



**Generación de híbridos interespecíficos de  
*L. uliginosus* x *L. corniculatus* y evaluación de la respuesta  
a déficit hídrico**

**Tesis de Doctorado**



**Ing. Agr. Alicia Castillo M. Sc.**

**2012**

**AREA CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Subárea BIOQUÍMICA**

**Orientador: Dr. Jorge Monza  
Co-orientador: Dr. Omar Borsani**

**Tribunal: Dra. Lina Bettucci, Dra. Cristina Mazzella, Dra. Sabina Vidal**



## **Agradecimientos:**

Quiero agradecer especialmente a mi tutor, Dr. Jorge Monza y cotutor Dr. Omar Borsani, por los aportes y correcciones para concretar este trabajo.

Al coordinador de la Unidad de Biotecnología, Dr. Marco Dalla Rizza por su empuje y apoyo constante en transcurso de este proyecto, desde el inicio y hasta el final.

A la Ing. Agr. Mónica Rebuffo, por facilitarme los materiales vegetales y permitirme ingresar al mundo de los Lotus.

A los compañeros de INIA "La Estanzuela" por la participación en los cruzamientos dirigidos.

A los compañeros del INIA "Las Brujas", y de la Unidad de Biotecnología por ayudarme en los experimentos de laboratorio y de campo, especialmente a Victoria Bonnacarrère, motor fundamental de este trabajo.

Al Ing. Agr. Claudio García por la colaboración en el ensayo del shelter.

A los compañeros del laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía, que de una u otra forma hicieron más llevaderas, mis horas de mesada y de escritura, especialmente a Pedro Díaz, por su orientación en los ensayos y a Gastón Quero por su contribución en el diseño estadístico.

A los investigadores del IIBCE del Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo, Gustavo Folle, Federico Santiñaque y Beatriz López-Carro, por su colaboración en este trabajo.

A mi familia por la comprensión y ayuda a lo largo de estos cinco años.

A todos ellos, sinceramente ¡muchas gracias!

## RESUMEN

*Lotus corniculatus* y *L. uliginosus* son leguminosas con alto valor agronómico que se incorporan a las praderas, conformando pasturas mejoradas para aumentar la calidad del forraje. La productividad de estas especies está limitada por la falta temporal de agua que afecta la germinación, el establecimiento y crecimiento de las plántulas, y la producción de semilla. *L. corniculatus* y *L. uliginosus*, presentan diferentes estrategias de crecimiento y desarrollo a nivel del sistema radicular y de la parte aérea. En esta tesis se generaron híbridos interespecíficos que recombinaron mecanismos adaptativos presentes en las especies parentales. Los híbridos se obtuvieron mediante rescate de embriones, para lo que fue determinante el precultivo *in vitro* que hizo posible el desarrollo de los embriones hasta estados que permitieron la obtención de plantas. La identificación de los híbridos se realizó mediante citometría de flujo y marcadores moleculares, dos de los cuales (TM1150 y EH380069) resultaron polimórficos para los parentales. Las respuestas fisiológicas y bioquímicas de los híbridos H1-6 y H1-87 en condición de estrés se establecieron a través de diferentes criterios. La pérdida de agua por folíolos de plantas adaptadas a 30 y 100 % de humedad relativa ambiente (HR) no presentó diferencia significativa entre los genotipos. La emisión de fluorescencia y la acumulación de prolina en folíolos se cuantificaron en tratamientos control (a capacidad de campo), con suspensión del riego (estrés hídrico), incubación 4h a 40 °C (estrés térmico) y estrés hídrico y térmico combinado. La emisión de fluorescencia evidenció que el PSII de *L. uliginosus* fue el más afectado en estrés hídrico y térmico combinado. Al quinto de estrés combinado en esta especie la relación  $F_v/F_m$  descendió a 0.70, lo que indica daño del PSII, mientras en *L. corniculatus* se mantuvo como en el control (0.86) y los híbridos H1-87 y H1-6 mostraron un comportamiento intermedio, entre 0.78 y 0.83 respectivamente. En condición de estrés hídrico todos los genotipos, menos *L. uliginosus* acumularon prolina, pero en estrés hídrico más térmico combinado se produjo una reducción en la acumulación de prolina respecto al tratamiento de estrés hídrico, excepto nuevamente *L. uliginosus* que acumuló más. El híbrido H 1-6 acumuló más prolina tanto en estrés hídrico como el tratamiento de estrés combinado. Los genotipos presentaron la misma eficiencia en el uso del agua estimada por el método gravimétrico. Sin embargo cuando ésta fue estimada por discriminación isotópica del carbono en situación de estrés, hubo diferencias significativas de las especies parentales entre sí mientras que los híbridos tuvieron valores de discriminación intermedios. En cuanto a la defensa antioxidante enzimática,

todos los genotipos incrementaron la actividad de la SOD, menos el híbrido H1-87, que tuvo un nivel basal de actividad más alto que el resto, y su actividad SOD, disminuyó en estrés hídrico. La actividad CAT y APX se incrementó sólo en los híbridos durante la condición de estrés. La cuantificación del daño oxidativo por TBAR, mostró mayor daño en *L.corniculatus*, tanto en estrés hídrico, como en la combinación de hídrico más térmico, diferenciándose de *L.uliginosus* que tuvo los niveles más bajos de daño. El híbrido H1-87 mostró una respuesta similar a *L. corniculatus*, pero el H1-6, solo mostró un alto nivel de daño en el tratamiento que combinó estrés hídrico más térmico. El crecimiento radicular en condiciones de estrés osmótico inducido por Polietilenglicol permitió establecer diferencias significativas entre todos los genotipos. *L. corniculatus* presentó la mayor tasa de crecimiento radicular a potenciales más negativos, los híbridos valores intermedios y *L. uliginosus* fue el que tuvo la menor tasa de crecimiento. Las plantas F<sub>2</sub> se instalaron a campo en un shelter, con distinta disponibilidad de agua. Cuando ésta no fue limitante, la biomasa producida por los parentales y el híbrido H1-6 no manifestó diferencias significativas, en cambio en condición de 25 % de la evapotranspiración potencial, el híbrido produjo significativamente más biomasa que los parentales. Además el 60% de los híbridos desarrolló rizomas.

## Abstract

*Lotus corniculatus* and *L. uliginosus* are legumes with high agronomic value that join the prairies, forming improved pastures to increase forage quality. The productivity of these species is limited by the temporary lack of water affects the germination, establishment and seedling growth and seed production. *L. corniculatus* and *L. uliginosus*, shows different strategies for growth and development at the root system and the aboveground. In this thesis interspecific hybrids were generated recombined adaptive mechanisms present in the parental species. The hybrids were obtained by embryo rescue, which was crucial through the in vitro pre-culture that made possible the development of embryos that allowed obtaining plants. The identification of the hybrid was performed using flow cytometry and molecular markers, two of which (TM1150 and EH380069) for parental species were polymorphic. The physiological and biochemical responses of hybrid H1 and H1-6-87 in stress condition were established by different criteria. The leaflets water loss of plants adapted to 30 and 100% relative humidity (RH) were not different between genotypes. The fluorescence emission and accumulation of proline treatments were quantified leaflets control (field capacity), with irrigation suspension (water stress), 4h incubation at 40 ° C (thermal stress) and combined heat and water stress. The emission of fluorescence showed that the PSII of *L. uliginosus* was most affected in combined thermal and water stress. At combined fifth stress in this species the Fv / Fm ratio decreased to 0.70, suggesting PSII damage while in *L. corniculatus* remained in the control (0.86) and the hybrid H1-6 and H1-87, showed an intermediate behavior between 0.78 and 0.83 respectively. Water stress in all genotypes except *L. uliginosus*, accumulated proline, but more thermal stress combined water produced a reduction in the accumulation of proline compared to water stress treatment, again except *L. uliginosus* accumulated more. The hybrid H 1-6 accumulated more proline both water stress and combined stress treatment. The genotypes had the same efficiency of water use, estimated by the gravimetric method. However, when it was estimated by carbon isotope discrimination under stress conditions, significant differences in the parental species was observed, while hybrids had intermediate values of discrimination. As the antioxidant enzyme, all genotypes increased SOD activity minus the hybrid H1-87, which had a basal level of activity higher than the rest, and its SOD activity, decreased water stress. CAT and APX activity increased only in hybrids during the stress condition. Quantification of oxidative damage by TBAR showed higher *L. corniculatus* damage both water stress, as in the combination of water plus heat, differing *L. uliginosus* which had the lowest levels of damage. The hybrid H1-87 showed a similar response to *L. corniculatus*, but the H1-6, only showed a high level of damage that combined treatment more thermal water stress. Root growth under conditions of osmotic stress induced by polyethylene glycol allowed to establish significant differences among all genotypes. *L. corniculatus* had the highest rate of root growth to more negative potentials, hybrids and *L. uliginosus* intermediate values was the one with the lowest growth rate. F2 plants were installed in a shelter field, with different water availability. When it was not limiting, the biomass produced by the parents and the hybrid H1-6 didn't showed significant differences, but in 25% of the potential evapotranspiration, the hybrid produced significantly more biomass than the parents. Furthermore, 60% of the hybrids developed rhizomes.

|  |    |
|--|----|
| I Introducción.....  | 1  |
| 1. Leguminosas del género <i>Lotus</i> usadas en la mejora de forraje.....                         | 1  |
| 2. Características biológicas y agronómicas de <i>L. corniculatus</i> y <i>L. uliginosus</i> ..... | 2  |
| 3. Hibridación interespecífica y rescate de embriones.....   | 4  |
| 4. Estrategias para la confirmación del estatus híbrido.....                                       | 6  |
| 4.1 Estimación del tamaño del genoma por Citometría de flujo .....                                 | 6  |
| 4.2 Marcadores moleculares para la identificación de híbridos .....                                | 7  |
| 5. Tolerancia – sensibilidad de las plantas frente a déficit hídrico .....                         | 8  |
| 5.1 Uso de polietilenglicol para evaluar <i>in - vitro</i> respuestas a déficit hídrico .....      | 9  |
| 5.2 Control de agua en el suelo en ensayos a campo.....  | 10 |
| 6. Sensibilidad-tolerancia a déficit hídrico: parámetros morfo – fisiológicos y bioquímicos .....  | 11 |
| 6.1 Crecimiento radicular en condición de estrés hídrico.....                                      | 13 |
| 6.2 La prolina como indicador de potencial hídrico celular .....                                   | 14 |
| 6.3 Regulación de la pérdida de agua por los estomas.....  | 16 |
| 6.4 Eficiencia en el uso del agua como indicador de tolerancia – sensibilidad a sequía.....        | 17 |
| 6.4.1 Determinación de la EUA por gravimetría.....   | 17 |
| 6.4.2 Estimación de la EUA a través de la discriminación isotópica del <sup>13</sup> C.....        | 19 |
| 6.5 Emisión de fluorescencia del fotosistema II como indicador de estrés.....                      | 21 |
| 6.6 Defensa antioxidante enzimática en respuesta al déficit hídrico .....                          | 23 |
| 6.6.1 Generación de especies reactivas del oxígeno en plantas.....                                 | 23 |
| 6.6.2 Enzimas relacionadas a la defensa antioxidante: SOD, CAT y APX.....                          | 26 |
| 6.6.3 Estimación del daño oxidativo.....   | 28 |
| II Objetivos .....   | 30 |
| III Materiales y métodos .....   | 31 |
| 1. Material vegetal.....   | 31 |
| 2. Cruzamientos .....  | 31 |
| 2.1 Comprobación de autoincompatibilidad de los parentales .....                                   | 31 |
| 2.2 Cruzamiento para la obtención de híbridos interespecíficos.....                                | 31 |

|   |    |
|---|----|
| 2.3 Rescate de embriones.....   | 32 |
| 2.4 Confirmación de los híbridos.....   | 33 |
| 2.4.1 Estimación del tamaño del genoma mediante citometría de flujo .....                     | 33 |
| 2.4.2 Marcadores moleculares .....  | 34 |
| 3. Determinaciones analíticas en híbridos de la F <sub>1</sub> .....                          | 34 |
| 3.1 Crecimiento de las plantas.....   | 35 |
| 3.2 Extracción y cuantificación de prolina.....   | 36 |
| 3.3 Cuantificación de clorofilas a y b.....   | 37 |
| 3.4 Pérdida de agua de los folíolos.....  | 37 |
| 3.5 Peroxidación de lípidos.....  | 37 |
| 3.6 Concentración de proteína.....  | 38 |
| 3.7 Actividad SOD, CAT Y APX.....   | 38 |
| 3.8 Evaluación de parámetros fotosintéticos.....  | 39 |
| 3.8.1 Fluorescencia del FSII.....   | 39 |
| 3.8.2 Eficiencia en el uso del agua.....  | 40 |
| 3.8.3 Determinación de la discriminación isotópica del <sup>13</sup> C.....                   | 41 |
| 4. Evaluación de la respuesta al déficit hídrico de la F <sub>2</sub> .....                   | 42 |
| 4.1 Crecimiento radicular de plántulas en diferentes potenciales osmóticos .....              | 42 |
| 4.2 Determinación de variables consideradas en el ensayo en campo .....                       | 42 |
| 4.3 Evaluación de las plantas F <sub>2</sub> con diferente contenido de agua en el suelo..... | 45 |
| 4.3.1 Conductancia estomática.....  | 45 |
| 4.3.2 Estimación de la biomasa producida.....   | 46 |
| 4.3.3 Diámetro de corona, presencia de rizomas y longitud de la raíz principal.....           | 46 |
| 5. Análisis estadístico.....  | 46 |
| IV Resultados .....   | 47 |
| 1 Obtención de los híbridos.....  | 47 |
| 2 Confirmación del estatus híbrido.....   | 48 |
| 2.1 Confirmación de híbridos mediante citometría de Flujo .....                               | 49 |

|   |    |
|---|----|
| 2.2 Confirmación de híbridos mediante marcadores moleculares.....   | 50 |
| 3. Evaluación fenotípica de los híbridos de la F1 según parámetros morfológicos y reproductivos.              | 51 |
| 3.1 Características morfológicas .....  | 51 |
| 3.2 Fertilidad de la F1.....  | 52 |
| 4. Evaluación de respuestas a estrés en híbridos F <sub>1</sub> .....   | 53 |
| 4.1 Acumulación de prolina en folíolos .....  | 53 |
| 4.2 Contenido de clorofila a y b.....   | 54 |
| 4.3 Pérdida de agua por los folíolos .....  | 55 |
| 4.4 Peroxidación de lípidos .....   | 56 |
| 4.5 Fv/Fm y NPQ .....   | 57 |
| 4.6 Defensa antioxidante enzimática frente a estrés oxidativo .....   | 60 |
| 4.7 Eficiencia en el uso del agua .....   | 60 |
| 4.7.1 Determinación gravimétrica .....  | 60 |
| 4.7.2 Discriminación isotópica del <sup>13</sup> C.....   | 62 |
| 4.7.3 Relación raíz-tallo.....  | 63 |
| 5. Evaluación fenotípica de la respuesta a estrés de los híbridos de la F <sub>2</sub> .....                  | 63 |
| 5.1 Crecimiento radicular en bajo potencial osmótico .....  | 63 |
| 5.2 Evaluación del comportamiento a campo de los híbridos .....   | 65 |
| 5.2.1 Conductancia estomática .....   | 66 |
| 5.2.2 Producción de biomasa de la parte aérea .....   | 66 |
| 5.2.3 Desarrollo radicular y presencia de rizomas.....  | 70 |
| V Discusión.....  | 72 |
| 1. Obtención de híbridos de <i>L. uliginosus</i> x <i>L. corniculatus</i> mediante rescate de embriones ..... | 72 |
| 2. Confirmación del estatus híbrido.....  | 75 |
| 3. Fertilidad de los híbridos de la F <sub>1</sub> .....  | 77 |
| 4. Evaluación de los híbridos en condiciones de estrés.....   | 77 |
| 4.1 Transpiración y EUA .....   | 77 |
| 4.2 Parámetros de fluorescencia y tolerancia a estrés.....  | 80 |

|  |    |
|--|----|
| 4.3 Acumulación de prolina.....                            | 81 |
| 4.4 Defensa antioxidante enzimática.....                   | 82 |
| 5. Parámetros morfológicos en la respuesta al estrés ..... | 83 |
| VI Conclusiones.....                                       | 87 |
| VII Bibliografía.....                                      | 89 |

## I INTRODUCCIÓN

Aproximadamente la mitad de las comunidades vegetales terrestres sufren regularmente períodos extensos de déficit hídrico, que son la principal causa de pérdidas en el rendimiento de los cultivos económicamente importantes y en el deterioro de pasturas. Las consecuencias de la sequía tienen mayor gravedad que las provocadas por otros factores bióticos y abióticos (Romero y Estrada, 2005) y constituye el factor ambiental limitante que predomina en los diferentes sistemas de producción (Reddy et al., 2004), sea por la reducción en el rendimiento o por la limitación en la expansión de áreas agrícolas (Chaves y Olivera 2004; Harb et al., 2010). Por esto, la comprensión de mecanismos genéticos y bioquímicos que controlan la tolerancia a la sequía es un tema central en el estudio de las plantas (Sharp et al., 2004).

Para controlar el contenido de agua y poder tolerar o resistir la sequía, las plantas desarrollaron diferentes estrategias (Schulze, 1986). Unas están asociadas a características como maduración temprana, desarrollo de sistemas radiculares profundos o disminución del área foliar, al menos durante los períodos de alta temperatura y suelos secos (Munns et al., 2010). Otras estrategias están relacionadas con la capacidad de las células de aumentar la captación y el mantenimiento del agua y con la puesta en marcha de respuestas antioxidantes, así como de mecanismos que permiten que el metabolismo ocurra en un estado de bajo contenido de agua en la hoja (Harb et al., 2010).

### 1. Leguminosas del género *Lotus* usadas en la mejora de forraje

Las más de 18.000 especies de leguminosas con una notable diversidad (Masayoshi et al., 2005) ocupan aproximadamente el 12 % de la superficie arable mundial. Una evidencia de la importancia de estas plantas en el terreno social y biológico justifica la significativa inversión en estudios genómicos que se realizan en esta familia (Gepts et al., 2005), que además tiene la particularidad de establecer simbiosis con bacterias que fijan nitrógeno, colectivamente llamadas rizobios. El uso y manejo de esta simbiosis permite recuperar suelos degradados, disminuir el uso de agroquímicos y contribuye con la producción sustentable (Peccetti et al., 2009).

El género *Lotus* comprende un conjunto heterogéneo de más de 200 especies, anuales y perennes ampliamente distribuidas en el mundo (Grant, 1995), muchas con valor forrajero como *Lotus corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. subbiflorus* y *L. tenuis*. Estas leguminosas tienen una característica en común, de interés agronómico, que es la presencia de taninos condensados. Estos le dan a la planta resistencia a

enfermedades y al ataque de insectos, y en los animales reducen la presencia de parásitos gastrointestinales y previenen el meteorismo (Min et al., 2003). Los taninos condensados mejoran el aprovechamiento de proteínas del forraje, que son pobremente utilizadas por los rumiantes. En el rumen los taninos condensados se unen a la proteína y la hacen insoluble a pH ruminal (5,8 a 6,8) y el nitrógeno de éstas no se pierde por desaminación (Gebrehiwot et al., 2002). En las condiciones ácidas del abomaso (pH 2,5 a 3,5) estos complejos se disocian y los aminoácidos son absorbidos a nivel del intestino delgado, lo que se traduce en incrementos de la performance del ganado en la mejor calidad de lana y mayor producción de carne y de leche. Debido al mejor uso de proteínas y a la menor excreción de urea se reducen las emisiones de amoníaco del estiércol (MacAdam, 2006). De esta forma, los taninos condensados contribuyen a la reducción en la generación y emisión de metano, que se estima contribuyen con el 20 % del calentamiento global y del efecto invernadero (Woodward et al., 2000).

En Uruguay se incorporaron diferentes especies del género *Lotus* y se siembran alrededor de 500.000 ha (Censo Agropecuario, 2011) en sistemas ganaderos, agrícola-ganaderos y lecheros. La introducción de leguminosas en el campo natural proporciona nitrógeno al sistema, aumenta la calidad y cantidad de gramíneas y como consecuencia protege los recursos genéticos nativos que contribuyen al mantenimiento sustentable de la biodiversidad (FAO, 1996). También mejoran la estructura del suelo, aumentan la materia orgánica, incrementando la rentabilidad en la producción agrícola (Morón, 2003). A su vez, en sistemas de producción ganaderos mejoran la sincronización y acortan los ciclos reproductivos, de recría y engorde, que se traduce en una mejora en el ingreso neto del predio para todos los modelos estudiados (Rebuffo, 2005).

En particular, y en lo referente a la incorporación de leguminosas del género *Lotus* a la pastura, se producen cambios significativos en dos aspectos. Por un lado aumenta la disponibilidad del forraje estacional del campo natural de 7 a 18 kg de materia seca (MS) · ha<sup>-1</sup> · día<sup>-1</sup> en invierno y de 15 a 31 kg de MS · ha<sup>-1</sup> · día<sup>-1</sup> en primavera, y por otro eleva el contenido de proteína cruda de 9 a 18 %.

## **2. Características biológicas y agronómicas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus***

*L. corniculatus* (4x), introducido al Uruguay en los años 60 es originario de zonas mediterráneas de Europa y África. Es una especie perenne, alógama y de ciclo estival, que ha sido la más ampliamente distribuida entre los *Lotus*, con poblaciones naturalizadas en diferentes regiones como Norteamérica y

Sudamérica (García de los Santos et al., 2001). Además es la especie con mayor variabilidad genética, con hojas glabras o pilosas, tallos decumbentes o erectos, en general sin rizomas, y con abundante formación de tallos a partir de la corona (Kirkbride, 1999).

*L. corniculatus* se usa exitosamente en regiones con veranos secos y marcada estacionalidad, como en Nueva Zelanda (Barry et al., 2003) y en Uruguay, donde han demostrado sus ventajas (Ayala y Carámbula, 2009). Además, tolera déficit hídrico y aluminio y crece en suelos poco fértiles, atributos de particular interés para su uso en zonas con esas características (Scott y Charlton, 1983). También se usa para controlar procesos de erosión, y como biorremediador en suelos contaminados con boro, selenio y otros agentes contaminantes (Díaz et al., 2005).

*L. uliginosus* (4x), es otra especie estival usada en el mejoramiento de praderas. Es perenne, alógama, con crecimiento vegetativo variable, más o menos erecto, que desarrolla rizomas que funcionan como órganos de reserva y de propagación. Estos hacen que su dispersión sea menos dependiente de la resiembra por semilla (Wen et al., 2002), contribuyen con la persistencia porque se sustituyen las plantas muertas por causa de la sequía y enfermedades de raíz y corona (Li y Beuselinck, 1996) y aumenta la producción de forraje porque se incrementa el número de plantas (Kallembach et al., 2001). *L. uliginosus* puede crecer en zonas bajas con problemas de anegamiento, frecuentes en la zona Este del país (Carámbula, 1996) y en términos de producción de forraje puede superar al trébol blanco en suelos con pH inferior a 5,2. Además, tolera suelos anegados y es eficiente en la absorción de fósforo (Harris et al., 1993). Otra característica interesante es el desarrollo de un sistema radicular, formado por la corona, donde la raíz pivotante central da lugar a una importante red de rizomas, estolones y raíces fibrosas que le permiten colonizar con facilidad el tapiz natural (Carámbula et al., 1994).

Como muchas especies forrajeras de valor agronómico la productividad del género *Lotus* está limitada por la falta temporal de agua, que en nuestro país se inicia en el mes de setiembre y tiene el pico máximo a fines de enero. Esto determina una reducción en la producción de forraje de entre el 40 y el 60 % y afecta además a la germinación, al establecimiento de las plántulas, y al crecimiento y producción de semilla. Como consecuencia de la falta temporal de agua, surge la principal limitante de esta leguminosa que es la falta de persistencia en el tapiz (Wen et al., 2002). Por otro lado, para los materiales de floración

tardía la escasez de lluvias durante el verano, una situación frecuente en nuestras condiciones, determinan una muy baja producción de semilla (Rebuffo, 2005).

Otra limitante observada en varias especies de *Lotus*, principalmente en *L. corniculatus*, es la incapacidad de controlar la pérdida de semilla por apertura de las vainas o *shattering* (Grant, 1999). Esta característica no es posible mejorarla por vía de la ingeniería genética, debido a que los genes responsables aún no han sido identificados. En este sentido, en el género *Lotus* la forma de introducir el carácter indehiscente de las vainas ha sido mediante la hibridación interespecífica (Řepková et al., 2009), que si bien no es rápido permite introducir nuevas características entre especies (Nandini et al., 1999).

### **3. Hibridación interespecífica y rescate de embriones**

A pesar de haber una amplia variabilidad genética en *L. corniculatus* el mejoramiento ha tenido escasos avances porque se dispone de una base genética estrecha en los cultivares sobre los que se aplica la selección continua (Steiner y Poklemba, 1994; Beuselinck et al., 2003). La introducción de nuevas especies vegetales ofrece otra manera de incrementar la diversidad, sin embargo, ésta no es fácilmente incorporada mediante hibridación a los materiales comerciales adaptados, debido a la existencia de barreras reproductivas que mantienen el aislamiento entre las especies. En el proceso evolutivo, estas barreras han tenido un papel decisivo, porque han conducido a la conservación de las especies vegetales (Grant, 1995).

La hibridación interespecífica es un proceso de recombinación genética que puede generar una fuente de material sobre el cual luego operan los procesos de selección. Como producto de la recombinación genética, la descendencia obtenida puede ser parecida a uno de los padres, o ser enteramente diferente a ellos (Grant, 1999). De todas formas, cuanto más distante sean los géneros o especies seleccionados para el cruzamiento, más difícil de superar son las barreras reproductivas (Kudo et al., 2008).

En términos generales, las barreras precigóticas limitan la capacidad de los granos de polen de germinar en el estigma, o la de los tubos polínicos de crecer a través del estilo. Las barreras postcigóticas están relacionadas con anomalías en la formación del endosperma (Řepková et al., 2009) y como consecuencia los embriones abortan en etapas tempranas del desarrollo. En los cruzamientos interespecíficos, en general juega un papel clave en el aborto del embrión el balance en el número del

endosperma (EBN). En este sentido, cuanto mayor sea la diferencia en el EBN entre las especies que se cruzan, mayores serán las anomalías citológicas que se darán, como lo son los núcleos gigantes y el tamaño irregular de células del endosperma. Estas anomalías se producen como consecuencia de procesos de duplicación del ADN, que alterarían el control del ciclo celular de las células del endosperma (Cornejo et al., 2006). En cruzamientos entre especies del género *Oryza* se ha determinado que no se produce la fertilización de los núcleos polares, y como consecuencia no se da un desarrollo normal del endosperma (Fu et al., 2009). En el género *Lens*, Abbo y Ladizinsky (1994) establecieron las causas de aborto de cruzamientos interespecíficos de embriones de la F<sub>1</sub>. En este género, la barrera reproductiva se debe a una única mutación en un locus que afecta el desarrollo normal del embrión. En cruzamientos entre especies del género *Fagopyrum*, se detectaron anomalías en el desarrollo del suspensor, que constituía la principal causa de aborto del embrión producido en el cruzamiento (Shaikh et al., 2001).

