerance in Crops. *Theoretical and Applied Genetics.*, 125(4): 625–645.
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F. 2011. ROS signaling: The new wave?. *Trends in Plant Science*, 16(6): 300–309.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9): 405–410.
- Molassiotis A, Tanou G, Diamantidis G. 2010. NO Says More Than “YES” to Salt Tolerance: Salt Priming and Systemic Nitric Oxide Signaling in Plants. *Plant Signaling & Behavior*, 5(3): 209–212.
- Munns R, James RA, Sirault XRR, Furbank RT, Jones HG. 2010. New Phenotyping Methods For Screening Wheat and Barley For Beneficial Responses to Water Deficit. *Journal of Experimental Botany*, 61(13): 3499–3507.
- Munns R. 2002. Comparative Physiology of Salt and Water Stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2): 239–250.
- Nelson MN, Moolhuijzen PM, Boersma JG, Chudy M, Wolko B, Lesniewska K, Bellgard M, Oliver RP, Swiecicki W, Cowling WA, Ellwood, S. R. Ellwood SR. 2010. Aligning a New Reference Genetic Map of *Lupinus angustifolius* with the Genome Sequence of the Model Legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research*, 17: 73–83.

- Nunes C, de Sousa Araújo S, da Silva JM, Feveireiro MPS, da Silva AB. 2008. Physiological Responses of the Legume Model *Medicago truncatula* Cv. Jemalong to Water Deficit. *Environmental and Experimental Botany*, 63(1-3): 289–296.
- Ohmido N, Ishimaru A, Kato S, Sato S, Tabata S, Fukui K. 2010. Integration of cytogenetic and genetic linkage maps of *Lotus japonicus*, a model plant for legumes. *Chromosome Research*, 18: 287-299
- O’Leary MH. 1981. Carbon Isotope Fractionation in Plants. *Phytochemistry*, 20(4): 553-567.
- Pajuelo E, Stougaard J. 2005. *Lotus japonicus* as model system. En: Márquez AJ (Ed.). *Lotus japonicus handbook*. Dordrecht, Netherlands: Springer. 3–24.
- Parida AK, Das AB. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol Environ Saf*, 60(3): 324–349.
- Paterson AH, 1996. Making Genetic Maps. En: Paterson AH. (Ed.). *Genome Mapping in Plants*. R. G. Landes Company, San Diego, California. Academic Press, Austin, Texas. 23–39.
- Piro G, Leucci MR, Waldron K, Dalessandro G. 2003. Exposure to Water Stress Causes Changes in the Biosynthesis of Cell Wall Polysaccharides in Roots of Wheat Cultivars Varying in Drought Tolerance. *Plant Science*, 165(3): 559–569.
- Quero G, Gutiérrez L, Lascano R. 2014. Identification of QTLs For Shoot and Root Growth Under Ionic–Osmotic Stress in *Lotus*, Using a RIL Population. *Crop and Pasture Science*, 65(2): 139–149.
- Quero G, Borsani O, Gutiérrez L, Melchiorre M, Monza J, Lascano R. 2013. Sistemas De Fenotipado Para La Evaluación De Las Respuestas Al Estrés Salino En *Lotus*. *Phenotyping Systems For Evaluating Saline Stress Response in Lotus*. *Agrociencia Uruguay*, 17(1): 11–21.
- Quero G. 2011. Identificación de QTLs de respuestas a estrés salino y osmótico en una población de mapeo *Lotus japonicus* x *L. burttii*. Tesis Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 82p.
- R Core Team, 2014: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

- Reynolds MP, Ortiz R. 2010. Adapting Crops to Climate Changes: a Summary. En: Reynolds MP. (Ed.). Climate change and crop production. Wallingford. CAB International. 1–8.
- Reynolds-Henne CE, Langenegger A, Mani J, Schenk N, Zumsteg A, Feller U. 2010. Interactions Between Temperature, Drought and Stomatal Opening in Legumes. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1): 37–43.