Para superar las barreras pre y postcigóticas entre especies se han utilizado diversas estrategias. Una de ellas consiste en el uso de especies “puente”, que facilitan la transferencia de las características deseadas a través de un cruzamiento intermedio, y luego, el producto de éste se vuelve a cruzar con el material vegetal de interés. De esta forma se combinan características entre especies que son incompatibles, entre las que no se puede llevar a cabo una hibridación directa (García de los Santos et al., 2001).

Otra alternativa para superar las barreras reproductivas consiste en recurrir al rescate de embriones (Sharma et al., 1996; Galati et al., 2006), que consiste en extraer al embrión formado a partir del gametofito femenino por el proceso de fertilización sexual, y transferirlo a un medio de cultivo artificial en condiciones asépticas. Uno de los aspectos determinantes en el éxito del cultivo de embriones es el estado de desarrollo de éste y la selección del medio, cuya composición determina la continuidad del crecimiento y desarrollo del embrión (Mehetre y Aher, 2004).

De esta forma, el rescate de embriones y el cultivo de óvulos y de semillas inmaduras *in vitro* ha sido una valiosa herramienta para eludir las barreras reproductivas de diferente origen. Su aplicación ha permitido producir nuevos cultivares e introducir características de interés. En plantas ornamentales se ha aplicado con muy buenos resultados en *Gypsophila*, *Primula*, *Sandersonia*, obteniendo híbridos interespecíficos e intergenéricos (Godo et al., 2009).

#### 4. Estrategias para la confirmación del estatus híbrido

La naturaleza de los híbridos interespecíficos debe ser confirmada para contar con la seguridad de que ha ocurrido el proceso de recombinación buscado, y descartar fecundaciones que pudiesen haber ocurrido dentro de la misma especie (Simonovik et al., 2007). La identificación de híbridos de la generación F<sub>1</sub> puede ser difícil, debido a que pueden no ser fácilmente distinguibles de los padres. Este hecho ha sido especialmente observado cuando las plantas crecen en invernáculo, en forma contenida, sin poder manifestar su tamaño total o potencial por las limitaciones de espacio (Gómez et al., 2008). Para confirmar la naturaleza de un híbrido putativo hay diferentes métodos, como la observación de los caracteres morfológicos de las plantas, el conteo y forma de los cromosomas, la variación del tamaño del genoma, el análisis de isoenzimas, así como el uso de marcadores moleculares (Amano et al., 2007).

##### 4.1 Estimación del tamaño del genoma por Citometría de flujo

La citometría de flujo (CF) permite analizar un gran número de muestras en poco tiempo, con un alto nivel de repetitividad. Si las especies utilizadas en los cruzamientos no tienen suficiente diferencia en el tamaño del genoma esta técnica no es útil para diferenciar los híbridos de sus parentales, lo que constituye una limitación para su uso (Rayburn et al., 2005). Sin embargo la CF es una técnica rápida y fiable para la identificación de híbridos cuando el tamaño del genoma de las especies parentales es diferente (Amano et al., 2007).

En esencia, la CF se basa en que la emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN. Para determinar el contenido de ADN nuclear, los núcleos aislados se marcan con fluorocromos como el Ioduro de Propidio, Bromuro de Etidio, o con DAPI, previa eliminación de ARN de las muestras. La emisión de fluorescencia por los fluorocromos se puede cuantificar y establecer la ploidía respecto a poblaciones celulares control. Normalmente, cerca del 90 % de las células en un tejido están en fase G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub> del ciclo celular, es decir, su carga cromosómica corresponde a los pares de cromosomas de la especie (2c). Las otras células están duplicando el DNA, o ya lo duplicaron (4c) previo a la mitosis (Moreno - Salazar et al., 2007).

En las angiospermas, el contenido de ADN ha sido estimado entre 0,1 pg y 125 pg, es decir que presentan una diferencia del orden de 1000 veces aproximadamente (Bennett et al., 2000). En varios trabajos se ha propuesto que la variación del tamaño del genoma tiene un significado adaptativo, y además,

a través de él, se pueden llevar a cabo estudios sobre organización del genoma, taxonomía y evolución, así como estudios comparativos entre especies vegetales (Bennett et al., 2000; Bennett y Leitch, 2005; Chase et al., 2005). En los últimos años se han comparado los tamaños de genomas determinados mediante CF de híbridos interespecíficos del género *Limonium*, *Cyclamen*, *Actinidia*, *Gladiolus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, etc. (Sisko et al., 2003; Bennett y Leitch, 2005).

#### **4.2 Marcadores moleculares para la identificación de híbridos**

La identificación asistida con marcadores moleculares con alto poder de resolución es una técnica robusta, usada cada vez con más frecuencia en la caracterización de cultivares para estimar y comparar la similitud genética y también en la protección de variedades (Hashemi et al., 2009). Existen varios tipos de marcadores moleculares que se han utilizado ampliamente, entre ellos, las isoenzimas RAPD (*random amplified polymorphic*), las SSR (*simple sequence repeats*), y STS (*sequence-tagged site*) (Devanand et al., 1999), (Wang et al., 2004; Ichii et al., 2003; Yashitola et al., 2002; Nandakumar et al., 2004).

Los marcadores moleculares y los mapas de ligamiento genético son prerrequisitos para llevar a cabo actividades de mejoramiento en cualquier cultivo. Estas herramientas pueden acelerar el proceso de introgresión de las características de interés en las variedades preferidas, especialmente para los rasgos complejos, como es el caso de la tolerancia a sequía (Varshney et al., 2009). Los marcadores moleculares más utilizados para analizar el genoma de las plantas son los microsatélites. Estos corresponden a secuencias repetidas en tándem, de uno a cinco pares de bases (pb), que se encuentran en todo el genoma (Wang et al., 1994) y tienen altas tasas de mutación, de alrededor de  $2,5 \times 10^{-2} \times 10^{-5}$  por generación (Weber y Wonc, 1993). Los microsatélites se han aplicado exitosamente en programas de mejoramiento (Gupta et al., 1996) y la técnica se basa en el uso de cebadores para amplificar por PCR (*polymerase chain reaction*) secuencias codominantes que se encuentran ampliamente distribuidas en el genoma (Li et al., 2002) y generalmente están asociadas a regiones conservadas del ADN (Morgante et al., 2002).

Los microsatélites son marcadores altamente reproducibles dentro de la misma especie y además se pueden transferir a otras especies y géneros (Eujayl et al., 2004; Gaitán-Solís et al., 2002; Wang et al., 2004; Zhang et al., 2007). La variación en estos marcadores codominantes se puede utilizar para

evaluar el tamaño efectivo y estructura de la población, la migración, las tasas de colonización y sistemas reproductivos (Burczyk et al., 2006, Morgan y Conner, 2001).

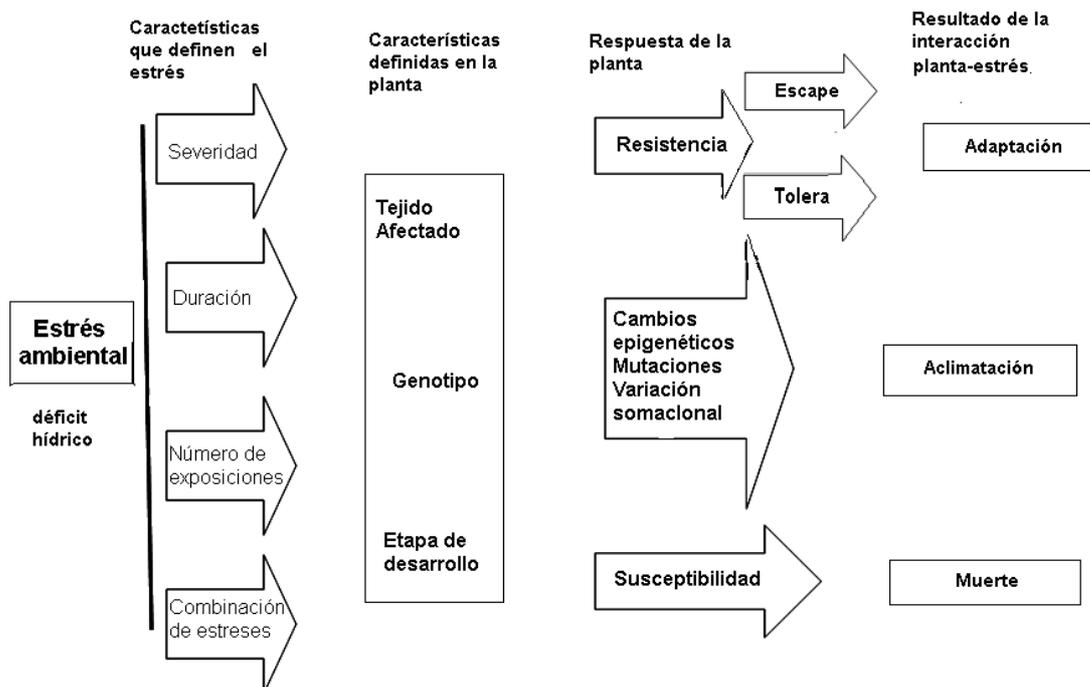
De la comparación marcadores SSR respecto a otros, éstos presentan varias ventajas en la identificación de plantas dado que se requiere menor cantidad de ADN que con los marcadores basados en RFLP (Powell et al., 1996) y el análisis es más rápido (Gómez et al., 2008). Además, los RAPD a menudo no son reproducibles y son dominantes en la mayoría de los casos. Por esto, con los marcadores del progenitor femenino no se pueden detectar heterocigotos en la generación  $F_1$  (Burrow y Blake, 1998), a pesar de que en la segregación de los patrones de marcadores en la generación  $F_2$  sí se pueden identificar híbridos.

El uso de marcadores SSR para la evaluación de híbridos es común en el tomate (Smith et al., 1998), maíz, (Salgado et al., 2006), arroz (Yashitola et al., 2002) y algodón (Dongre y Parkhi, 2005). Los recientes avances en genómica comparativa confirman que los resultados obtenidos en las especies modelo *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus*, con frecuencia se pueden extender a otras leguminosas de importancia agrícola dentro de la subfamilia Papilionoidea (Young et al., 2005). Además, el desarrollo de herramientas moleculares para el análisis en la interacción simbiótica de rizobios y micorrizas con las leguminosas, ha permitido avanzar en la comprensión de la interacción microorganismo - planta y en la identificación de genes claves caracterizados en este proceso (Sandal et al., 2006).

## **5. Tolerancia – sensibilidad de las plantas frente a déficit hídrico**

La capacidad de una planta para sobrevivir ante una condición de estrés ambiental, dependerá de su habilidad para percibir y transmitir las señales ante el estímulo recibido, y de la interacción con el ambiente. La tolerancia a la sequía, está determinada genéticamente, pero la expresión de estas características están sujetos a la interacción con el medio (Al-Ghamdi, 2009). La dificultad para comprender este proceso se debe, en parte, a que el estrés puede ocurrir en múltiples estadios del desarrollo de la planta (Fig. 1), y más de un tipo de estrés puede afectarla en forma simultánea (Chinnusamy et al., 2004). A su vez, el estrés puede tener diferente severidad y duración (Gaspar et al., 2002). De la interacción de estos factores, la planta tendrá diferentes respuestas de acuerdo a las estrategias fisiológicas y bioquímicas desarrolladas, que determinarán un comportamiento de susceptibilidad o tolerancia al estrés (Fig. 1).

Entre los distintos estreses, varios de ellos tienen en común que su origen es la variación del estatus de agua en la célula. El déficit de agua puede ocurrir por aumento en el contenido de iones en el suelo, por baja temperatura, baja disponibilidad de agua en el suelo o por aumento de la evapotranspiración (Verslues et al., 2006).



**Figura 1.** Posibles respuestas de las plantas a estreses ambientales (adaptado de Gaspar et al., 2002).

### 5.1 Uso de polietilenglicol para evaluar *in vitro* respuestas a déficit hídrico

La búsqueda de sistemas adecuados para reproducir el déficit hídrico en condiciones experimentales puso en evidencia distintas dificultades para simular un medio que represente la situación real en el suelo. Para imitar el efecto del descenso de potencial agua en el suelo, que ocurre en situación de sequía, se han usado diferentes compuestos osmóticos no iónicos como el manitol, melobiosa y sorbitol que son incluidos en el medio donde crecen las plantas. Estos compuestos pueden entrar en las células de la raíz y también favorecen el crecimiento bacteriano, lo que constituye limitaciones para su uso.

El polietilenglicol (PEG) ha sido usado desde los primeros estudios en los que se intentó imponer un déficit hídrico controlado. La principal ventaja de su uso es la posibilidad que brinda de establecer un potencial osmótico determinado, controlable con facilidad. De todas formas su uso tiene

limitaciones, principalmente asociadas con el medio en que se usará, si el medio es agarizado el PEG impide la su polimerización. Para superar esta dificultad la solución de PEG se agrega sobre el medio de cultivo 24 a 48 h antes de poner las plantas, para que éste difunda en el medio de cultivo y se establezca el potencial osmótico definido. Otra limitación del uso de PEG es en sistemas estériles, dado que no se puede autoclavar porque se produce una disminución de un 20 % del potencial osmótico previsto (van der Weele et al., 2000). También hay que tener en cuenta que el PEG limita la difusión de oxígeno (Mexal et al., 1975; Verslues et al., 1998) lo que en cultivo *in vitro* se soluciona colocando las placas verticalmente, de manera que las raíces crecen en la superficie del medio, al tiempo que están sometidas a bajo potencial de agua (van der Weele et al., 2000). De todas formas el PEG es el soluto que se usa habitualmente para imitar el efecto de un suelo en un proceso de pérdida de agua (Verslues y Bray, 2004; Verslues et al., 1998; van der Weele et al., 2000) en sistemas *in vitro*, dado que permite reproducir los experimentos y mantener el potencial osmótico en niveles constantes en placas o en cultivos hidropónicos.

El sistema de imposición de déficit hídrico utilizando PEG en placas, con mínima transpiración, ha sido empleado en estudios de respuesta a déficit hídrico en maíz, y otras especies, y se han obtenido resultados similares a cuando se utiliza vermiculita en los estudios de respuesta al bajo potencial de agua (Sharp et al., 2004). El PEG utilizado en sistema de hidroponía, a una concentración tal que generó a -1,1 Mpa, permitió el análisis fenotípico masivo de RILs (líneas recombinantes puras) de *L. japonicus* x *L. burttii*. En este sentido la inducción de un estrés osmótico mediante la adición de PEG hizo posible la identificación de QTLs asociados a la tolerancia a la sequía en los distintos materiales (Quero, 2011).

## 5.2 Control de agua en el suelo en ensayos a campo

Las respuestas de la planta a situaciones de estrés en condiciones de laboratorio deben ser validadas en ensayos en campo, es decir en el suelo y en ambientes reales (Munns et al., 2010). Para tener una aproximación precisa de la respuesta de la planta a las condiciones de déficit hídrico se puede recurrir al uso de un equipo protector de lluvia, denominado *shelter* (*rain out shelter*) que se muestra en la figura 2. El *shelter* permite abordar de forma sencilla el estudio de la sequía en condiciones de campo, excluyendo la posibilidad de ocurrencia de lluvias. (Hatfield et al., 1990). Su estructura consta de un techo corredizo que se mueve de manera automática cuando comienza y finaliza la lluvia, lo que hace posible regular el agua que recibe el cultivo en una condición de campo. Además, se pueden determinar los requerimientos de

agua de un cultivo, en nuestro caso una pastura, y calcular el consumo de agua y la producción de biomasa en diferentes situaciones de agua en el suelo. Para estas determinaciones hay que considerar la evapotranspiración (ET) que surge de dos procesos, la pérdida de agua del suelo o evaporación, y la pérdida de agua del cultivo o transpiración (FAO, 1996).

El *shelter* se ha utilizado para evaluar las diferencias entre variedades de *Cajanus cajan* en los mecanismos de ajuste osmótico bajo condiciones de sequía en distintas etapas del ciclo del cultivo. Su uso permitió evidenciar que las variedades de esta leguminosa tienen diferente respuesta a la sequía, y que los efectos de la misma son diferentes según la etapa del ciclo en que se encuentren las plantas (Subbarao et al., 2000). También se ha usado el *shelter* para evaluar el ajuste osmótico en diferentes líneas de maíz en condiciones de sequía, en relación con componentes del rendimiento, como número de flores y granos por mazorca y peso de grano (Chimenti et al., 2006).

La evaporación es el proceso por el cual el agua líquida se convierte en vapor por acción de la radiación solar directa y en menor grado por la temperatura del aire, que proporcionan la energía para cambiar el estado de las moléculas de líquido a vapor. La transpiración consiste en la vaporización del agua líquida contenida en los tejidos y su pasaje a la atmósfera a través de los estomas y minoritariamente (5 %) a través de la cutícula (Taiz y Zeiger, 2006).

De esta forma, el movimiento del agua en el sistema suelo - planta - atmósfera se produce por diferencias en la energía libre del agua en las diferentes partes del sistema. La cantidad de energía libre del agua decrece progresivamente, y como resultado ésta fluye desde el suelo a través de la planta hacia el aire, en respuesta a un gradiente de energía libre (Krizek, 1985).

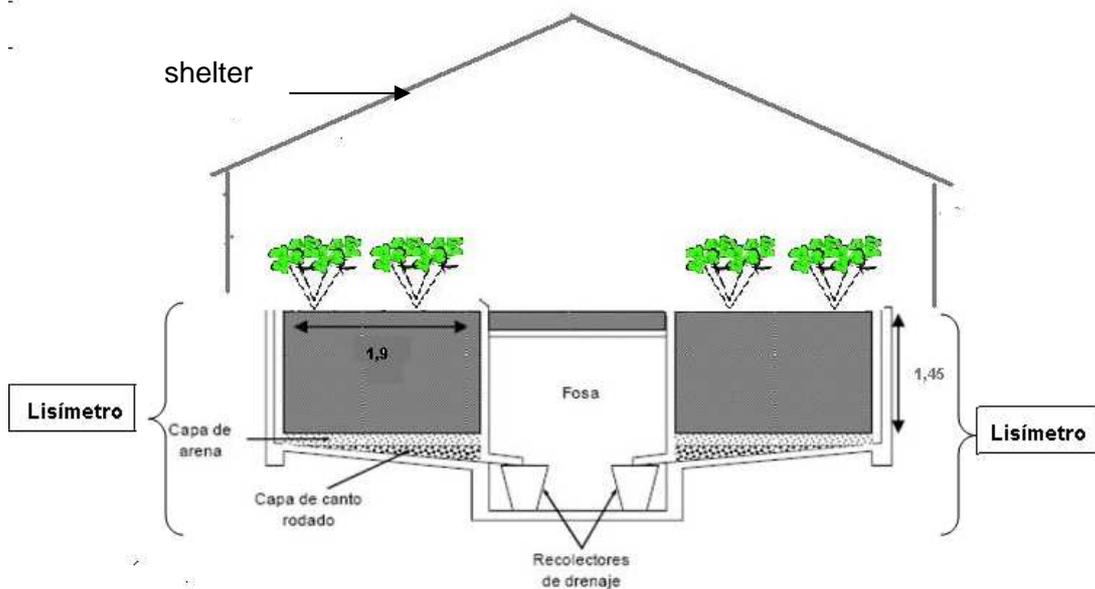
La ET de un cultivo se puede determinar mediante lisímetros, que permiten calcular con precisión este parámetro, recurriendo a observaciones de parámetros meteorológicos. Un lisímetro consta de un tanque que se llena con suelo y en él crece y se desarrolla el cultivo. Hay diferentes tipos de lisímetros, en los lisímetros de drenaje, la EP medida durante un período se obtiene de la resta de la cantidad de agua drenada recogida en el fondo del lisímetro, respecto a la cantidad de agua ingresada. Este tipo de lisímetro fue utilizado en nuestros experimentos (Fig. 3).

## **6. Sensibilidad – tolerancia a déficit hídrico: parámetros morfo – fisiológicos y bioquímicos**

El estrés es usualmente definido como un factor externo que ejerce efectos negativos sobre las plantas que reducen la tasa de algún proceso fisiológico por debajo de la máxima que podría alcanzar (Lambers et al., 1998). La tolerancia se entiende como la capacidad de las plantas de sobreponerse a un ambiente desfavorable (Taiz y Zeiger, 2006). Otro aspecto a tener presente es la escala temporal en la respuesta de las plantas al estrés.

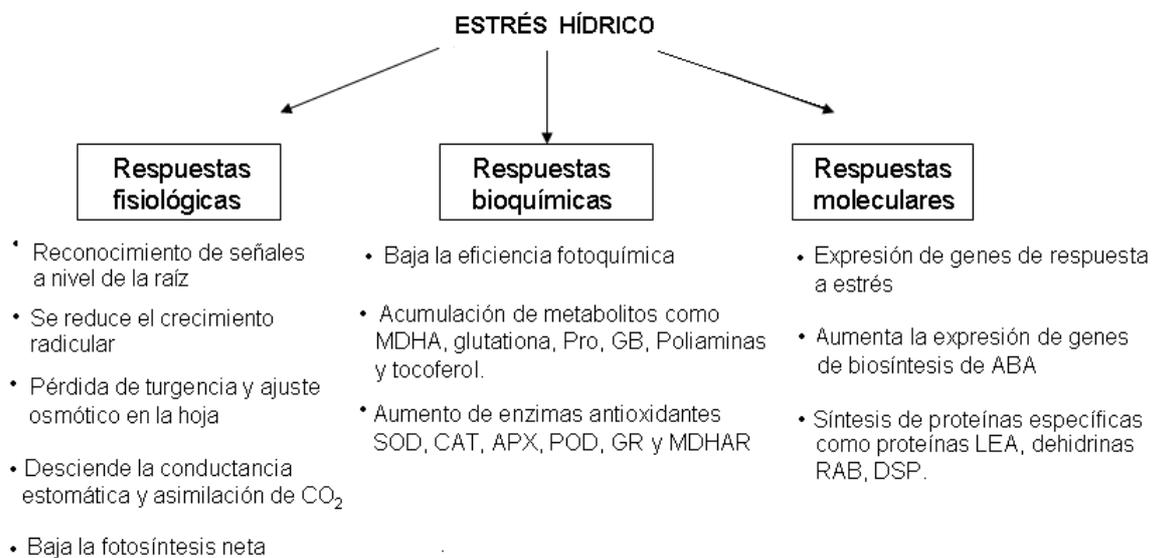


**Figura 2.** Vista frontal de un *shelter*. Las flechas indican las vías por las que se desplaza la estructura.



**Figura 3.** Representación esquemática del *shelter* y del lisímetro de drenaje. Se muestran las medidas y la ubicación de la fosa o recolector del agua de drenaje.

El “efecto inmediato” ocurre entre segundos y días, la “aclimatación” implica ajustes morfológico-fisiológicos que se dan en días a semanas, mientras que la “adaptación” ocurre en una escala temporal que incluye usualmente varias generaciones. La adaptación corresponde a una respuesta evolutiva que resulta de cambios genéticos en las poblaciones y conduce a una compensación morfológica y fisiológica. A medida que transcurre el déficit hídrico, en la planta se desencadenan respuestas a nivel bioquímico, fisiológico y molecular necesarias para proteger procesos como la respiración celular, fotosíntesis y transporte de nutrientes (Fig. 4).



**Figura 4.** Respuestas a distintos niveles de plantas sometidas a sequía (tomado de Shao et al., 2008).

### 6.1. Crecimiento radicular en condición de estrés hídrico

Las características de la raíz, especialmente su longitud pero también su densidad, número y diámetro, determinan la capacidad de exploración del suelo para adquirir agua. La capacidad de las plantas para desarrollar un sistema radicular profundo es un mecanismo de adaptación fundamental a la sequía (Shao et al., 2008). Por esta razón las características del sistema radicular pueden ser el foco de estudio en la mejora de la tolerancia al déficit hídrico en plantas. Sin embargo, el estudio del sistema radicular en el laboratorio o en condiciones controladas es particularmente complejo, porque es necesario implementar una metodología que refleje las características reales del crecimiento de la raíz (Ober y Sharp, 2007).

En términos generales las características del sistema radicular de plantas creciendo a campo presenta grandes diferencias si se lo compara con el que ocurre en un sistema controlado. Además, como

resultado de la interacción genotipo - ambiente, el fenotipo se puede ver radicalmente alterado por las condiciones de crecimiento definidas (Ober y Sharp, 2007).

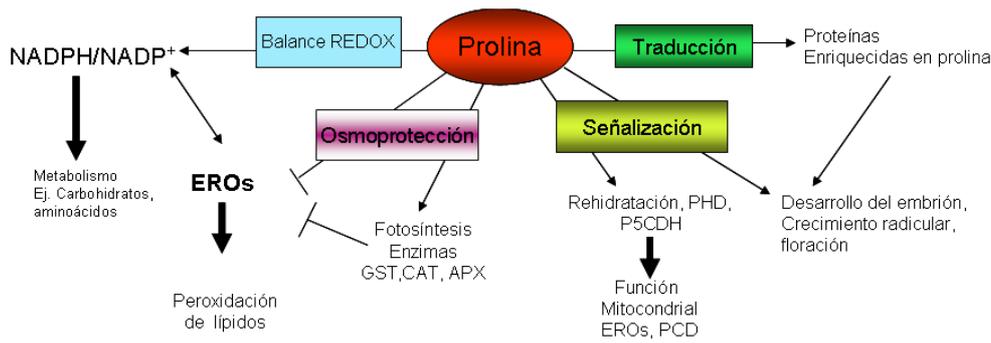
En el caso de un suelo en proceso de desecación se produce la deshidratación de la corteza radicular, y como consecuencia se generan señales químicas que tendrán impacto directo en el crecimiento y funcionamiento de la planta. Por un lado se inhibe la síntesis de reguladores de crecimiento involucrados en la expansión y desarrollo de la hoja, por otro comienza la síntesis de hormonas como el ácido abscísico (ABA) y etileno que inhiben la síntesis de otras hormonas como las citoquininas. Además, el ABA regula el comportamiento estomático según la disponibilidad de agua (Davies, 2007) y actúa como señal en la raíz, que es afectada en su biomasa y arquitectura (Chaves y Olivera, 2004). Cuando la disponibilidad de agua es limitada, la relación raíz/tallo aumenta porque la inhibición del crecimiento de las raíces con bajos potenciales agua, es menos sensible que la de los tallos (Blum, 2009).

## **6.2 La prolina como indicador de potencial hídrico celular**

Una de las respuestas universales de las plantas a los cambios del potencial osmótico externo es la acumulación de iones como  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$  y de osmolitos como alcoholes, azúcares (Hasegawa et al., 2000; Sotiropoulos, 2007) y solutos orgánicos como prolina, poliaminas y compuestos relacionados al amonio cuaternario como la glicínbetaína (Reddy et al., 2004).

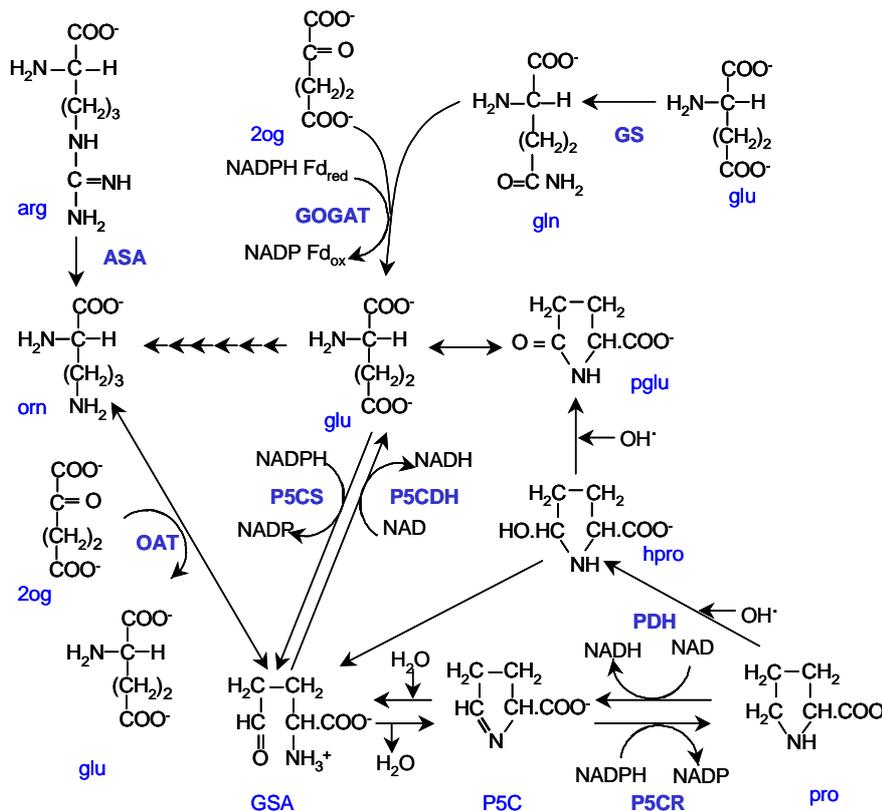
La biosíntesis de prolina, molécula a la que se ha adjudicado diferentes funciones entre ellas la de osmoprotección, es inducida por descensos del potencial hídrico celular, y se acompaña del incremento del nivel de expresión del gen que codifica la enzima pirrolina - 5 - carboxilato sintetasa (P5CS), que participa de su vía de síntesis (Pirzad et al., 2011). De todas formas su acumulación se debe al aumento de su síntesis y a la inactivación de su degradación (Díaz et al., 2005). Los roles asignados a la prolina se resumen en la figura 5.

Entre estos, se destaca la protección de proteínas y la detoxificación de especies reactivas del oxígeno (Pinhero et al., 2001; Ashraf y Foolad, 2007). También se ha propuesto que reduce el fotodaño en la membrana tilacoidal por detoxificación y/o reducción de la producción de  $^1O_2$  (Szabado y Saviouré, 2010; Reddy et al., 2004).



**Figura 5.** Funciones de la prolina en plantas. Se le asignan funciones de protección, de osmolito, en el mantenimiento del balance redox, en la regulación del desarrollo, señalización de redes metabólica y control del estrés (Adaptado de Szabado y Savouré, 2010).

La prolina se puede sintetizar por dos vías (Fig. 6) una que parte del glutamato y otra de la ornitina. La contribución relativa de una u otra vía sigue siendo motivo de discusión, y se ha propuesto que en *L. corniculatus* la síntesis por la vía de la ornitina es mayoritaria en plantas cultivadas con amonio, mientras que en plantas cultivadas con nitrato es mayoritaria la vía a partir de glutamato (Díaz et al., 2005).



**Figura 6.** Vía de síntesis y oxidación de la prolina. Enzimas: ASA, arginasa; GOGAT, glutamato sintasa; GS, glutamina sintetasa; OAT, ornitina amino transferasa; P5CS, pirrolín-5-carboxilato sintetasa; P5CDH, pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa; PDH, prolina deshidrogenasa y P5CR, pirrolina-5-carboxilato reductasa, Intermediarios: arg, Arginina; glu, glutamato; gln, glutamina; om, ornitina; P5C, pirrolina-5-carboxilato; pro, prolina; 2og, 2 oxoglutarato; GSA, glutamato semialdehído (Díaz, 2005).

En *arabidopsis*, cebada y maíz se ha encontrado que la acumulación de prolina es precedida por incrementos de ABA. Sin embargo *L. corniculatus* acumula prolina en respuesta a estrés hídrico, pero no en respuesta a aplicaciones de ABA (Díaz, 2005).

En *L. japonicus* y *Trifolium pratense* la prolina ha mostrado ser un excelente indicador temprano del déficit hídrico, dado que su acumulación comienza con variaciones muy bajas del contenido de agua celular, antes que otras respuestas fisiológicas o bioquímicas ocurran (Borsani et al., 2008).

### 6.3 Regulación de la pérdida de agua por los estomas

La respuesta estomática a la humedad ambiental previene la transpiración y evita el estrés hídrico cuando las plantas están sujetas a demanda ambiental de agua. Los mecanismos involucrados en la tolerancia al déficit hídrico se han estudiado mayormente a nivel de hoja, y se explican principalmente por diferencia en el comportamiento estomático (Schultz, 1996; Medrano et al., 2003). Para una especie perenne, en una escala de tiempo de días a meses la pérdida de agua está determinada principalmente por el área foliar y la conductancia estomática (CE) (Munns et al., 2010). La CE puede ser una herramienta útil para ser usada en el mejoramiento genético porque permite relacionar la pérdida de agua por transpiración y el carbono asimilado durante la fotosíntesis. El tamaño del ostiolo viene determinado por la cantidad de agua que contienen las células oclusivas o de guarda, que pueden tomar rápidamente agua aumentando su turgencia permitiendo que el ostiolo se abra, o alternativamente perderla y cerrarse. El mecanismo de apertura estomática se basa en la disminución del  $\Psi_o$  de las células oclusivas. El bombeo de  $H^+$  al apoplasto por una  $H^+$ -ATPasa, provoca una disminución del pH extracelular y un incremento del pH celular, aumentando el gradiente electroquímico que favorece la entrada masiva de  $K^+$  y, consecuentemente, la disminución del potencial osmótico y entrada de agua (Yoo et al., 2009).

La medida de la CE se puede realizar con un porómetro, y tiene como ventaja ser una técnica rápida, sencilla y no destructiva. Los valores de CE más altos bajo condiciones de estrés se vinculan con tasas de crecimiento más altas, mayor número de tallos o mayor producción de biomasa (Rahnama et al., 2010). En trigo y algodón se ha encontrado una correlación positiva significativa entre los valores más altos de CE con los de cosecha y producción a campo (Munns et al., 2010). En distintas especies de lotus, Borsani et al. (2006) realizaron evaluaciones de conductancia estomática en situaciones de estrés hídrico y encontraron diferencias entre ellas.

#### **6.4 Eficiencia en el uso del agua como indicador de tolerancia – sensibilidad a sequía**

La regulación de la pérdida de agua por estomas es un mecanismo de control que impone mayor o menor restricción a la difusión del vapor de agua desde la cavidad subestomática a la atmósfera. De esta forma la regulación del grado de apertura – cierre de los estomas es responsable en parte de la eficiencia en el uso del agua de las plantas (Medrano et al., 2002).

La relación entre la cantidad de agua transpirada por las plantas y la materia seca producida es variable en función de las condiciones ambientales, siendo esta relación la más alta cuando las plantas crecen en ambientes secos (Jones, 2004). La relación entre la cantidad de agua transpirada por las plantas y la materia seca acumulada ha sido denominada eficiencia en uso del agua (EUA) (Jones, 2004).

Se han utilizado varias definiciones de EUA, las cuales según Jones (2004) se pueden establecer a diferentes niveles como el de planta entera, el de cultivo o el de hoja, que es la relación entre la tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> y la transpiración. La EUA a nivel de planta es un parámetro con valor experimental, y en general se obtiene en condiciones controladas en las cuales las plantas se encuentran en sistemas en los que el agua consumida puede medirse con exactitud. Sin embargo, presenta dos inconvenientes, en primer lugar se trata de una medida realizada en condiciones experimentales, por lo que su extrapolación a condiciones reales de campo debe hacerse con cautela; en segundo lugar, su medida es muy laboriosa debido a que el consumo de agua se realiza por diferencia de peso y la producción de biomasa radicular implica la separación de las raíces del suelo, lo que no siempre es sencillo. A pesar de estos inconvenientes, la EUA a nivel de planta entera es un parámetro útil en la comparación de especies y variedades (Medrano et al., 2002).

##### **6.4.1 Determinación de la EUA por gravimetría**

La EUA se define como la relación entre la acumulación de materia seca y el consumo de agua durante un tiempo determinado. Así, el aumento de la EUA, en teoría podría aumentar el crecimiento de las plantas en condiciones limitantes de agua en la medida que pueden disminuir el efecto de la sequía (Yoo et al., 2009). En el cuadro 1 se presentan ejemplos de la variabilidad genética entre especies en el parámetro EUA. Estas diferencias no solo se ven entre especies, también se pueden establecer entre variedades e individuos.

De este modo, por la vía del mejoramiento genético y de la selección de los genotipos con mayor EUA es posible seleccionar los individuos que presenten ventajas en este parámetro. Estos individuos contarán con mecanismos que le confieren mayor tolerancia a la sequía, dados por la densidad de estomas, la conductancia estomática, la cantidad y tipo de ceras de la cutícula entre otras que involucran diferentes adaptaciones para bajar la tasa de transpiración de la planta.

La vid es una de las especies más estudiadas en relación a su EUA. Estudios realizados en esta especie permitieron determinar una gran variación de los valores de EUA entre genotipos. De acuerdo a estos resultados, para condiciones de clima árido o semiárido, Medrano et al. (2007) sugirieron seleccionar variedades con valores altos de EUA. En cereales también se han observado diferencias en relación a los valores de EUA a escala de cultivo.

La EUA permitió establecer diferencias entre especies de lotus y entre genotipos dentro de una misma especie. Muttoni (2009) puso en evidencia que en *L. corniculatus* la EUA puede ser un parámetro que permite diferenciar genotipos tolerantes y sensibles a sequía cuando el agua es limitante. De esta forma, este criterio puede ser usado como herramienta en la identificación y selección de genotipos de *Lotus* tolerantes a sequía.

**Cuadro 1.** Variabilidad genética entre especies en la eficiencia en el uso del agua (tomado de Yoo et al., 2009).

Natural genetic variation for water use efficiency. (g.kg<sup>-1</sup>)

| Species                         | WUE <sub>B</sub> | WUE <sub>i</sub> |
|---------------------------------|------------------|------------------|
| <i>C<sub>3</sub> Herbaceous</i> |                  |                  |
| <i>Abutilon theophrasti</i>     | 4.3              | 4.7              |
| <i>Anoda cristata</i>           | 4.0              | 4.2              |
| <i>Arabidopsis thaliana</i>     | 2.1 (31)         |                  |
| <i>Cassia obtusifolia</i>       | 4.0              | 4.4              |
| <i>Cucumis sativus</i>          |                  | 10.0             |
| <i>Datura stramonium</i>        | 4.4              | 4.2              |
| <i>Glycine max</i>              | 16.7             |                  |
| <i>Helianthus annuus</i>        | 1.8              |                  |
| <i>Phaseolus vulgaris</i>       |                  |                  |
| <i>C<sub>3</sub> Grasses</i>    |                  |                  |
| <i>Avena fatua</i>              | 1.2              |                  |
| <i>Hordeum vulgare</i>          | 2.8              |                  |

WUE B es la biomasa por unidad de agua utilizada  
WUE i es la medida instantánea de CO<sub>2</sub> asimilado y la transpiración

#### 6.4.2 Estimación de la EUA a través de la discriminación isotópica del $^{13}\text{C}$

La dificultad para realizar mediciones directas de eficiencia de transpiración o EUA ha limitado su uso en los programas de mejoramiento genético (Menéndez y Hall, 1996). La discriminación isotópica del  $^{13}\text{C}$  ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) puede proporcionar una medida indirecta de la EUA y ser utilizada como criterio de selección en programas de fitomejoramiento (Farquhar et al., 1982; Farquhar y Richards, 1984).

Experimentalmente se ha encontrado una relación lineal y negativa entre  $\Delta^{13}\text{C}$  y EUA. Evidencias experimentales muestran esta relación en trigo (Farquhar y Richards, 1984; Condon y Richards, 1993), cebada (Hubick y Farquhar, 1989), maní (Hubick et al., 1986), tomate (Martín y Thorstenson, 1988), algodón (Hubick y Gibson, 1993) y caupí (Ismail y Hall, 1992).

En la atmósfera el  $\text{CO}_2$  está compuesto por dos isótopos estables del carbono, el  $^{12}\text{C}$  y el  $^{13}\text{C}$ , en una proporción de 98,9 % y 1,1 %, respectivamente (O'Leary, 1981). Si bien los isótopos presentan características químicas idénticas, el hecho de que el  $^{13}\text{C}$  sea más pesado que el  $^{12}\text{C}$  da lugar a que su tasa de difusión en la hoja y asimilación por la rubisco sean más bajas respecto al  $^{12}\text{C}$ . Por esto, la proporción de  $^{13}\text{C}$  es menor en los tejidos vegetales que en la atmósfera (Acevedo et al., 1997). La composición isotópica se puede determinar por espectrometría de masa, una técnica analítica útil para determinar las diferencias de la relación masa/carga de átomos o moléculas ionizadas.

El  $\delta^{13}\text{C}$  simboliza la desviación de la concentración isotópica de  $^{13}\text{C}$  en cualquier muestra con respecto a una medida estándar, que suele ser el  $^{13}\text{C}$  contenido en la caparazón de un fósil marino (Pee Dee Belemnite, PDB o VPDB), perteneciente a una formación geológica del Cretácico en Carolina del Norte, y cuyo valor ha sido establecido por la Agencia Internacional de la Energía Atómica. La fórmula para calcular el  $\delta^{13}\text{C}$  (en ‰) es:

$$\delta^{13}\text{C} = (R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}}) - 1) \cdot 1000$$

donde  $\delta^{13}\text{C}$  es la composición isotópica de la muestra y R la relación molar del isótopo pesado sobre el liviano ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) para la muestra y el estándar (PDB).

Con el  $\delta^{13}\text{C}$  producto (tejido vegetal o planta) y considerando un  $\delta^{13}\text{C}$  fuente (aire) igual a  $-8$  ‰, se calcula el  $\Delta^{13}\text{C}$ , es decir la discriminación del isótopo  $^{13}\text{C}$ , según la siguiente fórmula:

$$\Delta = \frac{\delta_{aire} - \delta_{planta}}{1 + \delta_{planta}/1000}$$

Así, las plantas que tienen una ruta metabólica C3 presentan un valor de  $\delta^{13}\text{C}$  entre - 20 y - 35 ‰, las plantas que tienen una ruta metabólica C4 tienen un valor de  $\delta^{13}\text{C}$  entre - 9 y -17 ‰ y las plantas que tienen metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) valores de  $\delta^{13}\text{C}$  que abarcan el rango de las plantas C3 y C4 (- 10 a - 22 ‰). Basados en valores de medición isotópica del C se pueden diferenciar las plantas tipo C3 y C4, debido a las diferencias que presentan las carboxilasas, (rubisco y PEP carboxilasa) que determinan la diferencia en la difusión del  $\text{CO}_2$ .

Los isótopos del C pueden ser utilizados para evaluar los atributos relacionados con la fotosíntesis, la conductancia estomática, el potencial hídrico, la concentración de N foliar, el grosor de la hoja, la fenología y la tasa de crecimiento relativo (Farquhar y Richards, 1984; Bonal et al., 2000). Por esta razón, en algunas especies, como cebada y trigo los valores de  $\Delta^{13}\text{C}$  se pueden utilizar como criterio de selección de cultivares (Cuadro 2) en los programas de mejoramiento genético, especialmente en ambientes con ocurrencia de situaciones de déficit hídrico (Tsialtas y Tokatlidis, 2008).

**Cuadro 2.** Comparación de la EUA y de la  $\Delta^{13}\text{C}$  en variedades de trigo (Tomado de Medrano et al., 2007).

| Variedad  | EUA (g materia seca/ Kg $\text{H}_2\text{O}$ ) | $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) |
|-----------|--|---------------------------|
| Karchia   | 2,46   | 23,46                     |
| Shorawaki | 2,88   | 22,83                     |
| Pastor    | 2,99   | 21,95                     |
| Baviacora | 2,45   | 22,93                     |

Borsani et al. (2007) compararon los valores de discriminación isotópica entre cultivares de *L. corniculatus* y reportaron valores de  $\delta^{13}\text{C}$  que van desde 25,8 ‰ en condición de crecimiento normal a 20,61 ‰ luego de 15 días de déficit hídrico. El cultivar INIA Draco fue el que mostró los menores valores de discriminación en todos los tratamientos, lo que puede explicar su mayor persistencia a campo. Berriel et al. (2006) confirmaron que existen diferencias en la EUA entre especies del género *Lotus* y entre genotipos

dentro de una misma especie. La discriminación de isótopos del C que ocurre en la asimilación de CO<sub>2</sub> está relacionada positivamente con la EUA en varios cultivares, lo que la hace una técnica precisa para evaluar este parámetro en distintos genotipos (Shao et al., 2008). El valor de  $\Delta$  puede ser utilizado como criterio de selección en mejoramiento, su utilización depende de algunos requisitos, por ejemplo, debe existir variabilidad genética, debe estar estrechamente relacionado a la producción, tener alta heredabilidad y ser de fácil determinación (Muttoni, 2009).

### **6.5 Emisión de fluorescencia del fotosistema II como indicador de estrés**

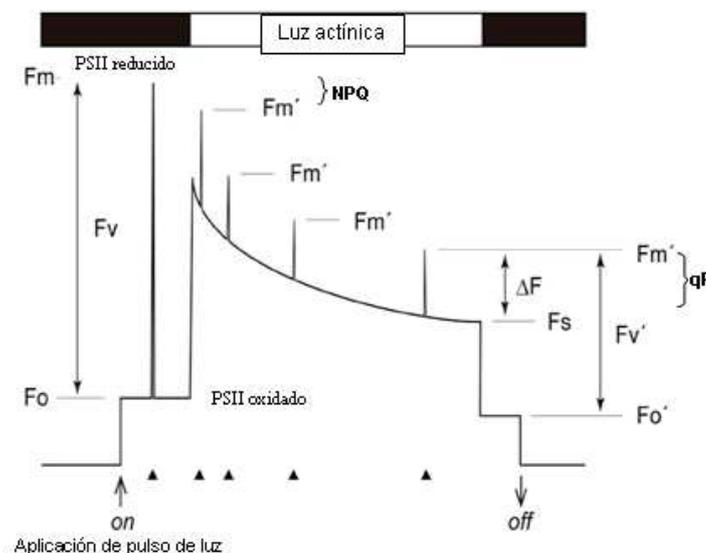
La energía absorbida por una molécula de clorofila hace que un electrón eleve su energía y pase del estado basal al estado excitado. Esta energía absorbida tiene tres destinos posibles: la generación de energía fotoquímica, la generación de calor cuando el electrón vuelve a su estado basal sin emisión de fotones y la emisión de un fotón de mayor longitud de onda que la absorbida, lo que se conoce como fluorescencia. Cualquiera de los tres procesos tiene como consecuencia la disipación de la energía absorbida y constituyen las vías de canalización de la energía que funcionan en forma complementaria (Maxweell y Johnson, 2000).

La fluorescencia de las clorofilas es una herramienta para evaluar distintos estreses medioambientales que afectan a la fotosíntesis como las altas y bajas temperaturas, falta de agua, exceso de luz, entre otros (Pérez et al., 2007). La fluorescencia de la clorofila provee información acerca de la integridad del aparato fotosintético y da una rápida referencia acerca de la tolerancia de las plantas frente al estrés (Percival y Sheriffs, 2002).

Cuando una hoja es adaptada a la oscuridad durante varios minutos y luego se la somete a una intensidad lumínica saturante, se observa que la intensidad de la fluorescencia varía según una cinética particular. Inicialmente se produce un aumento rápido de la intensidad de la fluorescencia, seguido de un descenso a un estado estacionario (Fig. 7). Estos cambios se conocen como inducción de fluorescencia y transición de fluorescencia o efecto Kautsky (Kautsky et al., 1960).

La fluorescencia aumenta desde  $F_0$ , valor inicial, hasta  $F_m$ , valor máximo debido a cambios en el rendimiento del proceso de la fotosíntesis. Los parámetros  $F_0$  y  $F_m$  permiten calcular la eficiencia cuántica máxima del PSII que está dada por la relación  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ . En hojas sanas, independientemente de la especie, ese valor es cercano a 0,86.

La sequía puede producir degradación de pigmentos y generar un daño irreversible en el aparato fotosintético. Por esto la estabilidad de las clorofilas es un indicador de la tolerancia de las plantas al estrés (Terzi y Kadiolu, 2006) y la emisión de fluorescencia de la clorofila, aunque aporte evidencias indirectas, tiene ventajas por es una técnica sensible, en tiempo real, no invasiva y relativamente simple. Además, el desarrollo de fluorímetros portátiles ha posibilitado estudios en condiciones de campo, como los realizados por Méthy et al. (1994) sobre el manejo de las masas forestales en el área mediterránea.



**Figura 7.** Parámetros definidos a partir de la emisión de fluorescencia.  $F_0$ : Fluorescencia basal (hoja adaptada a oscuridad);  $F_m$ : Fluorescencia máxima (hoja adaptada a oscuridad),  $F_v/F_m$ : Eficiencia cuántica máxima de la fotoquímica del PSII ( $(F_m - F_0)/F_m$ ),  $F_s$ : Rendimiento de fluorescencia en estado estacionario,  $m'$ : Fluorescencia máxima de la muestra adaptada a luz,  $qP$ : Coeficiente de *quenching* fotoquímico  $(F_m' - F_s)/(F_m' - F_0)$ ,  $qNP$ : Coeficiente de *quenching* no fotoquímico  $(F_m - F_m')/(F_m - F_0)$ ,  $NPQ$ : *quenching* no fotoquímico  $(F_m - F_m')/F_m'$ .

Cuando se comparó la emisión de fluorescencia del PSII en genotipos de arroz Japónica e Indica, en relación al efecto del frío durante 48 h, Bonnacarrère et al. (2011) encontraron que el parámetro  $F_v/F_m$  descendió en los dos, pero fueron afectados en forma diferente. Cuando fueron sometidas a baja temperatura las plantas de arroz Japónica, de clima templado, tuvieron descenso de los valores de fluorescencia menor a los determinados en arroz de tipo Indica, de clima tropical.

Para especies del género *Lotus* la relación  $F_v/F_m$ , en condiciones normales, se encuentra entre 0,85 y 0,87, y la misma se reduce en plantas estresadas o dañadas a valores cercanos a 0,80 (Borsani et al., 2007). De todas formas, la funcionalidad del fotosistema II en *Lotus* sp. y *Trifolium pratense* en respuesta

a sequía es muy variable entre genotipos (Borsani et al., 2008), por esto, el valor Fv/Fm podría no resultar un buen indicador para evaluar la tolerancia-sensibilidad al déficit hídrico en estas especies.

Sainz et al. (2010) determinaron el valor de la fluorescencia Fv/Fm en *L. japonicus* en distintas condiciones de estrés. Cuando las plantas fueron sometidas a déficit hídrico y alta temperatura en forma simultánea se observó un descenso en el valor Fv/Fm, que evidencia un descenso de la eficiencia del PSII. Sin embargo en treinta especies leñosas, Percival y Sheriff (2002) estudiaron en forma exhaustiva la correlación entre los valores de fluorescencia en cada especie con la tolerancia al déficit hídrico, y propusieron que la emisión es un buen indicador de la tolerancia al déficit hídrico en esas especies.

## **6.6 Defensa antioxidante enzimática en respuesta al déficit hídrico**

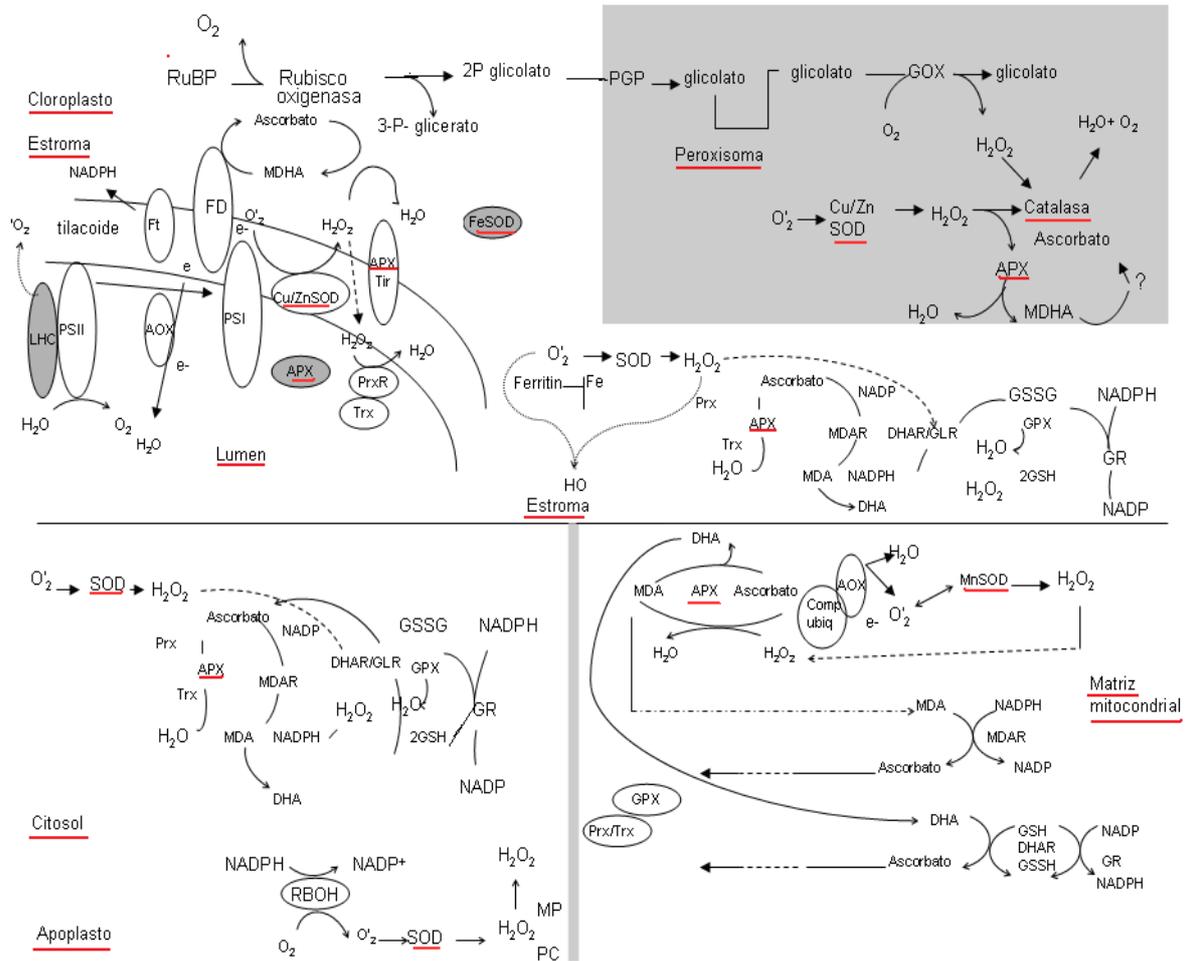
### **6.6.1 Generación de especies reactivas del oxígeno en plantas**

Las plantas están expuestas a cambios ambientales relacionados con el fotoperíodo, intensidad de luz, disponibilidad de nutrientes, situaciones de sequía o inundación y temperaturas elevadas que afectan su crecimiento y desarrollo (Wrzaczek et al., 2010). Tanto el estrés biótico como el abiótico pueden conducir a la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) en diferentes compartimentos celulares (Jaspers y Kangasjärvi, 2010). Los organelos con alta actividad metabólica y flujo de electrones como el cloroplasto y la mitocondria son los que producen mayor cantidad de ERO (Mittler et al., 2004) (Fig. 8).