- Roitsch T. 1999. Source-Sink Regulation By Sugar and Stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(3): 198–206.
- Rusterucci C, Stallaert V, Milat ML, Pugin A, Ricci P, Blein JP. 1996. Relationship between Active Oxygen Species, Lipid Peroxidation, Necrosis, and Phytoalexin Production Induced by Elicitins in *Nicotiana*. *Plant Physiology*, 111: 885–891.
- Sade B, Soylu S, Yetim E. 2011. Drought and Oxidative Stress. *African Journal of Biotechnology*, 10(54): 11102–11109.
- Sade N, Gebremedhin A, Moshelion M. 2012. Risk-Taking Plants: Anisohydric Behavior as a Stress-Resistance Trait. *Plant Signaling & Behavior*, 7(7): 767–770.
- Sadras VO. 2004. Yield and water-use efficiency of water- and nitrogen-stressed wheat crops increase with degree of co-limitation. *European Journal of Agronomy*, 21(4): 455–464.
- Sainz M, Díaz P, Monza J, Borsani O. 2010. Heat Stress Results in Loss of Chloroplast Cu/Zn Superoxide Dismutase and Increased Damage to Photosystem II in Combined Drought-Heat Stressed *Lotus japonicus*. *Physiologia Plantarum*, 140(1): 46–56.
- Salekdeh GH, Reynolds M, Bennett J, Boyer J. 2009. Conceptual Framework For Drought Phenotyping During Molecular Breeding. *Trends in Plant Science*, 14(9): 488–496.
- Sanchez DH, Schwabe F, Erban A, Udvardi MK, Kopka J. 2012. Comparative Metabolomics of Drought Acclimation in Model and Forage Legumes. *Plant, Cell and Environment*, 35(1): 136–149.
- Sánchez-Rodríguez E, Rubio-Wilhelmi M del M, Blasco B, Leyva R, Romero L, Ruiz JM. 2012. Antioxidant Response Resides in the Shoot in Reciprocal Grafts of Drought-Tolerant and Drought-Sensitive Cultivars in Tomato Under Water Stress. *Plant Science*, 188: 89–96.

- Sandal N, Sato S. 2014. Genetic Linkage Maps, Synteny and Map-based Cloning. En: Tabata S, Stougaard J (Eds.). *The Lotus japonicus Genome*. Berlin Heidelberg: Springer. 21-31
- Sandal N, Petersen TR, Murray J, Umehara Y, Karas B, Yano K, Kumagai H, Yoshikawa M, Saito K, Hayashi M, Murakami Y, Wang X, Hakoyama T, Imaizumi-Anraku H, Sato S, Kato T, Chen W, Hossain MS, Shibata S, Wang TL, Yokota K, Larsen K, Kanamori N, Madsen E, Radutoiu S, Madsen LH, Radu TG, Krusell L, Ooki Y, Banba M, Betti M, Rispail N, Skøt L, Tuck E, Perry J, Yoshida S, Vickers K, Pike J, Mulder L, Charpentier M, Müller J, Ohtomo R, Kojima T, Ando S, Marquez AJ, Gresshoff PM, Harada K, Webb J, Hata S, Suganuma N, Kouchi H, Kawasaki S, Tabata S, Hayashi M, Parniske M, Szczyglowski K, Kawaguchi M, Stougaard J. 2006. Genetics of symbiosis in *Lotus japonicus*: Recombinant Inbred Lines, Comparative Genetic Maps, and Map Position of 35 Symbiotic Loci. *Molecular Plant-Microbe Interactions* : MPMI, 19(1): 80–91.
- Sandal N, Krusell L, Radutoiu S, Olbryt M, Pedrosa A, Stracke S, Sato S, Kato T, Tabata S, Parniske M, Bachmair A, Ketelsen T, Stougaard J. 2002. A Genetic Linkage Map of the Model Legume *Lotus Japonicus* and Strategies For Fast Mapping of New Loci. *Genetics*, 161(4): 1673–83.