Las ERO tienen una doble acción, por un lado participan como reguladores del proceso de desarrollo de la planta, en transducción de señales hormonales, modulación del estado redox y sobre la pared celular, pero en altas concentraciones son tóxicas (Susuki y Mittler, 2006) y producen alteraciones enzimáticas, daño a membranas celulares e inducen mutaciones.

En particular, el estrés por sequía inhibe la actividad fotosintética debido al desbalance entre la captura de la luz y su utilización (Foyer y Noctor, 2000). El desbalance en la utilización de energía a nivel del cloroplasto trae como consecuencia otro destino para la disipación de la energía de los electrones en el PSII, que se orienta a un aumento de la fotorrespiración y a la generación de ERO (Reddy et al., 2004).

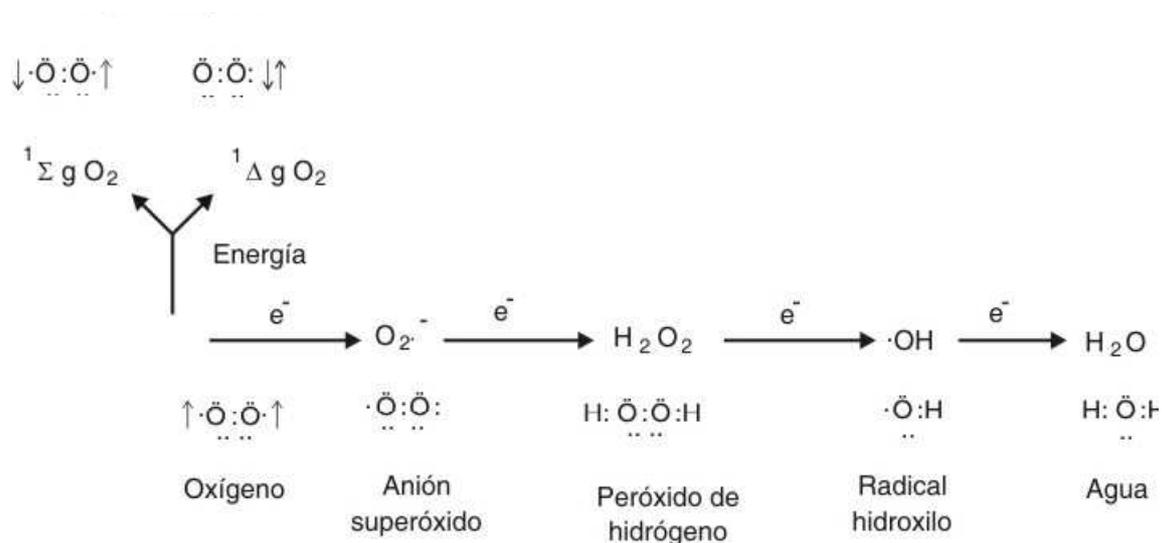
Cuando el equilibrio entre la producción y la eliminación de ERO es perturbado, se produce estrés oxidativo, una consecuencia inevitable de la vida aerobia, ya que las ERO se forman siempre que el oxígeno molecular oxida a transportadores de electrones (Asada, 1994). En la figura 10 se representan las ERO oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ).



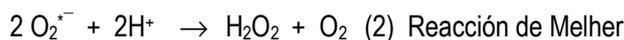
**Figura 8.** Generación de ERO y vías de detoxificación en la célula vegetal. Abreviaturas de interés: FeSOD, SOD férrica, CuZnSOD. Glutación peroxidasa (GPX), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), dehidroascorbato, DHAR, dehidroascorbato reductasa, GR, glutación reductasa, GSH, glutación reducida, GSSG glutación oxidada, MDA, monodehidroascorbato, MP, membrana plasmática, PSI fotosistema I, PSII fotosistema II, Rubisco RuBP, Tomado de Miller et al. (2010).

Durante la iluminación excesiva la clorofila puede ser excitada al estado triplete y volver al estado basal. Su energía de excitación se puede transferir al  $O_2$  llevándolo desde el estado basal (triplete) al estado singulete (Fig. 9). En este estado los electrones tienen espín antiparalelos lo que hace a la molécula altamente reactiva, y puede oxidar a las clorofilas (Mittler et al., 2004).

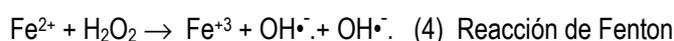
**Figura 9.** Especies reactivas del oxígeno. El oxígeno puede ser excitado generando oxígeno singlete, o ser reducido a anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. La reducción completa de  $O_2$  a  $H_2O$  requiere cuatro electrones, e implica la formación de los mencionados intermediarios de reducción.



La reducción monovalente del oxígeno a nivel del fotosistema I donde la ferredoxina (Fd red) le transfiere un electrón (Fig. 9 cuadrante superior izquierdo) y (reacción 1) produce el radical superóxido que luego se dismuta para formar  $H_2O_2$  (reacción 2) proceso conocido como reacción de Mehler (Foyer et al., 1994).



El  $H_2O_2$  producido es removido principalmente por la enzima ascorbato peroxidada (APX), que utiliza el ácido ascórbico como sustrato. Esta reacción produce una forma oxidada del ácido ascórbico, el monodehidroascorbato (MDHA) y agua, secuencia de reacciones conocidas como "ciclo agua-agua" (Mittler, 2002). El  $H_2O_2$  es relativamente estable y menos reactivo que el  $OH^{\cdot-}$  y el  $O_2^{\cdot-}$ . Aunque el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $H_2O_2$  pueden dañar componentes celulares directamente, su principal toxicidad reside en su conversión a  $OH^{\cdot-}$  en presencia de metales de transición por medio del ciclo de Haber-Weiss (reacciones 3 y 4).



En condiciones normales de crecimiento, la producción de ERO en la célula es baja, de alrededor de  $240 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  de  $O_2^{\cdot-}$  y a un nivel constante  $0,5 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  de  $H_2O_2$  en los cloroplastos. Sin

embargo muchos factores de estrés alteran la homeostasis celular y se producen, incrementos de ERO de 240 a 720  $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1} \text{O}_2^{\bullet-}$  y un nivel estacionario de 5,15  $\mu\text{ms}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  (Mittler, 2002). El transporte de electrones en la cadena respiratoria, también contribuye con el aporte de electrones que incrementarán el nivel de ERO (figura 9, cuadrante inferior derecho).

Además de las ERO, recientemente se comprobó que las células vegetales pueden generar radicales libres como el óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) y sus derivados, el S-nitrosoglutatión (GSNO), el dióxido de nitrógeno ( $\bullet\text{NO}_2$ ) y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\bullet$ ), denominados colectivamente especies reactivas del nitrógeno, que se las ha vinculado con la respuesta frente a diversos estreses ambientales (Airaki et al., 2011).

### 6.6.2 Enzimas relacionadas a la defensa antioxidante: SOD, CAT y APX

Las plantas tienen mecanismos de protección enzimáticos y no enzimáticos que inactivan eficientemente las ERO. Entre las enzimas que participan en la detoxificación de ERO en plantas se encuentra la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX) y la catalasa (CAT). En la célula, el balance de la actividad entre SOD, APX y CAT, es crucial para mantener niveles constantes de radicales  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La SOD es el principal componente de la defensa antioxidante enzimática, dismuta el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$  (Pan et al., 2006). Al eliminar el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  disminuye el riesgo de formación del radical  $\text{OH}^\bullet$ . La SOD está presente en todos los organismos aeróbicos, y en todos los compartimentos celulares susceptibles al estrés oxidativo (Bowler et al., 1992) (Fig. 9). En las especies del género *Lotus* se identificaron como parte de la respuesta antioxidante enzimática tres isoformas SOD: la MnSOD, la Cu-Zn SOD y la FeSOD, con la inducción de una nueva isoforma Cu-ZnSOD en respuesta a estrés hídrico (Borsani et al., 2001). En *L. corniculatus* el incremento del radical superóxido en condiciones de estrés hídrico, se acompaña de incrementos de la expresión del gen de la superóxido dismutasa y de la actividad Cu-Zn SOD en hojas (Borsani et al., 2001).

Los diferentes niveles de actividad de SOD dependen de la intensidad y período del estrés, de la especie o genotipo, de las condiciones de crecimiento y edad de la planta (Sgherri et al., 2000). Se ha reportado que la sobreproducción SOD aumenta la tolerancia de las plantas al estrés oxidativo (Sharma et al., 2011). Gill y Tuteja (2010) evaluaron el efecto del estrés hídrico en cloroplastos de hojas de *Trifolium*

*repens* y comunicaron un significativo aumento de la actividad de la SOD cuando se somete a déficit hídrico.

Entre las enzimas que degradan el  $H_2O_2$  en plantas se encuentran la catalasa (CAT) y la ascorbato peroxidada (APX). La CAT se localiza principalmente en peroxisomas (Fig. 9) y responde positivamente a tratamientos con alta intensidad lumínica, infección por patógenos y daño mecánico. La enzima cataliza la dismutación del  $H_2O_2$  dando como producto dos moléculas de agua y oxígeno. Una molécula de CAT es capaz de convertir aproximadamente 6 millones de moléculas de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  por minuto (Gill y Tuteja, 2010). La CAT constituye una defensa antioxidante enzimática importante en este contexto, ya que hay poca enzima y en el cloroplasto y la mitocondria, se genera gran cantidad de  $H_2O_2$ . (Halliwell y Gutteridge, 2006). En angiospermas hasta la fecha se han identificado tres genes de CAT. Se ha propuesto la clasificación de los genes según su perfil de expresión en plantas de tabaco. Los de la clase I se expresan en tejidos que fotosintetizan y que son expuestos a la luz, los de la clase II se expresan en alto niveles en tejidos vasculares y los de la clase III son abundantes en semilla (Sharma et al., 2012). En maíz, las tres isoformas se encuentran en cromosomas separados y son expresadas y reguladas en forma independiente (Gill y Tuteja, 2010). En plantas transgénicas de *Brassica juncea* que sobreexpresan genes para la CAT, se ha visto una mayor tolerancia al estrés oxidativo inducido por cadmio (Sharma et al., 2012). Gill y Tuteja (2010) reportaron diversos ejemplos de plantas transgénicas relacionados a las variaciones en la actividad CAT en diversas condiciones de estrés abiótico.

La APX, y una variedad de otras peroxidases catalizan la ruptura del  $H_2O_2$ . La APX, que cataliza la reducción del  $H_2O_2$  utilizando ascorbato (Fig. 9) se encuentra en la mayoría de los tejidos vegetales, y en los cloroplastos bajo dos formas, una unida a la membrana tilacoidal y otra soluble en el estroma. La forma citosólica de la APX es poco frecuente en vegetales. Basados en la secuencia de aminoácidos se identifican 5 familias de isoenzimas de APX con diferente localización subcelular en plantas superiores. Se considera que esta enzima tiene mayor afinidad por el  $H_2O_2$  que la CAT (Sharma et al., 2012).

Gill y Tuteja (2010) reportaron aumento de la actividad de la APX en condiciones de estrés hídrico en tres cultivares de *Phaseolus vulgaris* y en *P. asperata*, y en condiciones de estrés salino también aumentó la actividad de la APX. En *Nicotiana tabacum* que sobreexpresan APX en cloroplastos se ha observado una mejora de la tolerancia al estrés hídrico y salino. En plantas de maíz y frutilla sometidas a

bajas temperaturas, se observó un aumento de la capacidad antioxidante a través del incremento de la actividad de las enzimas SOD y APX. Pero en el caso de un estrés prolongado la sobreproducción de ERO no logró ser removida y se produjo daño severo, incluso la muerte de plantas (Sharma et al., 2012).

### 6.6.3 Estimación del daño oxidativo

Las ERO pueden actuar sobre proteínas, bases del ADN y lípidos de la membrana afectando distintas funciones celulares (Gomathi y Rakkiyapan, 2011). La acción de las ERO sobre las proteínas, produce la oxidación en forma irreversible de los aminoácidos, arginina, prolina, lisina y triptófano, y se produce la carbonilación directa de las proteínas por la oxidación de dichos aminoácidos. Además, independientemente de la localización de las ERO y el lugar de su síntesis, éstas tienen como blanco las proteínas que contienen grupos sulfuro en los aminoácidos y grupos tiol, de acuerdo a esto, la cisteína y la metionina reaccionan con el  $O_2^{\bullet-}$  y el  $OH^{\bullet}$  (Gill y Tuteja, 2010).

Se ha reportado el daño directo del  $OH^{\bullet}$  sobre los componentes del ADN a través de la delección o rotura directa de las cadenas, o por efecto de la oxidación de bases. Como consecuencia, se puede interrumpir la transcripción y por lo tanto la síntesis proteica y pueden afectarse procesos relacionados a la fotosíntesis y al desarrollo de la plantas (Gill y Tuteja, 2010). Debido a que también se pueden generar daños en la membrana, otra forma de estimar el daño oxidativo es medir la fuga de electrolitos, que da la pauta de la integridad de la membrana. En genotipos de arroz Indica, que corresponde al tipo tropical con mayor sensibilidad al frío, Bonnacarrère et al. (2010) encontraron daños mayores que en arroces tipo Japonica de clima templado, cuando son sometidos a bajas temperaturas.

Los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos de membrana son susceptibles a las ERO, induciendo la peroxidación de los lípidos que generan aldehídos, alquenos, hidroxialquenos, incluyendo el malonaldehído (MDA) que es un compuesto citotóxico, y el 4 hidroxil-2 nonenal. Los dos productos finales se miden a través de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). El radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) es un oxidante muy potente y por esto una de las especies con mayor toxicidad debido a que reacciona rápidamente con las biomoléculas (Lamb y Dixon, 1997). El  $OH^{\bullet}$  puede iniciar la peroxidación de lípidos a partir de la sustracción de un átomo de hidrógeno a los ácidos grasos insaturados; esto da lugar a una reacción en cadena que pasa por la formación de radicales peroxilo y finalmente conduce a la formación de hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Los dobles enlaces conjugados de los LOOH disminuyen la fluidez de las

membranas (Schraudner et al., 1997). El radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) también puede iniciar la peroxidación de lípidos (Kangasjärvi et al., 2005).

Los trabajos realizados sobre el impacto de la peroxidación de lípidos en el metabolismo de las plantas se han centrado en reacciones en cloroplastos, y sobre los sistemas antioxidantes presentes en ese organelo (Blokhina et al., 2003). También se ha evaluado el daño de membrana a través de diferentes aproximaciones, como ser la cuantificación de la pérdida de electrolitos. En estrés térmico por bajas temperaturas se compararon dos genotipos de arroz, Indica y Japónica, y en ambos aumentó la peroxidación de lípidos, con mayor daño en el arroz de tipo tropical, también se determinó el daño a nivel de la membrana a través de la cuantificación de la fuga de electrolitos. El arroz tipo Indica, adaptado a condiciones de clima tropical, tuvo un daño a nivel de membrana 6 veces mayor que los arroces de tipo templado (Bonnecarrère et al., 2010).

En condiciones de sequía, en hojas de *Pisum sativum* se observó un incremento de 2 a 4 veces en la peroxidación de lípidos y proteínas (Gill y Tuteja, 2010) y en hojas de *L. japonicus* y un mutante de *L. japonicus* deficiente en GS citosólica, Díaz et al. (2010) obtuvieron diferencias significativas en la acumulación de TBARS entre ambos genotipos, y un mayor nivel de TBARS en el mutante, que acumula menos prolina. Sainz (2009) evaluó el efecto del estrés hídrico y térmico en la peroxidación de lípidos en hojas de *Lotus japonicus* (Gifu) y *L. corniculatus* (cv San Gabriel) a través de la cuantificación de los TBARS. Lo mismo se encontró en *L. japonicus* sometido tanto a estrés hídrico como salino (Díaz et al., 2005), en el cual ambos genotipos acumularon TBARS en la condición de estrés mencionada. Por estas razones, los TBARS pueden ser usados como indicadores de daños oxidativo de fosfolípidos de membrana (Borsani, et al., 2001), y su acumulación es consecuencia del daño producido por las ERO así como por una insuficiente actividad de enzimas detoxificadoras, como la SOD, entre otras.

**II OBJETIVOS****Objetivo general**

Generar variabilidad genética en especies de cultivadas del género Lotus para ampliar la base disponible de materiales forrajeros.

**Objetivos específicos**

1. Obtener híbridos interespecíficos entre materiales contrastantes en su respuesta frente al déficit hídrico.
2. Evaluar estrategias para la identificación de híbridos en forma masiva.
3. Buscar mecanismos de tolerancia/susceptibilidad al déficit hídrico a través de parámetros fisiológicos y bioquímicos mediante el uso de los híbridos.
4. Evaluar la tolerancia de los híbridos frente a sequía en condiciones de campo.

### III MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Material vegetal

Como parentales se usó *Lotus uliginosus* (4x) línea experimental LE 205, seleccionado de "pastizales Maku" cultivado para producción de semillas en el INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay) y *L. corniculatus* (4x), línea experimental LE 352, seleccionado de 'INIA Draco'. Para definir los microsatélites (SSR) adecuados para estimar polimorfismo entre los parentales y los híbridos se usaron las especies de *Lotus* que figuran en la Cuadro 3. Como estándares para la determinación del valor C por citometría de flujo se usó *Solanum lycopersicum* cv "Stupické" y *Zea mays* cv CE-777 cedidos por Doležel (Olomuc, República Checa).

**Cuadro 3.** Material vegetal utilizado para la selección de los marcadores polimórficos.

| Especie                        | Genotipo o cv   |
|--------------------------------|-----------------|
| <i>Lotus japonicus</i>         | Gifu            |
| <i>Lotus japonicus</i>         | MG20            |
| <i>Lotus uliginosus</i> (2x)   | LE116           |
| <i>Lotus uliginosus</i> (4x)   | Maku            |
| <i>Lotus corniculatus</i> (4x) | Draco           |
| <i>Lotus corniculatus</i> (4x) | San Gabriel     |
| <i>Lotus corniculatus</i> (4x) | LE 212          |
| <i>Lotus filicaulis</i>        | PI 214114(USDA) |

#### 2. Cruzamientos

##### 2.1 Comprobación de autoincompatibilidad de los parentales

Las especies utilizadas como parentales fueron mantenidas en un invernáculo, aisladas de insectos polinizadores. Al menos 20 flores por genotipo de ambas especies fueron autofecundadas dos veces con un pincel para comprobar la autoincompatibilidad. Luego de confirmada esta característica se realizaron los cruzamientos en forma manual.

##### 2.2 Cruzamiento para la obtención de híbridos interespecíficos

Los genotipos de las especies utilizadas como parentales fueron mantenidos en un invernáculo aislado de insectos polinizadores. Para recoger el polen se disecaron los pétalos de la quilla con una pinza y se colectó entre las 12 y 14 h después de la apertura de la flor. El polen colectado de 60 plantas

de *L. corniculatus* se usó para polinizar con pincel flores de 4 plantas de *L. uliginosus* (PI 1, PI 2, PI 3 y PI 4). Para esto el polen se colocó sobre el estigma de flores de las plantas seleccionadas como progenitor femenino, de manera de saturarlo en forma exógena con el polen recién cosechado. No se recurrió al uso de productos químicos para evitar la caída de flores. La punta de la rama que tuvo las flores donde se realizó la polinización cruzada, fue etiquetada. El éxito o el fracaso del cruzamiento se siguieron a través del desarrollo de las pequeñas vainas delgadas que se hicieron visibles 2 a 4 días después de la polinización. Cuando se usó *L. corniculatus* como madre, se polinizó con *L. uliginosus* (cruzamiento recíproco). El ajuste de la metodología de los cruzamientos, la realizó la Ing. Agr. Mónica Rebuffo, INIA La Estanzuela.

### 2.3 Rescate de embriones

Entre los 15 y 18 días después de realizada la polinización, se sembraron las semillas inmaduras de vainas provenientes de los cruzamientos interespecíficos. Las vainas se esterilizaron 15 min en hipoclorito de sodio 20 % (v/v) en agua destilada con dos gotas de Tween 20 cada 200 mL. Después de enjuagadas tres veces en agua destilada estéril, las vainas se abrieron con bisturí en cámara de flujo laminar y las semillas inmaduras se sembraron *in vitro* medio de cultivo de Murashige - Skoog (1962) solidificado con 8 g / L de agar Sigma. A los 10 días se retiraron los embriones y se colocaron en placas de Petri con 20 mL del mismo medio, y permanecieron 48 h en cámara de crecimiento a 24 °C en condiciones de oscuridad. Pasado ese período, el crecimiento se realizó durante 7 días con una intensidad de luz de  $15 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , y un fotoperíodo de 16 h luz, y a partir de ese momento la intensidad luminosa fue de  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Las plantas desarrolladas a partir de embriones se sembraron en macetas con sustrato turba (Tref.P4) y se mantuvieron en invernáculo durante 30 días, los primeros 15 días cubiertas con nylon para evitar la deshidratación, y después comenzó la ventilación en forma gradual. Finalizada la aclimatación las plantas se mantuvieron regadas con agua y Magnum P44 (nitrógeno 14 y fósforo 44). De cada embrión se conservó una copia *in vitro*, que se repicó cada 30 días en el mismo medio, y permanecieron en la cámara de crecimiento en las mismas condiciones. Cada individuo fue identificado indicando el cruzamiento que le dio origen.

## 2.4 Confirmación de los híbridos

Las plantas obtenidas como resultado de los cruzamientos ( $F_1$ ) presentaron un fenotipo similar a la madre, por lo tanto se recurrió a técnicas que permitieran la identificación de los híbridos. Para esto se usaron dos metodologías, la citometría de flujo y marcadores moleculares.

### 2.4.1 Estimación del tamaño del genoma mediante citometría de flujo

Las determinaciones del valor C se llevaron a cabo en el Servicio de Citometría de Flujo del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (SECIF-IIBCE). Las suspensiones nucleares se prepararon de acuerdo a Doležel et al. (2007). Aproximadamente 60 mg de tejido de cada hoja fueron finamente picados con hoja de afeitar en una placa de Petri de vidrio con 500  $\mu$ L de buffer Otto I (Otto, 1990), 0,1 M de ácido cítrico y 0,5% v/v de Tween 20, a 4°C.

Como estándar para las determinaciones del contenido de ADN se usó *Solanum lycopersicum* (2C pg = 1,96; Doležel et al., 1992) y *Zea mays* (2C pg = 5,43; Lysak y Doležel, 1998). Las suspensiones nucleares se filtraron (tamaño de poro 50  $\mu$ m) e incubaron en 500  $\mu$ L de buffer Otto II (Otto, 1990), 0,4 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Las muestras fueron teñidas con yoduro de propidio (IP) 50 mg/mL (Sigma) y tratadas con ARNasa 50 mg/mL (Sigma) durante 10 min, protegidas de la luz. Se utilizó un citómetro de flujo FACSVantage (Becton Dickinson) con un láser Innova 300 (Coherent) ajustado para emitir a 488 nm con una potencia de 100 mW. La fluorescencia emitida por el IP fue colectada con un detector FL2 con un filtro de banda 575/26 nm. Las mediciones citométricas se llevaron a cabo utilizando una boquilla de 70  $\mu$ m. El citómetro de flujo se calibró inicialmente con eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído (Chicken Red Blood Cells o CRBC; Sigma) y luego con el Kit QC particles (Becton Dickinson) para optimizar la detección de fluorescencia, la linealidad del instrumento y delimitar los dobletes. Los análisis se efectuaron con el programa CellQuest (Becton Dickinson) considerando los siguientes parámetros: dispersión frontal o Forward Scatter (FSC-H), dispersión lateral o Side Scatter (SSC-H), el área del pulso (FL2-A) y el ancho del pulso o duración de emisión de fluorescencia (FL2-W). El gráfico FL2-A versus tiempo se utilizó como control del nivel de emisión de fluorescencia durante el análisis de cada muestra. Los dobletes fueron excluidos del análisis delimitando la región de núcleos individuales en gráficos FL2-A versus FL2-W. Para cada planta madre, padre o híbridos, determinó 3 veces el contenido de ADN ( $n = 5.000$  núcleos/análisis) en 3 días distintos, para minimizar las variaciones debidas a la calibración del

instrumento o la preparación de las muestras. El contenido de ADN nuclear se calculó como (media del pico G1 de la muestra / media del pico G1 del estándar) x 2C, contenido de ADN del estándar, en pg.

#### **2.4.2 Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares utilizados fueron microsatélites obtenidos en el proyecto de secuenciación del genoma de *Lotus japonicus* (2x) MG20/B129 (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>) en coordinación con Neils Sandal de la Universidad de Dinamarca. Los cebadores diseñados con este propósito figuran en la cuadro 4. El ADN de plantas se aisló con el kit para extracción y purificación de ADN genómico (Fermentas Life Science, CA). La concentración de ADN se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, EEUU). La amplificación del ADN se hizo en un volumen final de 20 µl que incluyó: 5 µL de ADN (aproximadamente 80 ng), 2 µL de tamón (75 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% de Tween 20, 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>), 0,8 µL de dNTPs 0,2 mM y 0,2 µL (1 U) de Taq polimerasa (Fermentas Life Sciences, CA). La amplificación consistió de: desnaturalización de 3 min a 94 °C, 40 ciclos de 15 seg a 94 °C, 20 seg a 55 °C, 30 seg a 72 °C y extensión final de 7 min a 72 °C. La evaluación de la amplificación se hizo por electroforesis con gel de agarosa al 1,6 % en buffer TBE 1X y el ADN se visualizó por tinción con bromuro de etidio (Sambrook et al., 1989). El análisis de los productos de amplificación se hizo en geles de poliacrilamida al 8%, no desnaturalizantes, y se tiñeron con AgNO<sub>3</sub> según Tixier et al. (1997).

### **3. Determinaciones analíticas para la evaluación fenotípica de los híbridos de la F<sub>1</sub>**

Para evaluar el fenotipo de los híbridos en la F<sub>1</sub> se consideraron parámetros de desarrollo vegetativo y reproductivo. Las plantas crecieron en macetas de 1 L con sustrato Tref PP4 (Tref EGO Substrates B.V.) en condiciones de invernáculo durante 12 meses. En la F<sub>1</sub> se analizó la morfología de hoja y porte de la planta. En el mismo material se evaluó la fertilidad para lo que se realizó una policruza en forma manual entre las plantas híbridas y se determinó el número de flores y semillas por planta, y la fertilidad del polen.

Para determinar la fertilidad se colectó polen de 1 a 3 flores de cada planta en horas tempranas de la mañana, se conservó 4 °C, y se colorearon con acetocarmín y/o *cotton blue* según Vižintin y Bohanec (2004). Se consideraron fértiles a los granos redondos y coloreados, y estériles a los huecos y

sin color. Se contaron los granos presentes en 5 campos del microscopio, al azar, y se tomó el promedio de los conteos por muestra. Además, en el 20 % de las plantas se hicieron 3 conteos.

**Cuadro 4.** Cebadores. Se indica el número de cromosoma del microsatélite y el tamaño en kb del producto de amplificación esperado en *L. japonicus* MG20/B129, según la base de datos (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>).

| Cebador      | Secuencia ( 5' → 3' )              | Cromosoma     | Producto esperado (kb) |
|--------------|------------------------------------|---------------|------------------------|
| TM0304-fw    | CGTTCTCTGGGAACTTATGAC              | 2             | 127-115                |
| TM0304-rv    | ATTTGTTGTGTGCACTCAGG               |               |                        |
| TM1150-fw    | ATCCAGAACTCCATCCAAG                | 2             | 156-162                |
| TM1150-rv    | TCGTTTTCAAACGTGCATCG               |               |                        |
| TM1335-fw    | ATTAGACCACCACGGGCTGC               | 4             | 153-155                |
| TM1335-rv    | CCAAAGTTACTCAATGTAGCG              |               |                        |
| TM0360-fw    | CATGCTTGAATGTTACTGC                | 2             | 113-95                 |
| TM0360-rv    | GTGTATTGGATGTTATGGGG               |               |                        |
| TM0127-fw    | CACATTGCGTTTGAAACTCG               | 3             | 131-119                |
| TM0127-rv    | GGTTCTGCTCAGCTTCGGTG               |               |                        |
| TM0197-fw    | CATTCACATGTCATTGGACC               | 4             | 121-119                |
| TM0197-rv    | TTAGATCGAGTTCGAGGGAG               |               |                        |
| TM0142-fw    | CACATACACATTTGCCGAAG               | 3             | 140-132                |
| TM0142-rv    | CGCTTGCAAGTATTCTAACC               |               |                        |
| TM0744-fw    | CCCAGTGTTACATTACAGAGC              | 5             | 111-138                |
| TM0744-rv    | TTGTTCTGAAAATCCAGGTC               |               |                        |
| TM0756-fw    | GCACCTACCAAATAAACAGC               | 6             | 128-143                |
| TM0756-rv    | CTCCCATTGAACGCCTTGAC               |               |                        |
| *EH380069-fw | GCT TCT TTC CTT GTT TGA ACA T      | No disponible | No disponible          |
| *EH380069-rv | AAG CAA AAG AAA AGT AAA ATA TGC AT | No disponible | No disponible          |

\* EH 380069: secuencia facilitada por el Dr. Neil Sandal (Universidad de Dinamarca). La secuencia de este microsatélite corresponde, en la base de datos del NCBI, a parte de un gen que codifica para una enzima que de la síntesis de taninos condensados.

### 3.1 Crecimiento de las plantas

El material vegetal usado para las determinaciones analíticas fueron plantas obtenidas a partir de estacas uninodales. Se sembraron 5 estacas por maceta que contenían arena:vermiculita (1/1) estéril. Se usaron 10 macetas (unidad experimental) para cada genotipo: H1-6 y H1- 87, *L. uliginosus* y *L.*

*corniculatus*. Las plantas se regaron con solución nutritiva Hornum (Handberg y Stougaard, 1992) que contiene, en mM:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,2;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 1,4;  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , 0,7;  $KNO_3$ , 8,0; y en  $\mu M$ : Fe-NaEDTA, 54;  $H_3BO_3$ , 19,4;  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , 5,4;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 1,6;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,4;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0,3. Las condiciones de cultivo en cámara de crecimiento durante unos 30 días (hasta 6 folíolos desarrollados) fueron:  $250 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$  de intensidad lumínica (lámparas de halogenuro metálico frío), fotoperíodo de 16 h/8 h (luz/oscuridad), a 22 °C y con humedad relativa ambiente promedio de 50 %.

Se definieron 3 condiciones de estrés: hídrico, térmico e hídrico más térmico, en cuatro tratamientos, incluido el control, que se presentan en el cuadro 5.

**Cuadro 5.** Tratamientos generadores de estrés aplicados a las plantas.

| Tratamiento | Tratamientos de estrés  |
|-------------|---|
| 1           | Control: plantas con riego, a 22 °C.                                    |
| 2           | Suspensión del riego 7 días, a 22 °C.                                   |
| 3           | Con riego, con período de 3 h a 40 °C en los días 3, 5 y 7.             |
| 4           | Suspensión del riego, con período de 3 h a 40 °C, en los días 3, 5 y 7. |

### 3.2 Extracción y cuantificación de prolina

La extracción de prolina se realizó según Charest y Phan (1990). Se maceró 0,1 g de muestra en 2 mL de metanol-cloroformo-agua (MCA) en una relación 12:5:1. El homogenado se centrifugó a  $5.000 \times g$  2 min a temperatura ambiente, se recogió el sobrenadante y al precipitado se le adicionaron 2 mL de MCA, se agitó 1 min, se repitió la centrifugación y se juntó este sobrenadante con el anterior. Se adicionó 1 mL de cloroformo y 1,5 mL de agua y se centrifugó a  $5.000 \times g$  1 min. En la fase superior, acuosa, se determinó la prolina.

La prolina se cuantificó según Troll y Lindsley (1955). A la fase acuosa se le agregaron 4 mL de ácido acético y 4 mL de ninhidrina ácida, consistente en  $H_3PO_4$  6 M, ácido acético 12,6 M y ninhidrina 0,14 M. Se usaron tubos con tapón de rosca que se calentaron a 90 °C en baño de agua 1 h y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. A cada tubo se le adicionaron 4 mL de tolueno, se agitó 5 min y se dejó decantar al menos 8 h, hasta la separación de dos fases. La prolina se cuantificó en la fase superior

(tolueno) mediante determinación de la absorbancia a 515 nm. Como estándar se usó L-prolina, con la que se construyó una curva patrón entre 0 y 120 nmol/mL.

La prolina se determinó a los 7 días, en folíolos de 3 plantas de cada tratamiento, indicados en el cuadro 5, tomadas al azar. La unidad experimental fue la maceta.

### 3.3 Cuantificación de clorofilas a y b

En la fase acuosa (inferior) obtenida de la extracción de prolina (3.2) se determinó la concertación de clorofila a y b. Las clorofilas se determinaron en folíolos de las plantas según Wellburn (1994), para lo que se leyó la absorbancia a 665,6 nm (clorofila a) y a 647,6 nm (clorofila b) y se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila a} = 11,47 \times (\text{Abs } 665.6) - 2,00 \times (\text{Abs } 647.6)$$

$$\text{Clorofila b} = 21,85 \times (\text{Abs } 647.6) - 4,53 \times (\text{Abs } 665.6)$$

### 3.4 Pérdida de agua de los folíolos

Para determinar la pérdida de agua de los folíolos de los parentales y de los híbridos, se registró el peso fresco de hojas previamente expuestas a ambientes con distinta humedad relativa (HR): 30% y 100%. Se cortaron al azar cuatro folíolos, de cuatro plantas, también tomadas al azar, de cada material a evaluar. El peso se controló cada 15 min durante 1 h y después una vez por hora durante 3 h. Las mediciones se tradujeron como pérdida de agua de los folíolos, en las dos situaciones definidas (30 y 100 % HR) en un período de 3 h. El 100 % de HR se logró cubriendo la planta durante 48 h con una bolsa de nylon, lo suficientemente amplia para no apoyar sobre la misma.

### 3.5 Peroxidación de lípidos

Los lípidos peroxidados se determinaron a través de las sustancia reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), según Minotti y Aust (1987). Para ello se maceraron en frío 0,5 g de hojas con 5 mL de ácido metafosfórico 5 % (w/v) y 100 µL de butil de hidroxitolueno (BHT) disuelto en etanol. El homogenado fue filtrado a través de una capa de Miracloth y luego se centrifugó a 15.000 x g durante 20 min.

Para el desarrollo del cromógeno se adicionaron, a 0,5 mL del sobrenadante, 50 µL de BHT al 2 %, 250 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1 % (p/v) disuelto en NaOH 50 mM y 250 mL de HCl 25 % (v/v), y se incubó a 95 °C durante 30 min. Para la transferencia del cromógeno a la fase butanol se agregó 1,5

mL de 1-butanol. Los tubos se agitaron y se separó la fase orgánica por centrifugación a  $2000 \times g$  2 min. Se determinó la absorbancia a 532 nm y se restó la absorbancia inespecífica a 600 nm. El blanco para todas las muestras consistió en reemplazar el volumen de la muestra por medio de extracción, y los controles para cada una de las muestras fueron preparados reemplazando el TBA por NaOH 50 mM. La reacción se detuvo por enfriamiento en hielo.

Las determinaciones en los 4 tratamientos definidos en 3.1 se realizaron el día 7. Para esto se hizo un pool de folíolos de cada maceta, y se realizaron 3 determinaciones de cada muestra. La concentración se expresó como la media de las tres medidas con su respectivo desvío estándar.

### **3.6 Concentración de proteínas**

Para la extracción de proteínas se maceró 0,2 g de hoja en mortero preenfriado a 4 °C, con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,2, 2-mercaptoetanol 10 mM y 5 µL de PMSF 100 mM. La relación entre el material vegetal y el tampón fue 1:5 (p/v). El homogenado se filtró a través de una capa de Miracloth y se centrifugó a  $12.000 \times g$  durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de proteínas.

Las proteínas se determinaron según Bradford (1976). A 100 µL de muestra se le agregaron 5 mL de reactivo de Azul de Comassie G250 (Sigma®) 0,1 mM; etanol 0,8 M y ácido fosfórico 1,5 M. La absorbancia se midió a 595 nm después de 2 min. La curva patrón con seroalbúmina bovina, con concentraciones entre 0 y 3,5 mg/mL. Las determinaciones se realizaron por triplicado y la concentración se expresó como la media seguida del desvío estándar.

### **3.7 Actividad SOD, CAT Y APX**

La extracción de las enzimas SOD (EC 1.15.1.1), CAT (EC 1.11.1.6) y APX (EC 1.11.1.11) se realizó según el procedimiento usado por Sainz et al., (2010), a partir de plantas crecidas en macetas con el sustrato a capacidad de campo y a  $\frac{1}{4}$  de la capacidad de campo (definida en 3.8.2). Los folíolos se maceraron en mortero a 4 °C y se almacenaron a -80 °C. Para la extracción se maceraron 0,2 g de hojas con 0,8 mL de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, KCl 10 mM, 2-mercaptoetanol 14,3 mM, PMSF 1 mM, y EDTA 1 mM. El homogenado se centrifugó a  $10.000 \times g$  durante 10 min.

La actividad de la enzima SOD se determinó a través de la capacidad de reducir el citocromo c. La mezcla de reacción consistió en 1 mL de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,8, EDTA 1,0 mM,

citocromo c 1,0 mM y xantina 1,0 mM. Se agregó 0,1 U de xantina oxidasa y se midió la absorbancia a 550 nm. Como blanco se usó la mezcla de reacción sin xantina oxidasa. Se definió una unidad (U), como la cantidad de enzima capaz de inhibir un 50 % de la reacción control y la actividad se expresó en  $U \cdot mg^{-1}$  de proteína.

La actividad CAT se determinó a través de la capacidad de utilizar el peróxido de hidrógeno. La mezcla de reacción consistió en 1 mL de tampón fosfato potásico 100 mM pH 7 y  $H_2O_2$  20 mM. Se agregaron 20  $\mu L$  de extracto enzimático y se midió la variación de absorbancia a 240 nm durante 3 min. La actividad se determinó considerando un coeficiente de extinción molar para el  $H_2O_2$  de  $39,4 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Como blanco se usó la mezcla de reacción sin  $H_2O_2$ . Se definió una U como la cantidad de enzima capaz de utilizar 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido durante 1 min. La actividad se expresó en  $U \cdot mg^{-1}$  de proteína.

La actividad APX se determinó según Chen y Asada al. (1989) en 500  $\mu L$  de fosfato de potasio 50 mM pH 7,4 con 0,5 mM de ácido ascórbico, y 2 mM de  $H_2O_2$ . La reacción se inició con el agregado de 15  $\mu L$  del extracto de la planta, y se midió la absorbancia a 290 nm durante 90 seg. Una unidad de APX se definió como la actividad de la enzima que puede oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ácido ascórbico por min a 25 °C y a pH 7,4. La actividad de la enzima se expresó en  $U \cdot mg^{-1}$  de proteína.

### **3.8 Evaluación de parámetros fotosintéticos**

#### **3.8.1 Fluorescencia del FSII**

Para la estimación de la fluorescencia, las condiciones de crecimiento de las plantas y los tratamientos aplicados fueron los que están descritos en 3.1 de esta sección. Las medidas de la fluorescencia del fotosistema II (PSII) se realizaron con un Fluorímetro (FMS 1, Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, UK). Las hojas se mantuvieron en oscuridad 20 min hasta que se realizaron las determinaciones, mediante colocación de pinzas, para obtener el máximo grado de oxidación del *pool* de plastoquinonas (QA), primer aceptor de electrones del PSII. El rendimiento de fluorescencia mínimo ( $F_0$ ) fue determinado midiendo el pulso de luz modulado lo suficientemente baja ( $< 0,1 \mu E \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) de forma de no inducir cambios significativos en la fluorescencia. El rendimiento de fluorescencia máximo ( $F_m$ ) fue determinado mediante un pulso saturante de luz actínica de 0,8 s de duración con una intensidad de  $8.000 \mu E \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Seguidamente las hojas fueron iluminadas de manera continua con luz actínica con intensidad de  $300 \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Se tomó el valor de fluorescencia en estado estacionario ( $F_s$ ) y se aplicó un

segundo pulso actínico saturante de las mismas características del primero para determinar el nivel de fluorescencia máxima de las hojas adaptadas a la luz ( $F_m$ ).

### 3.8.2 Eficiencia en el uso del agua

La eficiencia en el uso del agua (EUA) se determinó por el método gravimétrico y se usaron plantas obtenidas de la multiplicación de estacas uninodales de *L. uliginosus*, *L. corniculatus* y los híbridos F<sub>1</sub> H1-6 y H1-87. Las estacas se sembraron a razón de 5 por maceta y el ensayo se realizó cuando las plantas alcanzaron un desarrollo de 6 folíolos.

En total se usaron 60 macetas de 300 mL, con sustrato arena vermiculita preparado como se indica en 3.1. En 48 macetas se sembraron plantas y 12 permanecieron sólo con sustrato para evaluar la evaporación del sistema. La capacidad de campo (CC) se definió como el peso de la maceta cuando comienza el escurrimiento de agua. El  $\frac{1}{4}$  de la capacidad de campo ( $\frac{1}{4}$  CC) se definió como el peso de la maceta secada a temperatura ambiente más la cuarta parte del peso del agua agregada a las macetas de CC. Se sembraron 12 macetas de cada genotipo: *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, H1-6 y H1-87. Entre las macetas sembradas se asignaron al azar, la mitad al tratamiento a CC y la otra mitad a  $\frac{1}{4}$  CC. Por otro lado, se tomaron 6 plantas de cada genotipo para el cálculo de biomasa inicial en el que se determinó el peso fresco de la biomasa aérea y radicular y luego se evaluó el peso seco dejando el material en estufa por 3 días a 65 °C.

Las macetas sembradas y sin sembrar permanecieron en una cámara de crecimiento con una iluminación de  $250 \mu\text{Em}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (lámparas de halogenuro metálico frío de  $5.000 \mu\text{Em}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) con fotoperíodo de 16 h/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C y 50 % HR. Durante los primeros 30 días las plantas se regaron hasta capacidad de campo con agua, y se intercalaron riegos con solución nutritiva Hornum (Handberg y Stougaard, 1992) estéril, modificada para *L. japonicus* en mM:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,2;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,4;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,7;  $\text{KNO}_3$ , 8,0; y en  $\mu\text{M}$ : Fe-NaEDTA, 54;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 19,4;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 5,4;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1,6;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,4;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,3.

Se pesó diariamente cada maceta con plantas de cada tratamiento y los controles sólo con sustrato, para obtener el valor de evaporación. Al final del período se pesó la biomasa aérea y radicular de cada planta, para tener el peso fresco y luego se evaluó el peso seco en cada genotipo y en cada

tratamiento, dejando el material en estufa por 3 días a 65 °C. La diferencia de peso de cada maceta entre dos días representa el consumo de agua de la planta. Considerando la evaporación de las macetas control, al final de los 15 días se tomó el consumo de agua por planta y por tratamiento y se evaluó la producción de biomasa de los distintos genotipos en cada tratamiento.

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

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

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

### 3.8.3 Discriminación isotópica del $^{13}\text{C}$ .

Las plantas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* y los híbridos interespecíficos H1-6 y H1-87 se cultivaron en cámara de crecimiento en las condiciones detalladas en el apartado 3.1 hasta el estado de 6 folíolos. Durante 15 días un grupo de 20 plantas de cada genotipo se mantuvo con riego a CC y a otro a  $\frac{1}{4}$  CC para establecer el déficit hídrico (tratamiento de estrés). Los tratamientos fueron asignados al azar.

Las hojas de todas las plantas de cada maceta se secaron en estufa a 65 °C durante 48 h y se molieron en mortero de ágata hasta lograr un polvo muy fino. El polvo se secó durante 24 h a la misma temperatura y muestras de 1,5 mg se colocaron en cápsulas de estaño para determinar el  $\delta^{13}\text{C}$  en un analizador elemental (Flash EA®, 1112 Series) acoplado a un espectrómetro de masa de relaciones isotópicas (Termo Finnigan Delta Plus®). El valor R (relación de abundancia molar  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de la muestra) se expresa en relación al estándar *Pee Dee Belemnite* (PDB). El procedimiento utilizado fue el del Laboratorio de Isótopos Estables de Facultad de Agronomía. La fórmula usada para realizar el cálculo fue:

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

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

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

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

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

#### 4. Evaluación de la respuesta déficit hídrico de la F<sub>2</sub>

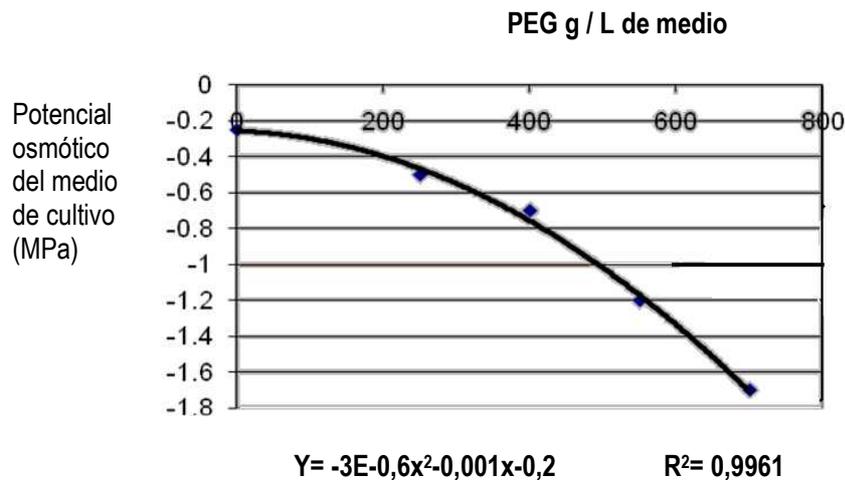
##### 4.1 Crecimiento radicular de plántulas en diferentes potenciales osmóticos

Las semillas se esterilizaron en hipoclorito de sodio 20% (v/v) durante 25 min, se enjuagaron 3 veces en agua destilada estéril y se sembraron en placas de Petri con agar 8 g /L estéril. Para obtener una germinación homogénea de *L. uliginosus* las semillas se escarificaron con papel de lija previo a la esterilización.

En cada potencial osmótico ensayado (0, -0.5, -0.7, -1.2 y -1.7 Mpa), generado con polietilenglicol 8000 (PEG) incorporado al medio de cultivo en las condiciones descritas por Verslues (2006) se evaluó el crecimiento radicular de las especies parentales y se definió para evaluar a los híbridos el potencial osmótico -1 Mpa (Fig. 10). La F<sub>2</sub> se evaluó con semillas obtenidas de las plantas híbridas F<sub>1</sub> que produjeron mayor número de semillas (>500), en los ensayos de policruza descritos en la sección de 3. Se evaluaron 200 semillas cada híbrido y 100 semillas de cada parental. En cada placa se sembraron de 2 a 4 semillas pregerminadas de cada parental y de 4 a 6 de cada híbrido y permanecieron en la cámara de crecimiento en las condiciones descritas en 2.3. El crecimiento radicular se midió entre los días 0 y el 5. Como control sin déficit hídrico se usó medio sin agregado de PEG.

##### 4.2 Determinación de variables consideradas en el ensayo en campo

El ensayo se instaló en abril de 2009, en la estación experimental de INIA "Las Brujas", (34 ° 40 '19"S., 56 ° 20'24"W, altura 45 m). El clima del lugar, definido según la clasificación de Köppen (Moreno, 1961) corresponde a templado y húmedo, con lluvias todo el año y veranos cálidos. La precipitación media anual es de 1100 mm y la temperatura media del aire es 17 °C. Los datos meteorológicos para el cálculo de la evapotranspiración de referencia, se tomaron de la estación meteorológica Campbell Scientific, Inc UK, instalada a 100 m del área experimental.

**Figura 10.** Potencial osmótico del medio de cultivo según la concentración de PEG 8000.

El experimento se estableció en una estructura denominada *rain out shelter* (protector de lluvias). Este dispositivo, denominado de ahora en adelante *shelter*, consta de un techo corredizo que proporciona un cerramiento automático cuando se inicia la lluvia y permanece cerrado mientras se mantengan las precipitaciones. Esto permite trabajar en condiciones de campo y controlar el agua que reciben las plantas. Se definieron 4 tratamientos correspondientes a distintas cantidades de agua que se suministró a las plantas. Para el tratamiento control se consideraron las precipitaciones caídas durante 1 año, período durante el que el ensayo permaneció a campo. Los otros tratamientos se definieron como 75 %, 50 % y 25 % de la evapotranspiración teórica de las plantas, calculada en base a la ecuación de Penman Monteith (Allen et al., 1998).

$$\lambda ET = \frac{\Delta (R_n - G) + \rho_a c_p \frac{(c_s - c_a)}{r_a}}{\Delta + \gamma \left( 1 + \frac{r_a}{r_s} \right)}$$

Donde  $R_n$  es la radiación neta,  $G$  flujo del calor en el suelo,  $(c_s - c_a)$  representa el déficit de presión de vapor del aire,  $\rho_a$  es la densidad media del aire a presión constante,  $c_p$  es el calor específico del aire,  $\Delta$  representa la pendiente de la curva de presión de vapor de saturación,  $\gamma$  es la constante psicrométrica, y,  $r_s$  y  $r_a$  son las resistencias superficial y aerodinámica.

El experimento se instaló en 12 parcelas, cada una correspondiente a un lisímetro y cada parcela, unidad experimental, tenía 1,9 m x 0,9 m x 1,45 m de profundidad. En cada parcela se plantaron 18 plantas a 20 cm de distancia entre ellas, 6 de cada especie parental y 6 plantas del híbrido H1-6. La ubicación de las plantas en cada lisímetro se realizó al azar, así como la asignación del tratamiento a cada lisímetro.

La biomasa producida se evaluó simulando condiciones de pastoreo. Para ello, se tomaron al azar 3 de las 6 plantas de cada genotipo instaladas por parcela y se repitió la medición sobre las mismas plantas en cada corte. Se realizaron 6 cortes durante un año, de acuerdo al desarrollo vegetativo alcanzado por las plantas. Las fechas de corte fueron 10/6/2009, 19/8/2009, 14/10/2009, 15/12/2009, 26/01/2010 y 18/03/2010. Cuando se levantó el ensayo se evaluó el sistema radicular y la presencia - ausencia de rizomas.

Para el ensayo en el shelter se consideraron los parámetros que se describen:

a. *Tipo de suelo.* El suelo del lugar es un Fine Thermic Semi Active Typic Argiudoll (Altamirano, 1976), con las características de color oscuro, contenido medio de materia orgánica superior al 2 %, alta saturación con bases, textura media a moderadamente pesada y de buen drenaje.

b. *Humedad del suelo.* Se determinó el contenido volumétrico de agua con sensores de agua (TDR). Se instalaron dos sensores, uno para determinar el contenido de agua entre 0 a 10 cm de profundidad, y el otro en la capa de 10 a 30 cm de profundidad. La pérdida de agua del suelo se calculó por la diferencia entre dos mediciones consecutivas del contenido de agua en el suelo. El valor de la pérdida fue asumido como la evaporación total del agua del suelo y la transpiración de las plantas. El almacenamiento de agua se determinó para las dos capas del perfil del suelo, multiplicando el valor del contenido volumétrico de agua de la capa por su grosor. Las curvas características de humedad del suelo, se ajustaron de acuerdo al modelo de Van Genuchten (1980).

La porosidad total se calculó mediante la relación de la densidad de suelo. La microporosidad se obtuvo de las curvas de agua para cada capa del perfil, como la cantidad de humedad contenida en 60 cm. La macroporosidad se calculó como diferencia entre la porosidad total y microporosidad, utilizando el software beta 3:00 SWRC V (Dourado Neto et al., 1999) mediante el siguiente modelo:

$$\theta = \theta_r + \frac{(\theta_s - \theta_r)}{[1 + (a\psi_m)^n]^b}$$

Donde  $\theta$  = es el contenido volumétrico de agua del suelo;  $\theta_r$  = contenido volumétrico de agua residual,  $\theta_s$  = saturación de humedad en el suelo de tierra;  $\psi_m$ : potencial mátrico del agua del suelo, a, n y b, coeficientes empíricos.

c. *Temperatura del suelo.* La temperatura del suelo en el período abril de 2009 a abril de 2010 se midió con termómetros modelo DS1921G (Thermochron Button Inc.) que se instalaron en cada parcela, a profundidades de 5 y 10 cm, y registraron los valores de temperatura a intervalos de 30 min. A partir de las 48 lecturas diarias se calculó la temperatura media, máxima, mínima y rango diario.

d. *Evapotranspiración del cultivo.* Los valores horarios de temperatura, humedad relativa, velocidad del viento, radiación solar, son relevados y utilizados para el cálculo de la ETo estimados por la ecuación de Penman-Monteith (Allen et al., 1998) descrita previamente.