- Sanjuán J, Rebuffo M. 2010. LOTASSA: Bridging Genomics and Pastures in the XXI Century. Montevideo, Uruguay. PROCISUR.1-67.
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Kato T, Nakao M, Sasamoto S, Watanabe A, Ono A, Kawashima K, Fujishiro T, Katoh M, Kohara M, Kishida Y, Minami C, Nakayama S, Nakazaki N, Shimizu Y, Shinpo S, Takahashi C, Wada T, Yamada M, Ohmido N, Hayashi M, Fukui K, Baba T, Nakamichi T, Mori H, Tabata S. 2008. Genome Structure of the Legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 15(4): 227–39.
- Sato S, Tabata S. 2006. *Lotus japonicus* as a Platform For Legume Research. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(2): 128–32.
- Schloerke B, Crowley J, Cook D, Hofmann H, Wickham H, Briatte F, and Marbach M, 2014: GGally: Extension to ggplot2. R Package Version 0.4.6. <http://CRAN.R-project.org/package=GGally>.
- Semida WM, Rady MM. 2014. Presoaking Application of Propolis and Maize Grain Extracts Alleviates Salinity Stress in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Scientia Horticulturae*, 168: 210–217.

- Serraj R, Hash CT, Rizvi SMH, Sharma A, Yadav RS, Bidinger FR. 2005. Recent Advances in Marker- Assisted Selection For Drought Tolerance in Pearl Millet. *Plant Production Science*, 8(3): 334–337.
- Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT. 2004. Root Growth Maintenance During Water Deficits: Physiology to Functional Genomics. *Journal of Experimental Botany*, 55(407): 2343–2351.
- Shulaev V, Oliver DJ. 2006. Metabolic and Proteomic Markers For Oxidative Stress. New Tools For Reactive Oxygen Species Research. *Plant Physiology*, 141(2): 367–372.
- Signorelli S. 2014. Respuestas asociadas al déficit hídrico en leguminosas: acumulación de prolina y estrés nitro-oxidativo. Tesis Doctorado en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay. PEDECIBA. 172 p.
- Signorelli S, Bautista J, Bernt T, Borsani O, Monza J. 2013a. Proline Does Not Quench Singlet Oxygen : Evidence to Reconsider Its Protective Role in Plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 64: 80–83.
- Signorelli S, Casaretto E, Sainz M, Díaz P, Monza J, Borsani O. 2013b. Antioxidant and Photosystem II Responses Contribute to Explain the Drought-Heat Contrasting Tolerance of Two Forage Legumes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70: 195–203.
- Signorelli S, Coitiño EL, Borsani O, Monza J. 2013c. Molecular Mechanisms for the Reaction Between •OH Radicals and Proline: Insights on the Role as Reactive Oxygen Species Scavenger in Plant Stress. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(1): 37–47.
- Signorelli S, Corpas FJ, Borsani O, Barroso JB, Monza J. 2013d. Water stress induces a Differential and Spatially Distributed Nitro-Oxidative Stress Response in Roots and Leaves of *Lotus japonicus*. *Plant Science*, 201-202(1): 137–146.
- Sinclair TR, Muchow RC. 2001. System analysis of plant traits to increase grain yield on limited water supplies. *Agronomy Journal*, 93(2): 263–270.
- Singh RJ, Chung GH, Nelson RL. 2007. Landmark Research in Legumes. *Genome*, 537: 525–537.
- Sirault XRR, James RA., Furbank RT. 2009. A New Screening Method For Osmotic Component of Salinity Tolerance in Cereals Using Infrared Thermography. *Functional Plant Biology*, 36(11): 970–977.

- Smirnoff N. 1993. The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation. *New Phytologist*, 125(52): 27–58.
- Song C-J, Ma K-M, Qu L-Y, Liu Y, Xu X-L, Fu B-J, Zhong J-F. 2010. Interactive effects of water, nitrogen and phosphorus on the growth, biomass partitioning and water-use efficiency of *Bauhinia faberi* seedlings. *Journal of Arid Environments*, 74(9): 1003–1012.