### 4.3 Evaluación de plantas F<sub>2</sub> con diferente contenido de agua en el suelo

Las mismas plántulas F<sub>2</sub> del híbrido H1-6 y las parentales utilizadas en 4.1 para evaluar el crecimiento radicular en -1 Mpa, potencial osmótico generado por PEG, se sembraron en medio MS y se aclimataron en las condiciones descritas en 2.3. Cuando las plantas alcanzaron 10 cm de desarrollo vegetativo, se instalaron a campo.

Para evaluar la respuesta de la F<sub>2</sub> frente a distintos contenidos de agua en el suelo se consideraron los parámetros: conductancia estomática, biomasa producida, diámetro de la corona, presencia de rizoma y longitud de la raíz principal. Se definieron 6 momentos de corte y el crecimiento de la raíz se determinó al levantar el ensayo. Para estas evaluaciones se usó como método estadístico el análisis de parcelas divididas.

#### 4.3.1 Conductancia estomática

La conductancia estomática se midió con un porómetro Licor LI-1600 (Licor Inc., Lincoln Nebraska, EEUU) en marzo de 2010, en horas de la mañana. Para la determinación se usó el penúltimo folíolo completamente expandido de plantas crecidas en el shelter. Se realizaron por lo menos 10 mediciones por tratamiento en plantas tomadas al azar de cada genotipo por parcela.

#### **4.3.2 Estimación de la biomasa producida**

La biomasa de las plantas se determinó, individualmente, como materia fresca y peso seco de la parte aérea a partir de lo cortado a 5 cm de la corona. El peso seco se determinó en plantas secadas en estufa a 65 °C durante 4 días. En cada fecha de corte, la medición de biomasa producida se realizó sobre las mismas plantas.

#### **4.3.3 Diámetro de corona, presencia de rizomas y longitud de la raíz principal**

Estos parámetros se evaluaron al primer año de instalado el ensayo en el campo, sobre las mismas plantas en las que se evaluó la biomasa. El diámetro de la corona se midió con un calibre Cartabón. El largo de la raíz pivotante se midió en cm. Los rizomas se estimaron como presencia o ausencia.

### **5. Análisis estadístico**

Para los ensayos llevados a cabo en macetas se aplicó un modelo completamente aleatorizado. Las variables continuas  $W$ , discriminación isotópica del carbono, conductancia estomática, relación  $F_v/F_m$ , fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico InfoStat® versión 2008 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). La comparación de medias entre tratamientos se analizó aplicando la prueba de comparación de medias Tukey.

Para el análisis del crecimiento radicular entre genotipos, en condiciones de estrés osmótico, se aplicó un modelo de regresión lineal múltiple. El modelo utilizado para el análisis de los datos obtenidos en el shelter, fue de parcelas divididas, las variables se analizaron aplicando análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Infostat®. Para determinadas comparaciones se utilizó la estadística LSD-Fisher, en estos casos se indica en el texto.

### III RESULTADOS

#### 1. Obtención de los híbridos

Previo a la obtención de los híbridos se verificó en 20 flores la autoincompatibilidad de la planta madre, *L. uliginosus*. Entre las 12 y 14 h después de la apertura de las flores estas se autopolinizaron manualmente y a los 2 o 3 días cayeron, y en ningún caso hubo formación de vainas, lo que confirmó la autoincompatibilidad de la madre. Esto permitió hacer los cruzamientos entre *L. uliginosus* x *L. corniculatus* sin emasculación.

El resultado del cruzamiento de 4 plantas de *L. uliginosus* (PI 1 a PI 4) con un pool de polen de 60 plantas de *L. corniculatus* se evaluó a través de distintos parámetros (Cuadro 1). A los 18 días de la polinización el número de semillas inmaduras producidas por cada planta madre fecundadas con polen de *L. corniculatus*, varió entre 94 (PI 3) y 1915 (PI 4). La PI 4 tuvo floración abundante, y se pudieron hacer polinizaciones repetidas durante el período estival, que permitieron obtener el mayor número de semillas respecto a los otros cruzamientos. Sin embargo, el número de semillas inmaduras obtenidas de cada planta no se relacionó con el número de semillas por vaina, como tampoco hubo diferencias con el porcentaje de embriones rescatados entre PI 1 y PI 4 (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Fertilidad de plantas de *L. uliginosus* polinizadas con *L. corniculatus*.

| Plantas | Semilla inmadura † | Semillas por vaina (promedio) * | Embriones rescatados ‡ | Plantas regeneradas § |
|---------|--------------------|---------------------------------|------------------------|-----------------------|
| PI 1    | 564                | 11.7 a                          | 172 (30%)              | 34 (20%)              |
| PI 2    | 664                | 7.6 b                           | 114 (17%)              | 13 (11%)              |
| PI 3    | 94                 | 3.4 d                           | 14 (15%)               | 3 (21%)               |
| PI 4    | 1915               | 5.9 c                           | 589 (31%)              | 145 (25%)             |

† Semillas obtenidas y sembradas de cada planta madre.

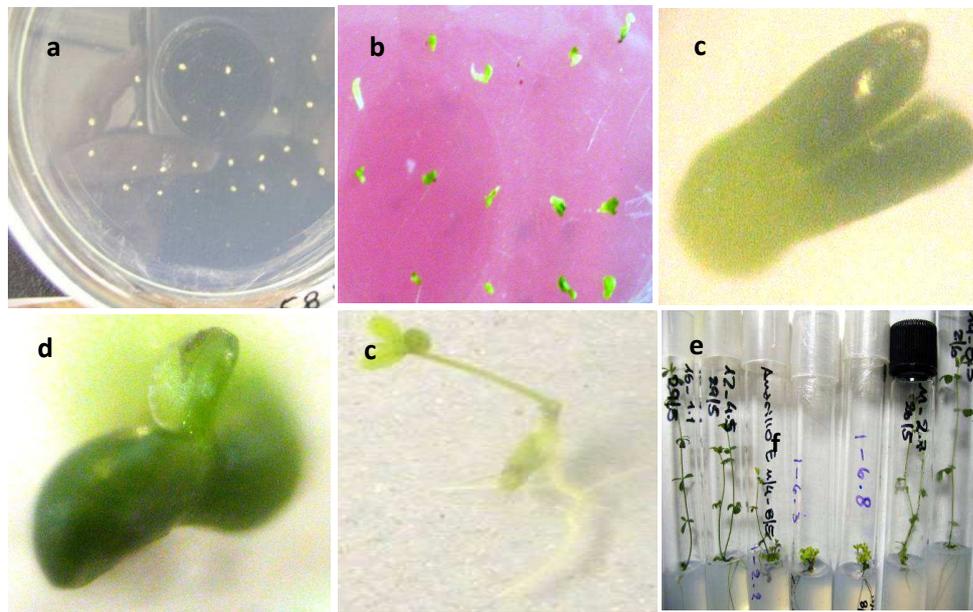
\* Las letras indican diferencias significativas para  $p < 0,05$  en la estadística de Tukey.

‡ Embriones rescatados por planta, entre paréntesis figura el porcentaje de embriones rescatados respecto al total de semillas inmaduras.

§ Entre paréntesis figura el porcentaje de plantas recuperadas respecto a los embriones rescatados.

En cuanto al número de semillas por vaina, hubo diferencias significativas según la planta madre (Cuadro 6). La PI 1 produjo la mayor cantidad de semillas por vaina (11,7) y la PI 3 la menor (3,4), mientras que las PI 2 y PI 4 produjeron valores intermedios (Cuadro 6). La cantidad de embriones rescatados a partir de las plantas utilizadas como madre fue diferente (Cuadro 6). A partir de la PI 1 y PI 4 se rescató el mayor número de embriones, con una eficiencia del 30 %, el doble que la obtenida por las PI 2 y PI 3 (Cuadro 6). En relación a la eficiencia de regeneración de plantas a partir de los embriones

rescatados, de las PI 1, PI 3 y PI 4 esta se situó en un 20 %, mientras que desde la PI 2 se rescató un 11 % (Cuadro 6).



**Figura 11.** Etapas del rescate de embriones. **a.** semillas inmaduras sembradas *in vitro*, **b.** embriones en diferentes estadios, **c.** embrión en estadio intermedio entre corazón y torpedo, **d.** embrión expandiendo los cotiledones, **e.** planta regenerada, **f.** Plantas conservadas *in vitro*.

Dentro de una misma vaina había embriones en diferente estadio y color. Los embriones presentaban color blanco, amarillo, verde claro, verde oscuro y marrón. En relación al desarrollo del embrión, el rescate fue exitoso cuando se encontraban en la etapa de corazón, o más avanzadas como la de torpedo y cotiledonar (Fig. 11), y no se pudieron regenerar plantas cuando estaban en estadio globular. Tampoco se logró regeneración de plantas a partir de embriones de color marrón, independientemente del estadio de desarrollo en que se encontraran.

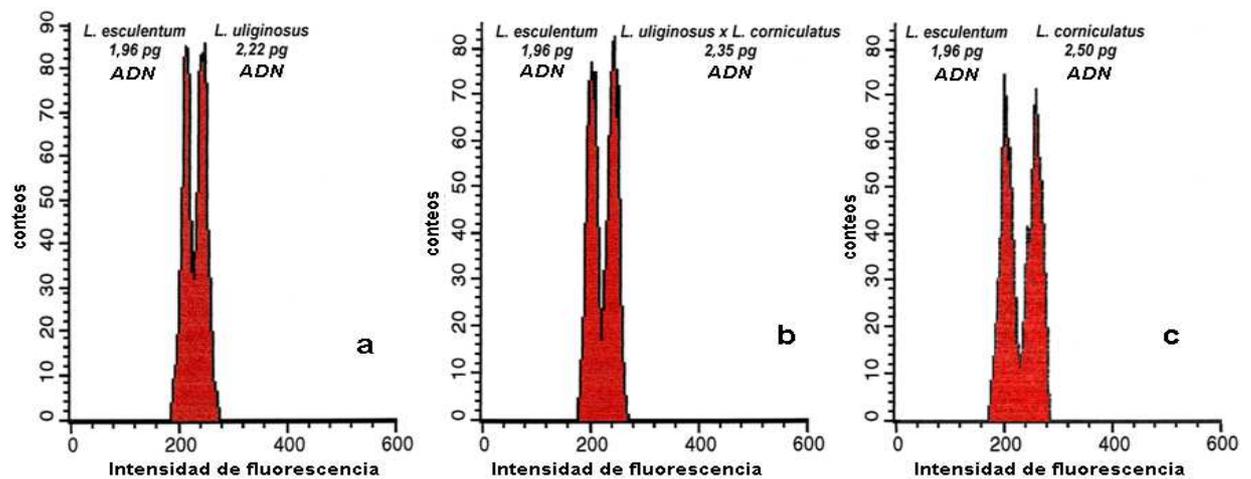
Del cruzamiento recíproco, es decir *L. corniculatus* x *L. uliginosus*, sólo se regeneraron 27 plantas de 400 embriones rescatados. Esto significó sólo un 7 % de éxito en la regeneración de plantas a partir de embriones rescatados.

## 2. Confirmación del estatus híbrido

La confirmación de embriones híbridos resultantes de los cruzamientos interespecíficos se realizó por CF y mediante el empleo de marcadores moleculares. Para esto se seleccionaron plantas fértiles de la  $F_1$ , y las plantas estériles (que no florecieron el primer año) no se analizaron debido a que la esterilidad en sí misma evidencia la condición híbrida. Además, con ellas no fue posible avanzar a la  $F_2$ .

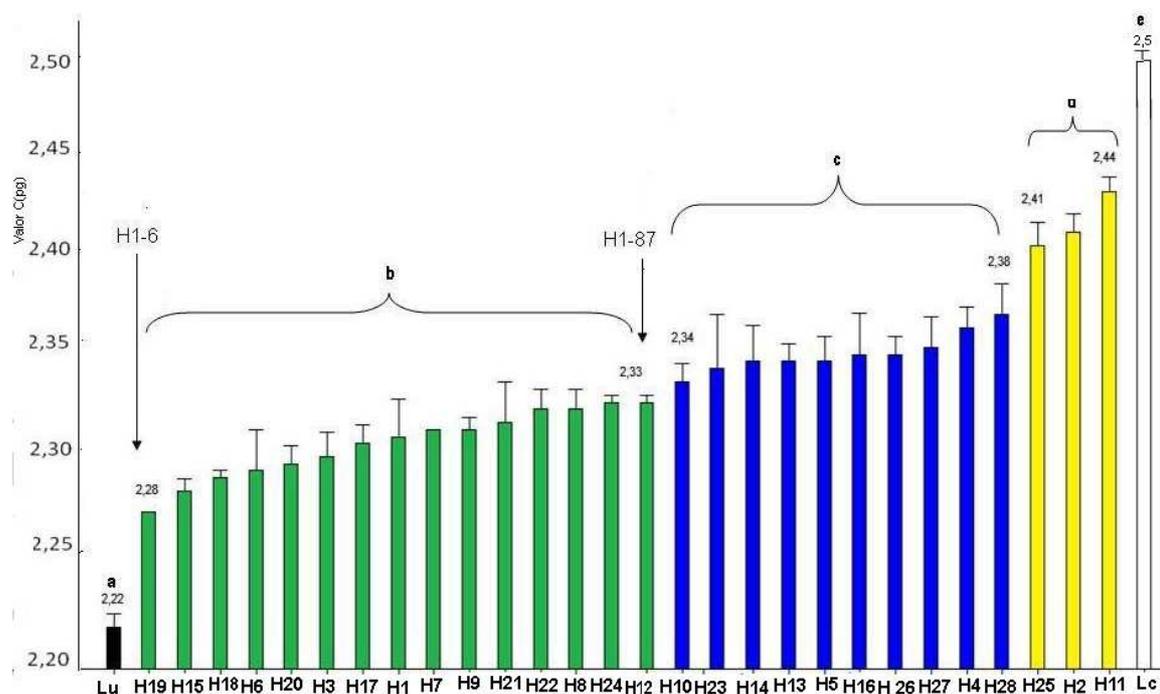
## 2.1 Confirmación de híbridos mediante citometría de flujo

Los parentales, *L. uliginosus* 4X y *L. corniculatus* 4X, tuvieron los valores extremos en el contenido de ADN, y entre estos se ubicaron los híbridos (Fig. 12). Los parentales presentaron valores de 2,22 pg +/- 0,02 (*L. uliginosus*) y 2,50 pg +/- 0,02 (*L. corniculatus*) y el valor promedio obtenido en los híbridos se situó en 2,35 pg +/- 0,02. Sin embargo, no todos los híbridos tuvieron valores de ADN cercanos al promedio. De los 40 híbridos evaluados algunos presentaron un valor más cercano a la madre, *L. uliginosus*, y otros más cercanos al padre, *L. corniculatus*. De los híbridos putativos, en 5 de ellos el contenido de ADN fue mayor a 2,40 pg, en 31 se situó entre 2,32 y 2,40 pg y en 4 fue inferior a 2,30 pg. Estas determinaciones se realizaron por triplicado, en tres fechas diferentes, para todas las muestras.



**Figura 12.** Contenido de ADN de los genomas determinados por citometría de flujo. **a.** *L. uliginosus* (2,22 pg), **b.** de un híbrido y **c.** *L. corniculatus* (2,50). Como estándar para todas las determinaciones se usó *Solanum lycopersicum* (1,96).

El tamaño del genoma de los parentales y de los 40 híbridos se presenta en la figura 13. Según el valor C se establecieron tres grupos de híbridos, el primero, entre 2,22 y 2,33 pg de ADN, el segundo entre 2,34 y 2,38 pg y el tercero entre 2,41 y 2,44 pg (Fig. 13). Los dos híbridos H1-6 y H1-87 fueron usados en todas las evaluaciones realizadas en esta tesis.

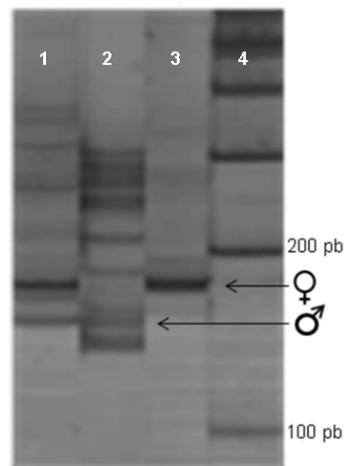


**Figura 13.** Tamaño del genoma de *L. uliginosus*, *L. corniculatus* y de 40 híbridos. El valor C, en pg, corresponde al promedio de tres determinaciones diferentes. Lu identifica al progenitor femenino *L. uliginosus*, Lc al progenitor masculino *L. corniculatus* y H a los híbridos obtenidos de cruzamientos de la PI 4. Los valores sobre las barras el contenido de ADN en los extremos de los intervalos dirferentes estadísticamente. Las flechas verticales indican los híbridos H1-6 y H1-87. Las líneas verticales representan al desvío estándar y las letras diferentes sobre las llaves diferencias signifcativas para un  $p > 0,05$  Tukey.

## 2.2 Confirmación de híbridos mediante marcadores moleculares

Las secuencias de microsatélites obtenidas de la base de datos Kasuza, se usaron inicialmente para amplificar ADN genómico de las especies parentales y de especies diploides de *Lotus japonicus* usadas como controles para verificar el tamaño de los productos esperados. De los 11 microsatélites evaluados (Cuadro 4) se seleccionaron el TM1150 y el EH380069 porque fueron polimórficos en las especies parentales. El microsatélite EH380069, facilitado por el Dr. Neil Sandal, forma parte de un gen que codifica para una enzima que participa de la síntesis de taninos condensados. Este microsatélite produjo, como TM1150, una banda característica entre 100 y 200 pb en cada especie parental. En la figura 14 se muestra el patrón obtenido con el microsatélite TM1150 en los parentales *L. uliginosus* y *L. corniculatus* y un híbrido. De esta forma, la diferencia entre los parentales se estableció por una banda de diferente peso molecular en cada uno. A su vez, los híbridos se diferenciaron de los parentales por la

presencia de las dos bandas, cada una característica de un parental (Fig. 14). La confirmación de los híbridos mediante el uso de microsatélites coincidió con la realizada a través de la CF.



**Figura 14.** Patrones de amplificación con microsatélite TM1150 en parentales y un híbrido. Carril 1 híbrido H1-6, carril 2 parental masculino (*L. corniculatus*), carril 3 parental femenino (*L. uliginosus*) y carril 4 marcador de peso molecular. Las flechas indican las bandas polimórficas en las especies parentales.

### 3. Evaluación fenotípica de los híbridos de la F<sub>1</sub> según parámetros morfológicos y reproductivos

#### 3.1 Características morfológicas

Para realizar la evaluación fenotípica se compararon los parentales y los híbridos de la progenie F<sub>1</sub>, que crecieron en macetas, en invernáculo. Morfológicamente los híbridos no se pudieron diferenciar de *L. uliginosus*, usado como madre. En este sentido, no se observaron diferencias en tamaño, forma, distancia entre los folíolos, así como tampoco del porte de la planta madre respecto al de los híbridos (Fig. 15).



**Figura 15.** Folíolos de los parentales y de dos híbridos F<sub>1</sub>. Se tomó el cuarto folíolo desde el ápice, de plantas en el mismo estado de desarrollo, a los dos meses de crecimiento en invernáculo.

### 3.2 Fertilidad de F<sub>1</sub>

Para evaluar la fertilidad de los híbridos de la F<sub>1</sub> se realizaron polinizaciones manuales entre los 40 híbridos confirmados mediante citometría de flujo y microsatélites. Los parámetros evaluados fueron: número de inflorescencias, número de flores por inflorescencia, fertilidad del polen y producción de semillas. Los datos que se presentan en el cuadro 7 corresponden a parámetros de fertilidad de la F<sub>1</sub>, obtenida del cruzamiento de PI 4 x *L. corniculatus*. Los híbridos de los cruzamientos de PI 1, PI 2 y PI 3 x *L. corniculatus* no desarrollaron flores en la primera estación de crecimiento, y no se evaluaron en esta tesis.

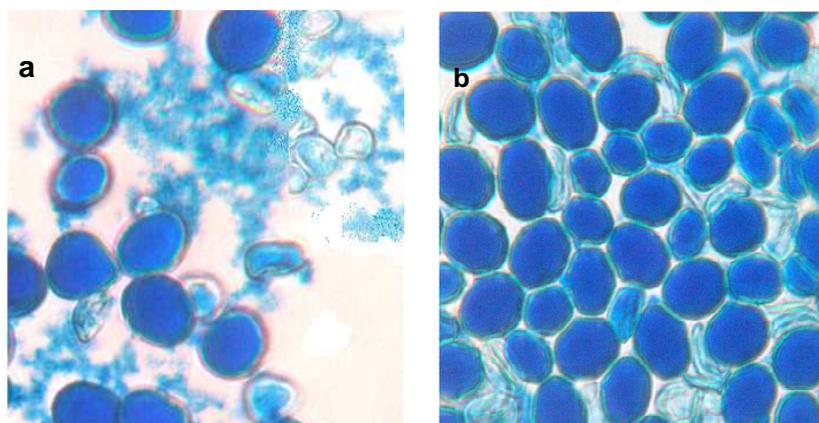
**Cuadro 7.** Producción de semilla y fertilidad del polen de plantas F<sub>1</sub> obtenidas de PI 4 x *L. corniculatus*.

| Producción de semilla † | Número de plantas | Número de flores ‡ | Fertilidad del polen § |
|-------------------------|-------------------|--------------------|------------------------|
| 0                       | 27                | 98                 | 10 - 99%               |
| 5 - 50                  | 14                | 114                | 3 - 96%                |
| 50 - 250                | 26                | 98                 | 0 - 90%                |
| 250 - 500               | 11                | 146                | 0 - 98%                |
| 500 - 750               | 6                 | 98                 | 0 - 86%                |
| 750 - 1000              | 3                 | 149                | 4 - 92%                |
| > 1000                  | 3                 | 171                | 5 - 64%                |

† Rango de la producción de semilla en las plantas híbridas. ‡ Promedio del número de flores por planta. § Porcentaje de granos de polen viables.

De 145 híbridos obtenidos del cruzamiento de PI 4 x *L. corniculatus* (designados desde 1-1 a 1-145), 63 presentaron flores y produjeron semilla en la primera estación de crecimiento. La producción de semilla varió entre 5 y más de 1000 por planta F<sub>1</sub>, con un valor promedio de 261 semillas por planta (Cuadro 7). Tres plantas produjeron más de 1000 semillas, 9 entre 500 y 1000, y 37 entre 50 y 500, 14 entre 5 y 50 y 27 florecieron pero no produjeron semilla (Cuadro 7). El número de flores por inflorescencia en promedio fue 6,3 y varió entre 3 y 9. El número de flores por planta individual, semillas por planta y fertilidad del polen de los 60 híbridos que florecieron el primer año. En cuanto a la fertilidad del polen, se observó que en híbridos con alta producción de semilla como H1-103, la mayoría de granos de polen eran

inviabiles, huecos, y por lo tanto no se colorearon con *cotton blue* (Fig. 16). En cambio híbridos como H1-67 produjeron baja cantidad de semilla y alto porcentaje de granos viables (Fig. 16).



**Figura 16.** Granos de polen teñidos con *cotton blue*. **a.** Polen del híbrido H1-67, con alta proporción de fértiles (azules) y **b.** Polen del híbrido H1-24, con alta proporción de estériles (sin colorear).

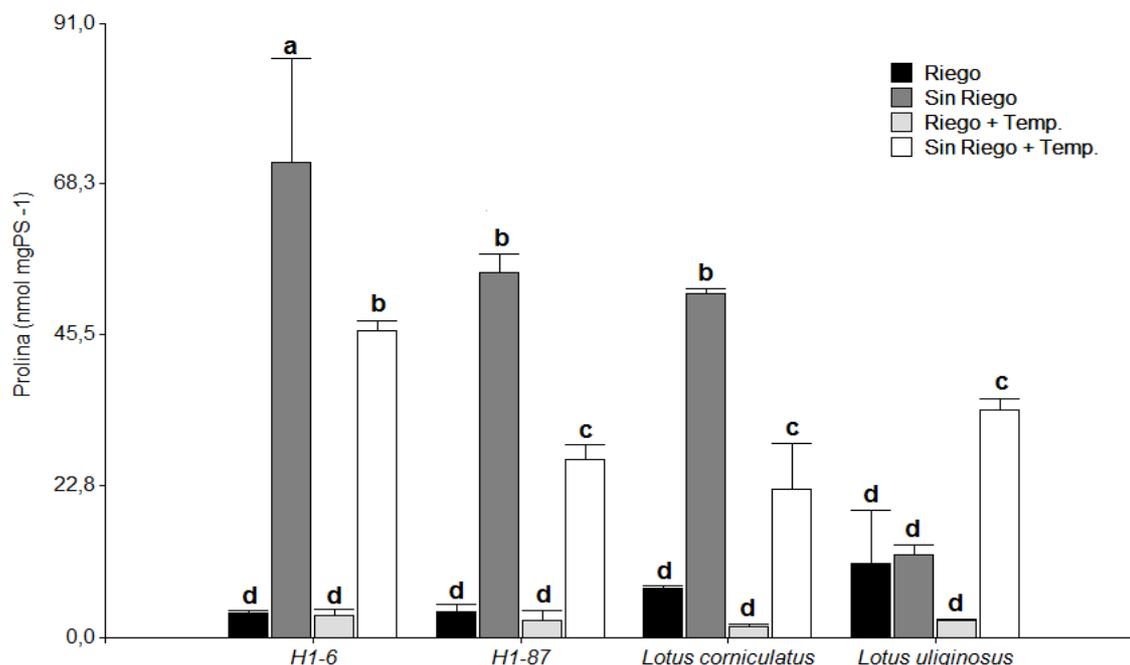
#### 4. Evaluación de respuestas a estrés en híbridos F1

Para evaluar las respuestas a estrés se usaron las especies parentales y dos híbridos descendientes de PI 4: H1-6 y H1-87, que se eligieron porque produjeron abundante cantidad de semillas.

##### 4.1 Acumulación de prolina en folíolos

La acumulación de prolina se considera una respuesta generalizada de las plantas sometidas a distintos tipos de estrés. Según este criterio se evaluó su concentración en folíolos de plantas crecidas en macetas con arena – vermiculita, sometidas a estrés hídrico y térmico.

En la figura 17 se muestran los valores promedio de concentración de prolina en folíolos de los parentales e híbridos, sometidos a estrés hídrico, térmico, e hídrico más térmico. El período de estrés fue de 7 días y las determinaciones se realizaron en ese día. La mayor acumulación de prolina se observó en el tratamiento sin riego en los dos híbridos y en el parental *L. corniculatus*, que mostraron el mismo patrón de acumulación en los diferentes tratamientos (Fig. 17). El parental *L. uliginosus* no acumuló prolina respecto al control en estrés hídrico, pero sí en hídrico más térmico. El estrés térmico inhibió la acumulación de prolina inducida por déficit hídrico en *L. corniculatus* y los dos híbridos pero no en *L. uliginosus* (Fig. 17).