- Souza JM, Peluffo G, Radi R. 2008. Protein Tyrosine Nitration--Functional Alteration Or Just a Biomarker?. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(4): 357-366.
- Striker GG, Casas C, Manzur ME, Ploschuk RA, Casal JJ. 2014. Phenomic Networks Reveal Largely Independent Root and Shoot Adjustment in Waterlogged Plants of *Lotus japonicus*. *Plant, Cell and Environment*, 37: 2278–2293.
- Sukhwinder-Singh, Hernandez MV., Crossa J, Singh PK, Bains NS, Singh K, Sharma I. 2012. Multi-Trait and Multi-Environment QTL Analyses For Resistance to Wheat Diseases. *PLoS ONE*, 7(6): e38008.
- Szabados L, Savouré A. 2010. Proline: A Multifunctional Amino Acid. *Trends in Plant Science*, 15(2): 89–97.
- Szczyglowski K ., Stougaard J. 2008. Lotus Genome: Pod of Gold For Legume Research. *Trends in Plant Science*, 13(10): 515–517.
- Tanksley SD. 1993. Mapping Polygenes. *Annual Review of Genetics*, 27: 205–233.
- Tardieu F. 2012. Any Trait Or Trait-Related Allele Can Confer Drought Tolerance: Just Design the Right Drought Scenario. *Journal of Experimental Botany*, 63(1): 25–31.
- Tardieu F, Simonneau T. 1998. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany*, 49: 419–432.
- Thoday JM. 1961. Location of Polygenes. *Nature*, 191: 368–370.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal*, 11: 1187–1194.
- Toker C, Canci H, Yildirim T. 2007. Evaluation of Perennial Wild Cicer Species For Drought Resistance. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(8): 1781–1786.

- Tominaga A, Gondo T, Akashi R. 2012. Quantitative Trait Locus Analysis of Symbiotic Nitrogen Fixation Activity in the Model Legume *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research*, 125(3): 395–406.
- Tsubokura Y, Onda R, Sato S, Xia Z, Hayashi M, Fukushima Y, Tabata S, Harada K. 2008. Characterization of Soybean Genome Based On Synteny Analysis with *Lotus japonicus*. *Breeding Science*, 58: 157–167.
- Tuberosa R. 2012. Phenotyping For Drought Tolerance of Crops in the Genomics Era. *Frontiers in Physiology*, 3: 1–26.
- Turner NC. 1986. Crop Water Deficits: A Decade of Progress. *Advances in Agronomy*, 39: 1–51.
- Udvardi MK, Tabata S, Parniske M, Stougaard J. 2005. *Lotus japonicus*: Legume Research in the Fast Lane. *Trends in Plant Science*, 10(5): 222-228.
- van Eeuwijk FA., Bink MC, Chenu K, Chapman SC. 2010. Detection and Use of QTL For Complex Traits in Multiple Environments. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(2): 193–205.
- Vargas M, van Eeuwijk FA, Crossa J, Ribaut J-M. 2006. Mapping QTLs and QTL x Environment Interaction For CIMMYT Maize Drought Stress Program Using Factorial Regression and Partial Least Squares Methods. *Theoretical and Applied Genetics.*, 112(6): 1009–1023.
- Varshney RK, Marcel TC, Ramsay L, Russell J, Röder MS, Stein N, Waugh R, Langridge P, Niks RE, Graner A. 2007. A High Density Barley Microsatellite Consensus Map with 775 SSR Loci. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(6): 1091–1103.
- Verbruggen N, Hermans C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35: 753–759.
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu J-K. 2006. Methods and Concepts in Quantifying Resistance to Drought, Salt and Freezing, Abiotic Stresses That Affect Plant Water Status. *The Plant Journal*, 45(4): 523–539.
- Vilhjálmsón BJ, Nordborg M. 2013. The Nature of Confounding in Genome-Wide Association Studies. *Nature Reviews Genetics*, 14(1): 1–2.
- Wang S, Liang D, Li C, Hao Y, Ma F, Shu H. 2012. Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*, (51): 81–89.

- Wang WB, Kim YH, Lee HS, Kim KY, Deng XP, Kwak SS. 2009. Analysis of Antioxidant Enzyme Activity During Germination of Alfalfa Under Salt and Drought Stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(7): 570–577.
- Wang W, Vinocur B, Altman A. 2003. Plant Responses to Drought, Salinity and Extreme Temperatures: Towards Genetic Engineering For Stress Tolerance. *Planta*, 218(1): 1–14.
- Wilson RA, Sangha MK, Banga SS, Atwal AK, Gupta S. 2014. Heat Stress Tolerance in Relation to Oxidative Stress and Antioxidants in *Brassica juncea*. *Journal of Environmental Biology*, 35(2): 383–387.
- Winter P, Kahl G. 1995. Molecular Marker Technologies For Plant Improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11(4): 438-448.
- Xiong L, Wang R, Mao G, Koczan JM. 2006. Identification of Drought Tolerance Determinants By Genetic Analysis of Root Response to Drought Stress and Abscisic Acid. *Plant Physiology*, 142(3): 1065–1074.
- Xu Y, Crouch JH. 2008. Marker-Assisted Selection in Plant Breeding: From Publications to Practice. *Crop Science*, 48(2): 391–408.
- Xue GP, McIntyre CL, Jenkins, CL, Glassop D, van Herwaarden AF, Shorter R. 2008. Molecular Dissection of Variation in Carbohydrate Metabolism Related to Water-Soluble Carbohydrate Accumulation in Stems of Wheat. *Plant Physiology*, 146(2): 441–454.
- Yamauchi Y, Pardales J, Kono Y. 1996. Root System Structure and Its Relation to Stress Tolerance. En: Ito O, Katayama K, Johansen JVDK, Kumar Rao JJ. (Eds.). *Root and Nitrogen in Cropping Systems of the Semiarid Tropics*. Tsukuba, Japan. Cultio Corporation. 211–233.
- Young ND, Mudge J, Ellis THN. 2003. Legume genomes: More than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(2): 199–204.
- Yousfi S, Serret MD, Márquez AJ, Voltas J, Araus JL. 2012. Combined Use of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{15}\text{N}$ Tracks Nitrogen Metabolism and Genotypic Adaptation of Durum Wheat to Salinity and Water Deficit. *The New Phytologist*, 194(1): 230–44.
- Yousfi N, Slama I, Ghnaya T, Savouré A, Abdelly C. 2010. Effects of Water Deficit Stress On Growth, Water Relations and Osmolyte Accumulation in *Medicago truncatula* and *M. laciniata* Populations. *Comptes Rendus - Biologies*, 333(3): 205–213.

- Zaman-Allah M, Jenkinson DM, Vadez V. 2011. A Conservative Pattern of Water Use, Rather Than Deep Or Profuse Rooting, Is Critical For the Terminal Drought Tolerance of Chickpea. *Journal of Experimental Botany*, 62: 4239–4252.
- Zhang F, Guo J-K, Yang Y-L, He W-L, Zhang L-X. 2004. Changes in the Pattern of Antioxidant Enzymes in Wheat Exposed to Water Deficit and Rewatering. *Acta Physiologiae Plantarum*, 26(3): 345-352.
- Zhu H, Choi H, Cook DR, Shoemaker RC. 2005. Bridging Model and Crop Legumes Through Comparative Genomics. *Plant Physiology*, 137: 1189–1196.
- Zia S, Romano G, Spreer W, Sanchez C, Cairns J, Araus JL, Müller J. 2013. Infrared Thermal Imaging as a Rapid Tool for Identifying Water-Stress Tolerant Maize Genotypes of Different Phenology. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 199(2): 75–84.