**Figura 17.** Acumulación de prolina en folíolos. El estrés hídrico se impuso por suspensión de riego y el térmico por incubación a 40 °C durante 3 h. La concentración de prolina se determinó a los 7 días de estrés y corresponde al promedio de tres repeticiones biológicas. Las barras verticales indican el desvío estándar.

#### 4.2 Contenido de clorofila a y b

Dado que la oxidación de la clorofila es un parámetro a considerar como indicador de daño, se determinó la clorofila a, b y la relación entre ellas. Como se ve en el cuadro 8 no hubo variación en el contenido de clorofila a entre *L. uliginosus*, *L. corniculatus* y los híbridos, cuando fueron sometidos a estrés hídrico, térmico e hídrico más térmico. Sin embargo la clorofila b se incrementó en los tratamientos de estrés hídrico, así como cuando se combinó estrés hídrico y térmico (Cuadro 8).

El genotipo en el que se incrementó menos la clorofila b fue *L. uliginosus*. En condición control, la relación Cl a/b en el padre y en el híbrido H1-87 fue la misma, así como también fue la misma relación entre la madre y en el híbrido H1-6, pero menor. El híbrido H1-6 en condición de déficit hídrico mostró un aumento de la relación Cl a/b respecto a los padres. El estrés térmico o combinado con hídrico (T3 y T4) produjo una disminución de la relación Cl a/b en todos los genotipos.

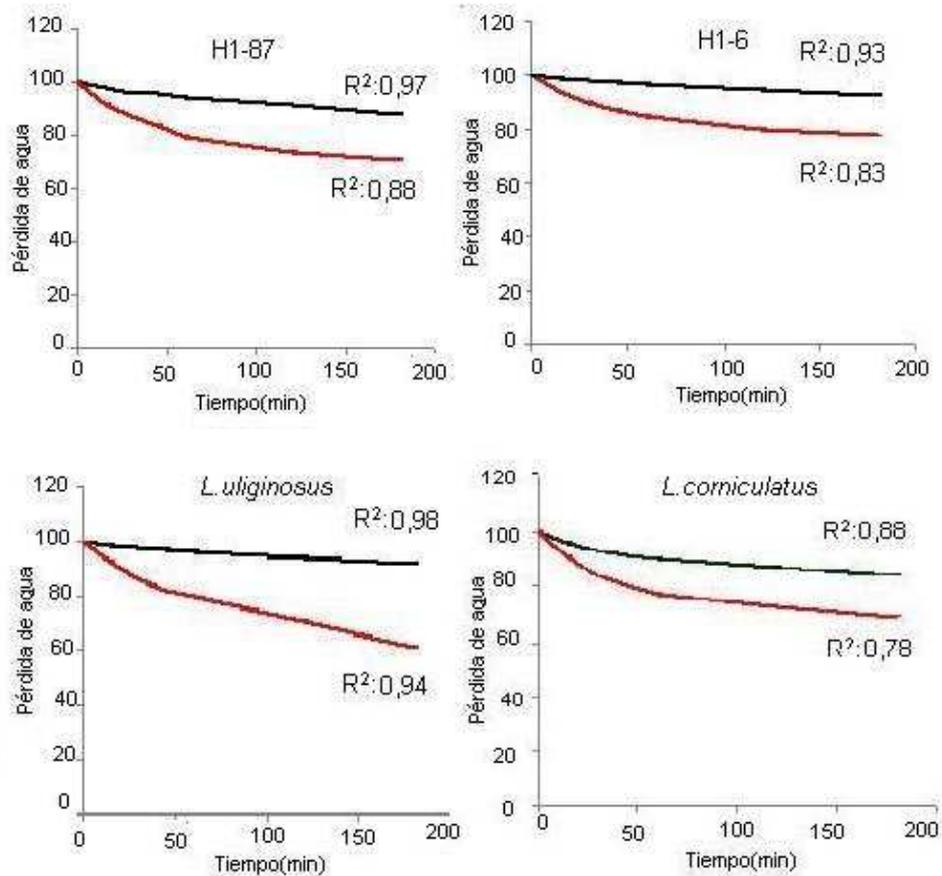
**Cuadro 8.** Contenido de clorofila a, b y relación a/b en folíolos. Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones seguidas del desvío estándar, determinadas a los 7 días de impuestos los tratamientos: T1 control con riego, T2 supresión de riego, T3 térmico (3 h a 40 °C) y T4 hídrico más térmico.

| Tratamiento | Genotipo               | Cl a (mg.gPS-1) | Cl b (mg.gPS-1) | Cl a/b |
|-------------|------------------------|-----------------|-----------------|--------|
| T1          | <i>L. corniculatus</i> | 4,79±0,1        | 6,86±2,1        | 0,699  |
|             | H1-87                  | 3,99±0,8        | 5,24±0,9        | 0,762  |
|             | H1-6                   | 4,55±0,06       | 9,67±1,4        | 0,471  |
|             | <i>L. uliginosus</i>   | 3,90±0,4        | 9,67±1,2        | 0,404  |
| T2          | <i>L. corniculatus</i> | 4,82±0,9        | 11,35±1,4       | 0,425  |
|             | H1-87                  | 8,76±0,7        | 13,97±0,9       | 0,627  |
|             | H1-6                   | 9,14±1,9        | 10,32±1,9       | 0,885  |
|             | <i>L. uliginosus</i>   | 3,73±0,6        | 10,06±0,2       | 0,371  |
| T3          | <i>L. corniculatus</i> | 3,59±1,2        | 11,96±0,4       | 0,3    |
|             | H1-87                  | 3,04±0,2        | 7,96±1,9        | 0,383  |
|             | H1-6                   | 4,72±1,4        | 11,84±1,4       | 0,399  |
|             | <i>L. uliginosus</i>   | 2,63±0,8        | 5,86±0,8        | 0,449  |
| T4          | <i>L. corniculatus</i> | 5,29±1,9        | 14,68±1,4       | 0,361  |
|             | H1-87                  | 5,70±1,3        | 20,52±0,4       | 0,278  |
|             | H1-6                   | 6,10±0,9        | 18,86±0,2       | 0,323  |
|             | <i>L. uliginosus</i>   | 6,82±1,1        | 15,51±1,2       | 0,44   |

#### 4.3 Pérdida de agua por los folíolos

Para determinar la pérdida de agua por los folíolos de los híbridos H1-6 y H187 y de los parentales se removieron 4 folíolos por planta, adaptadas durante 48 h, a 100 % HR y a 30% HR. Los folíolos se colocaron en condiciones de 50 % HR y a temperatura ambiente, se registró el peso a intervalos de 15 min durante 1 h y hasta 3 h a intervalos de 1 h.

Cuando los folíolos provenían de plantas adaptadas a 30 % de HR, la pérdida de agua en todos los casos fue menor a cuando provenían de 100 % de HR, debido a que las plantas tenían parcialmente cerrado sus estomas. En cambio la pérdida de agua de los folíolos fue mayor cuando las plantas estaban adaptadas a 100 % de HR (Fig. 18), porque a esa condición los estomas estaban abiertos. Si bien no hubo diferencias significativas en la pérdida de agua entre los 4 genotipos, *L. corniculatus* y los dos híbridos presentaron una pérdida de agua con una pendiente similar en las dos situaciones (Fig. 18) mientras que *L. uliginosus* en 100% de HR tuvo una pendiente mayor, lo que indica una mayor velocidad en la pérdida de agua.



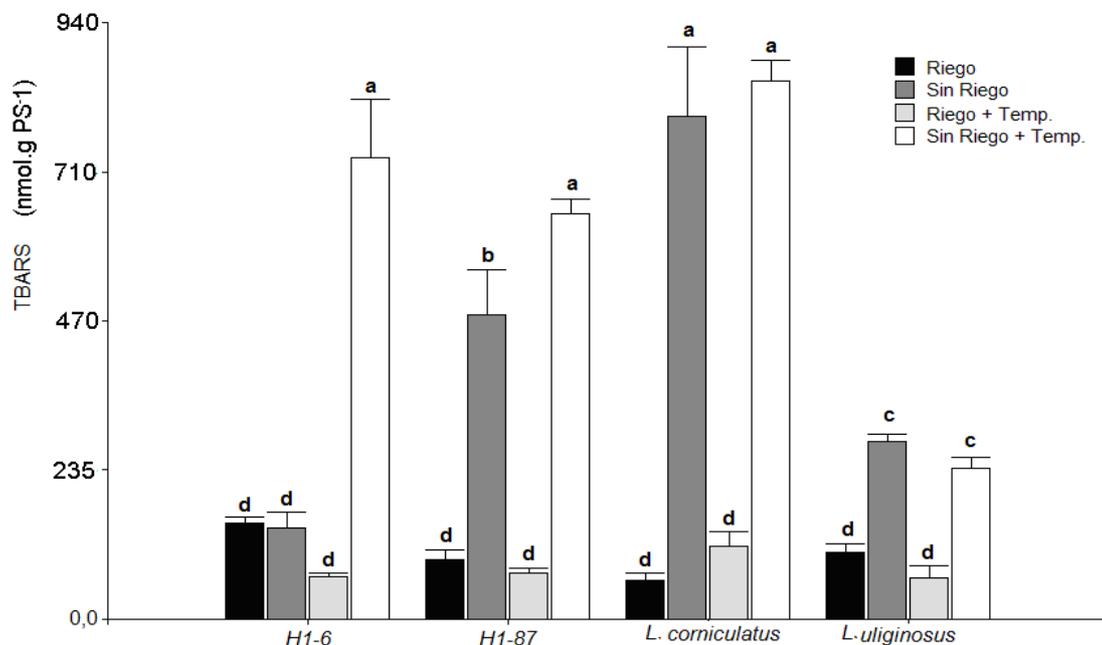
**Figura 18.** Pérdida de agua por folíolos. Se usaron folíolos expandidos, del tercero al quinto, de plantas creciendo con riego adaptadas durante 48 h previas al ensayo a HR de 30 % y 100 %. Las líneas rojas corresponden a la pérdida de agua de folíolos que provenían de plantas en 100 % de HR y las líneas negras de plantas en 30 % de HR. Los valores de pérdida de agua se expresan como el porcentaje del peso inicial, de 3 repeticiones. Los R<sup>2</sup> se indican en cada curva.

#### 4.4 Peroxidación de lípidos

La determinación de TBARS es una forma de evaluar el daño oxidativo producido por las ERO, que tienen como blanco diferentes moléculas, entre ellas los fosfolípidos de membrana. Los TBARS se determinaron en las mismas muestras de folíolos en las que se midió prolina a los 7 días de suspendido el riego.

En los tratamientos de estrés hídrico y estrés hídrico más térmico, *L. corniculatus* mostró mayor cantidad de TBARS respecto al control (Fig. 19). En *L. uliginosus*, el otro parental, también la cantidad de TBARS fue mayor en condición de estrés hídrico que en el control, y térmico más hídrico, pero tuvo menor peroxidación de lípidos que *L. corniculatus*. En los híbridos H1-6 y H1-87 la combinación de ambos estreses también produjo incrementos en la cantidad de TBARS respecto al control. Sin embargo, en

condición de estrés hídrico no se incrementaron los TBARS en el híbrido H1-6. El estrés térmico no indujo formación de TBARS en ningún genotipo (Fig. 19).



**Figura 19.** Acumulación de TBARS en folíolos de híbridos y parentales. Las determinaciones se hicieron 7 días después de suspendido el riego. H1-6 y H1-87 corresponden a los híbridos. La concentración de TBARS se expresa como el promedio de 4 repeticiones de 4 tratamientos. Las barras verticales representan el desvío estándar y letras diferentes indican diferencias significativas para una  $p < 0,05$  según Tukey.

#### 4.5 Fv/Fm y NPQ

La eficiencia fotosintética en plantas se estimó a través de la relación Fv/Fm, que se usa como indicador de la eficiencia cuántica potencial del PSII. Las determinación de la fluorescencia se llevó a cabo el día en que se suspendió el riego (día 0) y a los 3, 5 y 7 días después. Los tratamientos definidos fueron: T1 con riego, T2 con suspensión del riego, T3 con riego y 40 °C durante 3 h, y T4 sin riego y 40 °C durante 3 h. La relación Fv/Fm permaneció constante hasta el día 3 en todos los tratamientos y genotipos (Cuadro 9). El día 5, en las condiciones establecidas en el tratamiento 4, la relación Fv/Fm descendió en *L. uliginosus* y en los híbridos H1-6 y H1-87 pero no en *L. corniculatus*. Recién al día 7 descendió la relación Fv/Fm en todos los genotipos, pero en *L. corniculatus* el descenso fue el menor. El mayor descenso de la relación Fv/Fm lo tuvieron *L. uliginosus* y el híbrido H1-6, mientras que el híbrido H1-87 tuvo un valor intermedio entre *L. uliginosus* y *L. corniculatus*.

**Cuadro 9.** Relación Fv/Fm de los parentales y de los híbridos en condición de estrés. Los valores corresponden al promedio de cuatro mediciones de dos experimentos independientes, seguidas del desvío estándar. Las determinaciones se realizaron el día 0, y a los 3, 5 y 7 días de suspendido el riego. Los tratamientos fueron: T1 con riego, T2 con suspensión del riego, T3 con riego y 40 °C durante 3 h, y T4 sin riego y 40 °C durante 3 h.

| Tratamiento | Genotipo               | día 0       | día 3       | día 5       | día 7       |
|-------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| T1          | <i>L. corniculatus</i> | 0.87 ± 0.01 | 0.87 ± 0.01 | 0.86 ± 0.01 | 0.86 ± 0.01 |
|             | H 1-87                 | 0.86 ± 0.01 | 0.86 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 | 0.86 ± 0.01 |
|             | <i>L. uliginosus</i>   | 0.87 ± 0.02 | 0.86 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 | 0.86 ± 0.01 |
|             | H 1-6                  | 0.87 ± 0.01 | 0.86 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 | 0.86 ± 0.01 |
| T2          | <i>L. corniculatus</i> | 0.87 ± 0.01 | 0.85 ± 0.03 | 0.85 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 |
|             | H 1-87                 | 0.88 ± 0.01 | 0.87 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 |
|             | <i>L. uliginosus</i>   | 0.89 ± 0.04 | 0.87 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 |
|             | H 1-6                  | 0.86 ± 0.01 | 0.86 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 |
| T3          | <i>L. corniculatus</i> | 0.88 ± 0.01 | 0.88 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 |
|             | H 1-87                 | 0.87 ± 0.01 | 0.87 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 |
|             | <i>L. uliginosus</i>   | 0.87 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 |
|             | H 1-6                  | 0.87 ± 0.01 | 0.86 ± 0.01 | 0.86 ± 0.01 | 0.84 ± 0.01 |
| T4          | <i>L. corniculatus</i> | 0.88 ± 0.01 | 0.88 ± 0.01 | 0.86 ± 0.01 | 0.78 ± 0.03 |
|             | H 1-87                 | 0.86 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 | 0.78 ± 0.01 | 0.75 ± 0.04 |
|             | <i>L. uliginosus</i>   | 0.87 ± 0.01 | 0.86 ± 0.01 | 0.70 ± 0.02 | 0.74 ± 0.04 |
|             | H 1-6                  | 0.87 ± 0.01 | 0.85 ± 0.02 | 0.80 ± 0.03 | 0.74 ± 0.03 |

En los mismos folíolos que se determinó la Fv/Fm se analizó el NPQ, que refleja la energía disipada bajo forma de calor. Este parámetro no se incrementó respecto al tratamiento control. De esta forma, en todos los genotipos parece haber un mecanismo de protección eficiente contra el daño del aparato fotosintético.

**Cuadro 10.** NPQ de los parentales y de los híbridos en condición de estrés. Los valores corresponden al promedio de cuatro mediciones de dos experimentos independientes, seguidas del desvío estándar. Las determinaciones se realizaron el día 0, y a los 3, 5 y 7 días después de suspendido el riego. Los tratamientos fueron: T1 con riego, T2 con suspensión del riego, T3 con riego y 40 °C durante 3 h, y T4 sin riego y 40 °C durante 3 h.

| Tratamiento | Genotipo               | día 0        | día 3       | día 5        | día 7       |
|-------------|------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| T1          | <i>L. corniculatus</i> | 0,59 ± 0,16  | 0,26 ± 0,06 | 0,44 ± 0,08  | 0,20 ± 0,01 |
|             | <i>L. uliginosus</i>   | 0,22 ± 0,01  | 0,22 ± 0,01 | 0,31 ± 0,08  | 0,23 ± 0,1  |
|             | H 1-6                  | 0,30 ± 0,01  | 0,17 ± 0,04 | 0,37 ± 0,02  | 0,23 ± 0,03 |
|             | H 1-87                 | 0,49 ± 0,01  | 0,23 ± 0,07 | 0,37 ± 0,17  | 0,34 ± 0,02 |
| T2          | <i>L. corniculatus</i> | 0,31 ± 0,04  | 0,39±0,15   | 0,24 ± 0,04  | 0,12 ± 0,03 |
|             | <i>L. uliginosus</i>   | 0,25 ± 0,01  | 0,11±0,01   | 0,20 ± 0,04  | 0,17 ± 0,07 |
|             | H 1-6                  | 0,32 ± 0,11  | 0,23±0,1    | 0,28 ± 0,08  | 0,20 ± 0,02 |
|             | H 1-87                 | 0,29 ± 0,01  | 0,24±0,001  | 0,27± 0,18   | 0,14 ± 0,05 |
| T3          | <i>L. corniculatus</i> | 0,31 ± 0,06  | 0,27±0,01   | 0,38 ± 0,03  | 0,30 ± 0,07 |
|             | <i>L. uliginosus</i>   | 0,42 ± 0,09  | 0,36±-0,001 | 0,44 ± 0,15  | 0,27 ± 0,11 |
|             | H 1-6                  | 0,21 ± 0,03  | 0,20 ±0,02  | 0,14 ±-0,17  | 0,17 ± 0,07 |
|             | H 1-87                 | 0,29 ± 0,020 | 0,12 ±0,02  | 0,29 ± 0,01  | 0,32 ± 0,08 |
| T4          | <i>L. corniculatus</i> | 0,3 ± 0,22   | 0,24±0,1    | 0,32 ± 0,06  | 0,19 ± 0,04 |
|             | <i>L. uliginosus</i>   | 0,36± 0,15   | 0,15±-0,002 | 0,13 ± 0,001 | 0,29 ± 0,16 |
|             | H1-6                   | 0,22 ± 0,07  | 0,18 ±-0,03 | 0,21 ± 0,14  | 0,15 ± 0,02 |
|             | H1-87                  | 0,41 ± 0,02  | 0,17± 0,01  | 0,28 ± 0,07  | 0,16 ± 0,02 |

## 4.6 Defensa antioxidante enzimática

La utilización del O<sub>2</sub> como forma de canalizar el exceso de electrones que se da en condición de estrés, parece una estrategia riesgosa para las plantas, ya que incrementa la generación de ERO. Para contrarrestar esto, las plantas cuentan con sistemas antioxidantes que permiten controlar la cantidad de ERO y el funcionamiento de la fotosíntesis. Entre estos sistemas enzimáticos se evaluó la actividad SOD, CAT y APX.

En condición control, definida como 100 % de capacidad de CC, *L. corniculatus* mostró menor actividad SOD que el híbrido H1-87, mientras que en *L. uliginosus* y el híbrido H1-6 la actividad fue similar (Fig. 19 A). En el tratamiento con ¼ de CC, considerado como situación de déficit hídrico, no hubo diferencias significativas entre los genotipos. Sin embargo, todos los genotipos mostraron un aumento de la actividad SOD excepto el híbrido H1-87, que mostró el mismo nivel de actividad (Fig. 20 A).

En condición de CC, la APX de ambos parentales fue significativamente mayor que los híbridos, mientras que en condición de estrés los híbridos presentaron una actividad APX mayor que los parentales (Fig. 20 B). De todas formas en el híbrido H1-6 el incremento fue significativamente mayor que en el híbrido H1-87.

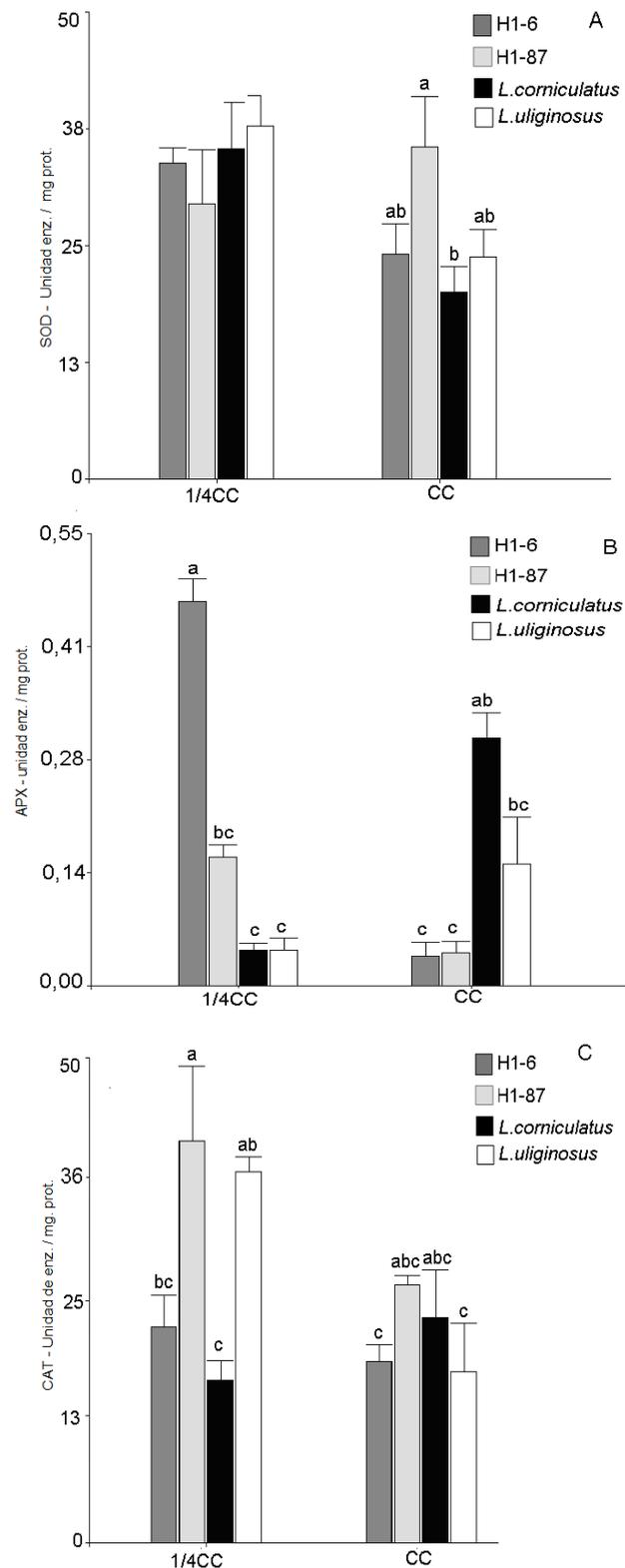
La actividad CAT, en condición de CC no presentó diferencias significativas entre los cuatro genotipos (Fig. 20 C). Sin embargo, en condición de estrés la actividad CAT fue mayor en H1-87 y en *L. uliginosus* respecto a H1-6 y *L. corniculatus*, que no mostraron incrementos de actividad

## 4.7 Eficiencia en el uso del agua

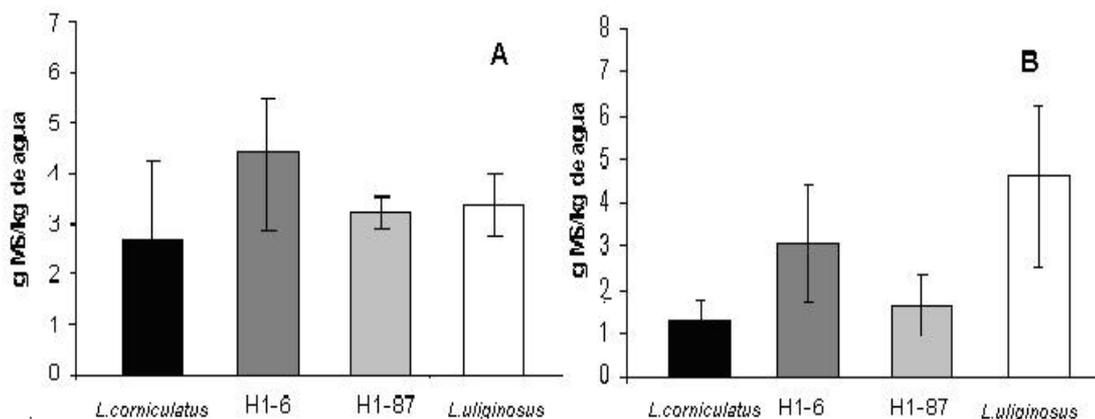
### 4.7.1 Determinación gravimétrica

Para determinar la EUA, calculada como el agua consumida por g de materia seca producida en los parentales y en los híbridos se realizaron tres experimentos, en los que se usó CC como control y ¼ de CC como condición de déficit hídrico. Entre los genotipos evaluados la EUA no presentó diferencias significativas a ¼ de CC ni a CC (Fig. 21 A y B).

Sin embargo se pudo observar que en *L. corniculatus* y en el híbrido H1-87 aumentó la EUA cuando crecieron con déficit hídrico, respecto a la situación control (Fig. 21 A y B). Por otra parte, *L. uliginosus* y el híbrido H1-6 no presentaron variación en la EUA en ambas condiciones (Fig. 21 A y B).



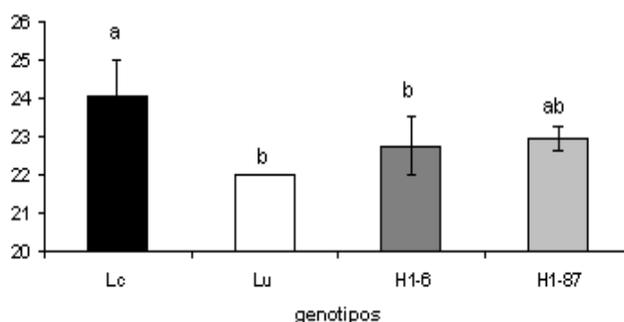
**Figura 20.** Actividad de enzimas que participan en la defensa antioxidante en foliolos. **A.** Actividad SOD. **B.** Actividad APX. **C.** Actividad CAT. Los genotipos *L.corniculatus* (barras negras), *L. uliginosus* (barras blancas) e híbridos H1-6 y H1-87 (barras grises oscuras y claras respectivamente) se evaluaron en dos tratamientos: 100 % de CC (control) y ¼ de CC (déficit hídrico). Los valores de las actividades enzimáticas corresponden al promedio de tres muestras de cada genotipo, de dos ensayos independientes. Las barras verticales representan el desvío estándar y las letras diferentes muestran diferencias significativas para un  $p < 0,05$  en la estadística de Tukey.



**Figura 21.** Eficiencia en el uso del agua de las especies parentales y los híbridos. **A.** EUA a  $\frac{1}{4}$  de CC. **B.** EUA a 100 % de CC. La barra negra corresponde a *L. corniculatus*, la gris oscura al híbrido H1-6, la gris clara al híbrido H1-87 y la barra blanca a *L. uliginosus*. La EUA se expresa como la media de la materia seca producida por peso de agua consumida. La barra vertical indica el desvío estándar, para un  $n=4$ .

#### 4.7.2 Discriminación isotópica del $^{13}\text{C}$

La relación isotópica del  $^{13}\text{C}$  y  $^{12}\text{C}$  en los tejidos de la planta es menor que la de la atmósfera, lo que evidencia que las plantas discriminan en contra del  $^{13}\text{C}$  durante la fotosíntesis. Adicionalmente, trabajos teóricos y empíricos han demostrado que la  $\Delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  correlaciona altamente con la EUA de la planta. La relación  $\Delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  entre parentales e híbridos (Fig. 22) disminuyó en todos los genotipos cuando las plantas habían estado a  $\frac{1}{4}$  de CC, lo que evidencia un cierre estomático parcial o completo, que limita la difusión de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . El  $\Delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  en condición de estrés, mostró diferencias significativas entre *L. corniculatus* y *L. uliginosus* y el híbrido H1-6. De manera similar a lo observado en la EUA, en condición de déficit hídrico tuvieron el mismo comportamiento *L. corniculatus* y el híbrido H1-87, y *L. uliginosus* y el híbrido H1-6 (Fig. 22).

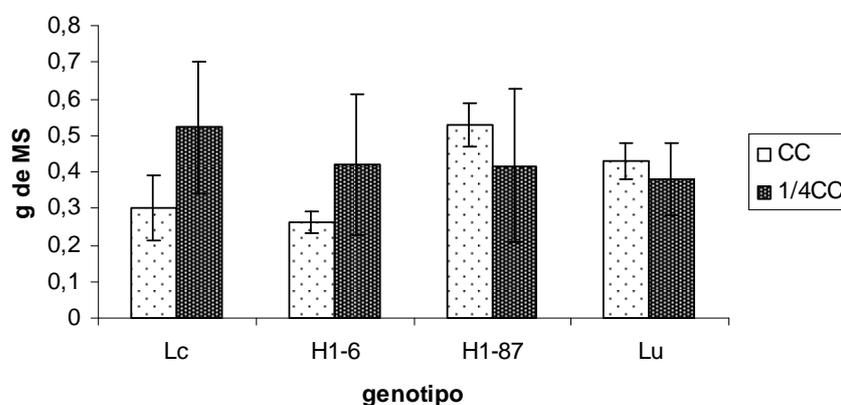


**Figura 22.** Discriminación isotópica del  $^{13}\text{C}$  en condición de déficit hídrico. La barra negra corresponde a *L. corniculatus*, la blanca a *L. uliginosus*, la gris oscura al híbrido H1-6 y la gris clara al híbrido H1-87. La

$\Delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  está expresada como el promedio de 3 repeticiones. Las barras verticales indican el desvío estándar y las letras diferentes, diferencias significativas para  $p < 0,05$  en la estadística de Tukey.

#### 4.7.3 Relación raíz - tallo

En el mismo material en el que se evaluó la EUA, se analizó la relación raíz/tallo en las dos condiciones, a 100 % de CC y a  $\frac{1}{4}$  de CC. A 100 % de CC el genotipo que presentó mayor relación raíz/tallo fue el híbrido H1-87 y *L. uliginosus*, le siguió *L. corniculatus* y por último el híbrido H1-6. Sin embargo, en condición de estrés hídrico a  $\frac{1}{4}$  de CC esta relación presentó un *ranking* diferente, e inverso al obtenido con 100 % de CC (Fig. 23). En condición de déficit hídrico, *L. corniculatus* presentó la mayor relación raíz/tallo, le siguieron los híbridos H1-6, H1-87 y por último *L. uliginosus*.



**Figura 23.** Relación raíz /tallo en dos condiciones hídricas. Los genotipos evaluados fueron *L. corniculatus* (Lc) , *L. uliginosus* (Lu) y los híbridos H1-6 y H1-87 en dos condiciones de disponibilidad de agua, a capacidad de campo (CC) y a  $\frac{1}{4}$  de capacidad de campo  $\frac{1}{4}$  CC. Las barras verticales indican el desvío estándar.

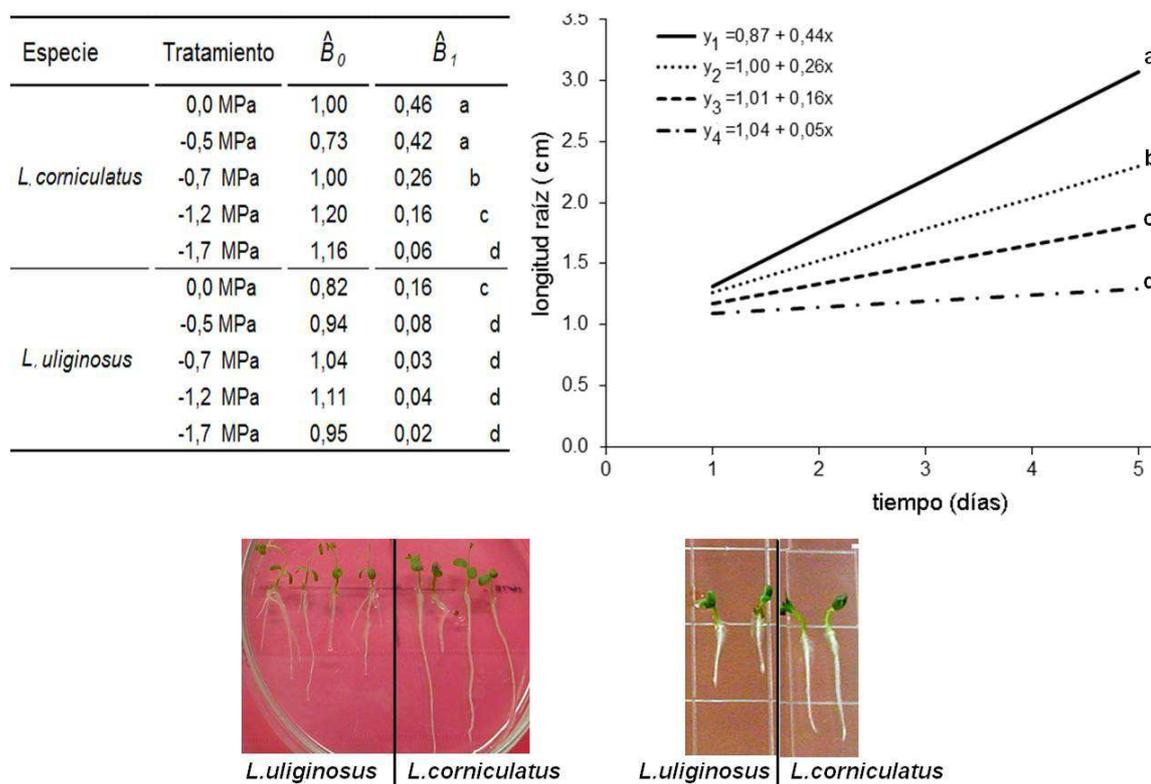
## 5. Evaluación fenotípica de la respuesta a estrés de los híbridos de la F<sub>2</sub>

### 5.1 Crecimiento radicular en bajo potencial osmótico

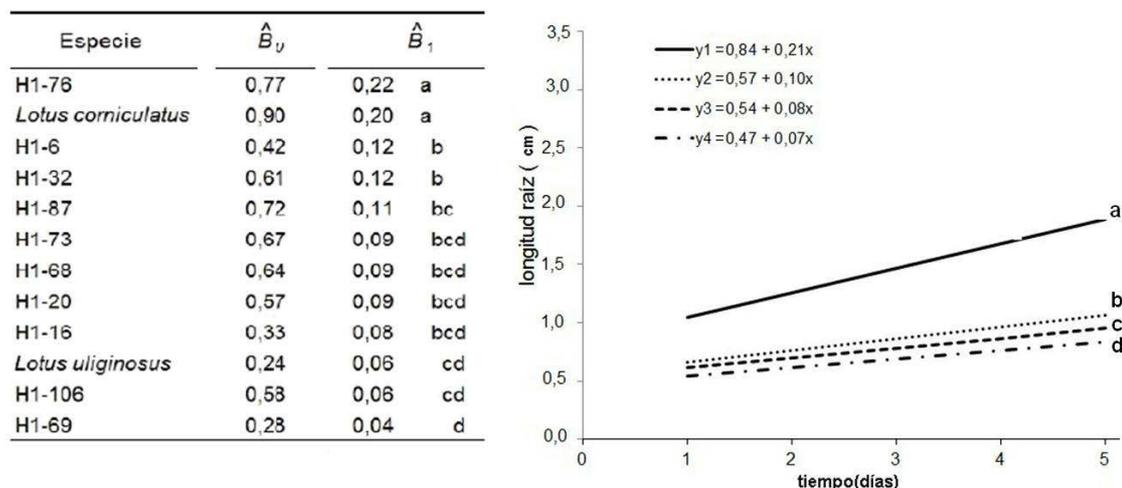
El PEG es un agente osmótico que permite simular las condiciones de un suelo con distintos grados de disponibilidad de agua, sin que la molécula interfiera con el metabolismo de la planta, dado que no puede ingresar en la célula. Por esto, para evaluar el crecimiento radicular en diferentes potenciales osmóticos se usó PEG 8000. Para evaluar el efecto del déficit hídrico sobre el crecimiento de las raíces, las semillas se pregerminaron en agar – agua y se transfirieron a placas con PEG con concentraciones suficientes para generar potenciales osmóticos de 0, - 0,5, - 0,7, - 1,2 y – 1,7 Mpa, donde permanecieron 5 días. El crecimiento radicular se representó de acuerdo a una regresión lineal. En la figura 24 se

muestran las rectas que representan el crecimiento de radicular de los parentales para cada potencial osmótico. *L. corniculatus* en la situación control y en - 0,5 Mpa presentó la mayor tasa de crecimiento radicular, que se ajustó a la recta con mayor pendiente (Fig. 24) mientras que a - 0,7 MPa el crecimiento disminuyó, y la pendiente fue menor.

Cuando el potencial osmótico fue de -1,2 Mpa el crecimiento radicular de *L. corniculatus* fue el mismo que el de *L. uliginosus* en la condición control (Fig. 24). Por último, las raíces de *L. corniculatus* tuvieron el menor crecimiento a -1,7MPa, que fue el mismo crecimiento radicular de *L. uliginosus* a -0,5, - 0,7, -1,2 y -1,7 MPa. Una vez establecidas las diferencias en la tasa de crecimiento radicular para las especies parentales, se seleccionó un potencial osmótico único, de - 1,0 Mpa, para evaluar en forma conjunta a las especies parentales y los híbridos  $F_2$  (Fig. 24 B).



**Figura 24.** Representación de la tasa de crecimiento radicular mediante rectas de regresión múltiple de las especies parentales en distintos potenciales osmóticos. En la tabla figuran los valores de la intersección de la recta con el eje de las ordenadas ( $B_0$ ) y los valores de la pendiente ( $B_1$ ). Letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre los valores de las pendientes. La pendiente de cada recta está seguida de letras que indican diferencias significativas. Las fotos que aparecen abajo muestran el crecimiento radicular de los parentales a 0 Mpa (izquierda) y - 1 Mpa (derecha).



**Figura 25.** Representación de la tasa de crecimiento radicular mediante rectas de regresión múltiple de los híbridos en  $-1$  Mpa. En la tabla figuran los valores de la intersección de la recta con el eje de las ordenadas ( $B_0$ ) y los valores de la pendiente ( $B_1$ ). Letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre los valores de las pendientes. La pendiente de cada recta está seguida de letras que indican diferencias significativas.

Para este ensayo, se usaron semillas de los híbridos  $F_1$ , es decir la  $F_2$ , además de los parentales, en un único potencial osmótico (Fig. 25). Para determinar el efecto de éste se midió la longitud de la raíz el día 0 y al quinto día de crecimiento en la condición de  $-1,0$  Mpa. A partir de la tasa de crecimiento radicular se pudieron establecer cuatro categorías. La primera correspondió a *L. corniculatus* y el híbrido H1-76 que tuvieron el mayor crecimiento radicular (Fig. 25). La segunda categoría incluyó a los híbridos H1-6, H1-32 y H1-87 con crecimiento menor que *L. corniculatus* y el híbrido H1-76 (Fig. 25). En la tercera categoría quedaron H1-73, H1-68, H1-20 y H1-16 que presentaron menor crecimiento radicular (Fig. 25). A la cuarta categoría, que abarca a genotipos que presentaron menor crecimiento radicular correspondieron *L. uliginosus* y los híbridos H1-106 y H1-69.

## 5.2 Evaluación del comportamiento a campo de los híbridos

El ensayo de campo se realizó en el *shelter*, y se definieron los siguientes tratamientos: a. control, que consistió en el suministro de agua equivalente a la lluvia registrada durante el período abril 2009 a abril 2010 y b. 75, 50 y 25 % de la evapotranspiración potencial (ETP), calculada en base a la ecuación de Penman-Monteih. Las variables determinadas en el ensayo a campo fueron: conductancia estomática, producción de biomasa de la parte aérea, desarrollo radicular y presencia de rizomas.

### 5.2.1 Conductancia estomática

La conductancia estomática se determinó en folíolos expandidos, 4 – 5 desde el ápice, en horas de la mañana. Entre los genotipos evaluados, *L. uliginosus*, *L. corniculatus* y el híbrido H1-6, no se encontraron diferencias significativas en la conductancia estomática, que varió entre 66,4 y 137,6  $\mu\text{mol de H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ . Sin embargo, la variación en este parámetro fue observada entre los tratamientos (Cuadro 13). Cuando se realizó el test de comparación de medias entre ellos, la conductancia estomática se pudo agrupar en dos categorías, una que incluyó los tratamientos correspondientes al 25 y 50% de evapotranspiración, y otra que correspondió al 75% de evapotranspiración y al control (lluvia) (Cuadro 13).

**Cuadro 11.** Conductancia estomática en tres tratamientos hídricos de los parentales y del híbrido H1-6. Los datos son el promedio de 5 repeticiones realizadas en 9 plantas de cada genotipo, crecidas en el *shelter*.

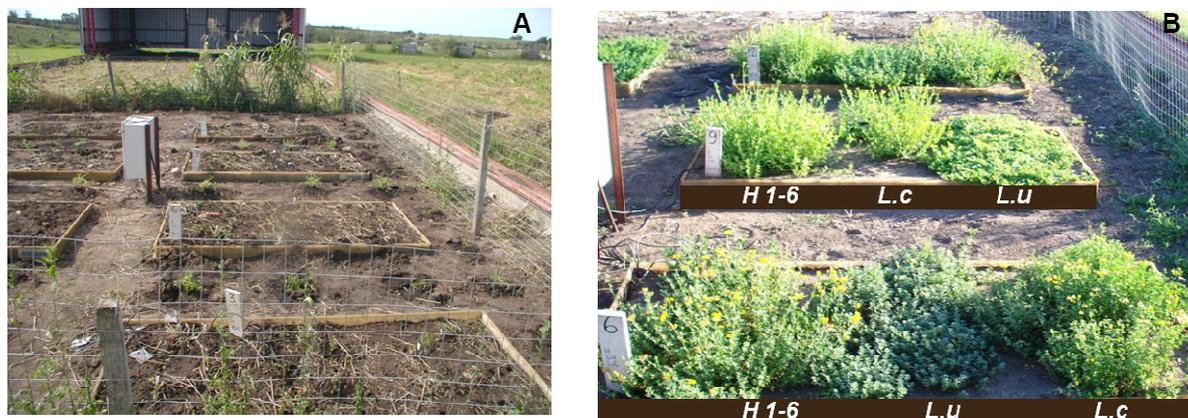
| Tratamiento            | Media  | Error estándar |
|------------------------|--------|----------------|
| 25% de la ETP          | 66,43  | 5,6            |
| 50% de la ETP          | 66,03  | 5,5            |
| 75% de la ETP          | 135,74 | 7,7            |
| Lluvia (control)       | 137,57 | 7,3            |
| Genotipo               |        |                |
| Híbrido H1-6           | 105,34 | 5,5            |
| <i>L. corniculatus</i> | 108,30 | 5,5            |
| <i>L. uliginosus</i>   | 95,15  | 5,3            |

### 5.2.2 Producción de biomasa de la parte aérea

La biomasa producida por las plantas en las cuatro condiciones hídricas definidas (5.2) se determinó en 6 cortes realizados durante el transcurso del ensayo, simulando la condición de pastoreo. El ensayo se sembró el 10 de abril (Fig. 26 A), y las fechas de corte definidas de acuerdo al desarrollo vegetativo de las plantas, fueron: 10 de junio de 2009, 19 de agosto, 14 de octubre, 15 de diciembre, 26 de enero de 2010 y 18 de marzo de 2010.

Para el tratamiento control (lluvia), los valores de biomasa acumulada en cada fecha de corte se representan en la figura 27 A. En cada fecha de corte no hubo diferencias significativas en la producción

de biomasa. De todas formas, a pesar de no haber diferencias significativas en condiciones no limitantes de agua, parece haber una tendencia de *L. uliginosus* de acumular más biomasa que *L. corniculatus*.

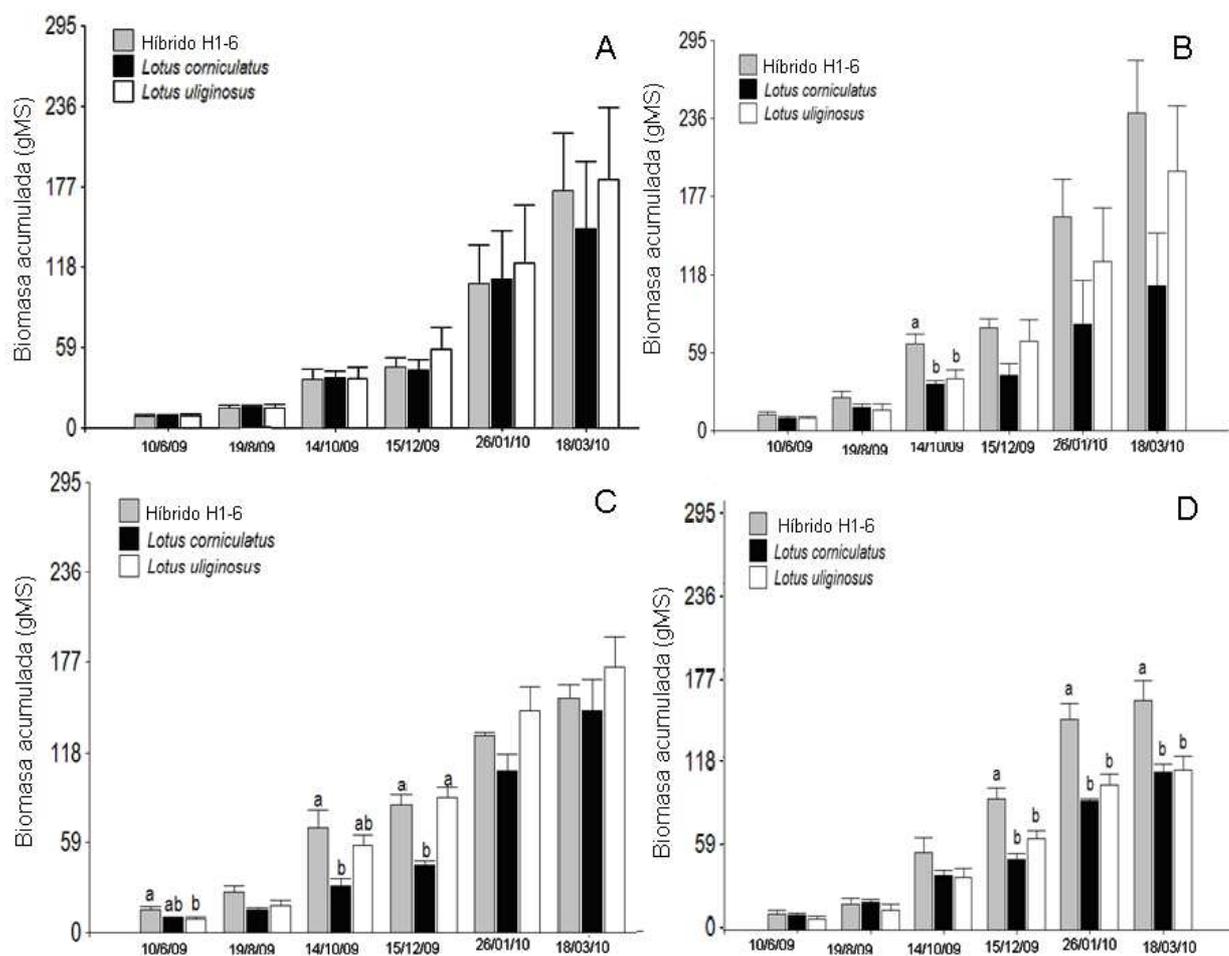


**Figura 26.** Ensayo con diferentes regimenes hídricos realizados en *shelter*. **A.** Parcelas el día de instalado el ensayo. Cada parcela (lisímetro) tiene 18 plantas (6 de cada genotipo) en cada tratamiento (control: lluvia, 75%, 50% y 25% de la ETP). Los genotipos evaluados fueron *L. corniculatus* (Lc) , *L. uliginosus* (Lu) y los híbridos H1-6 y H1-87. **B.** Desarrollo vegetativo de las plantas a los 9 meses. Los tratamientos se asignaron al azar y se hicieron tres repeticiones por cada tratamiento.

La biomasa producida con 75 % de la ETP presentó diferencias significativas en el tercer corte, que coincidió con el corte de primavera (Fig. 27 B). El híbrido produjo mayor cantidad de biomasa acumulada, y si bien en el resto de los cortes no presentó diferencia significativa con los parentales, mantuvo la misma tendencia con mayores valores absolutos de producción de biomasa acumulada.

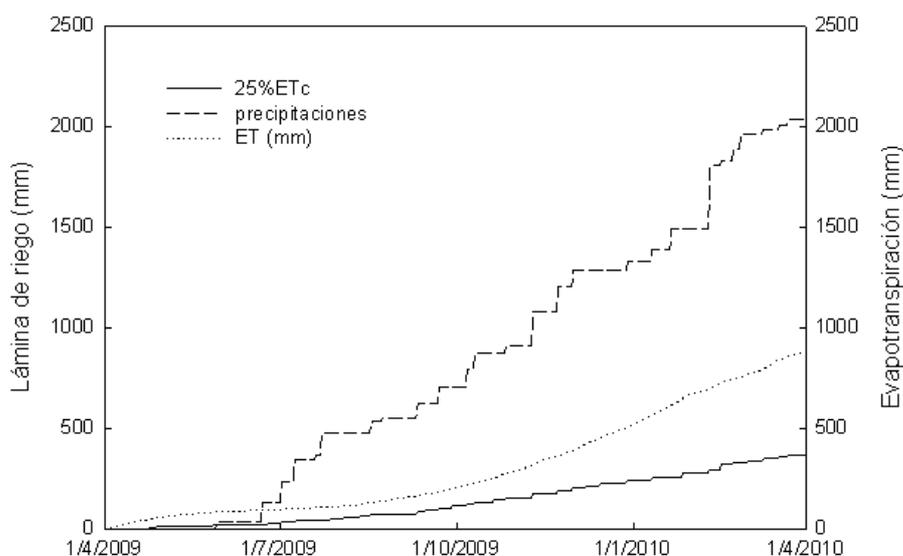
Para la condición del 50% de la ETP, se observan diferencias significativas en la acumulación de biomasa en el primer, tercer y cuarto corte (Fig. 27 C). En el primer corte el híbrido produjo más biomasa que *L. uliginosus* pero produjo igual biomasa que *L. corniculatus*. Sin embargo en el tercer corte el híbrido produjo más biomasa que *L. corniculatus*, pero igual que *L. uliginosus*, mientras que en el cuarto corte, produjo mayor biomasa que *L. corniculatus* pero no se diferenció de *L. uliginosus* (Fig. 27. C).

En la condición más limitante en cuanto a disponibilidad de agua, 25 % de la ETP, el híbrido produjo mayor biomasa acumulada en el cuarto corte, al final de la primavera (Fig. 27 D) y durante los meses de verano. En los tres últimos cortes hubo diferencia significativa en la producción de biomasa del híbrido H1-6 respecto a las especies parentales.



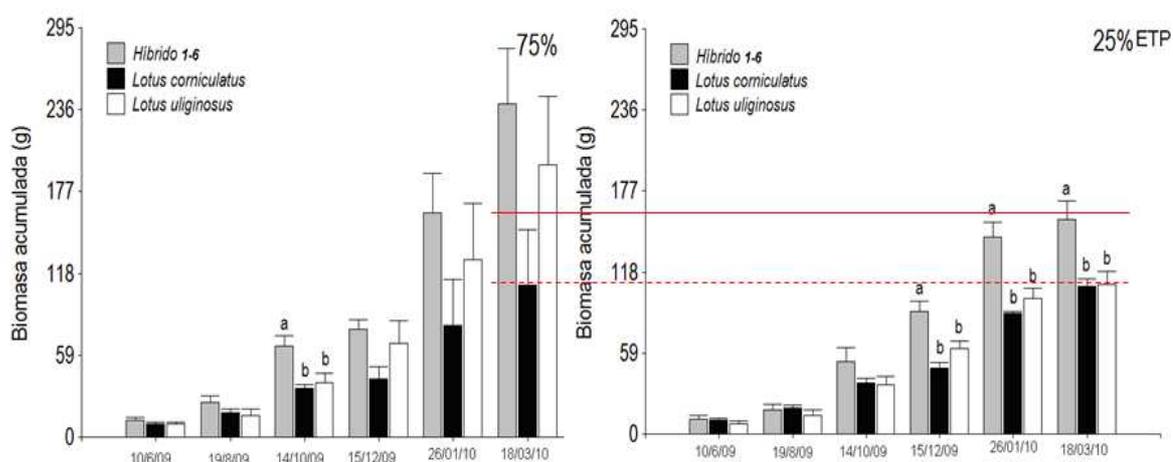
**Figura 27.** Biomasa acumulada en las fechas de corte. La biomasa se expresa como gramos de peso seco promedio de 9 plantas de cada genotipo. A. Tratamiento control (lluvia), B. 75% de la ETP, C 50 % de la ETP y D 25 % de la ETP. Las barras verticales representan el desvío estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas para  $p < 0,05$  según la estadística de Tukey.

Cuando se comparó el tratamiento control respecto a la ETP de una pastura, la lluvia supera ampliamente a la demanda del cultivo. En este sentido, el tratamiento control (lluvia) superó la demanda de ETP de los genotipos de lotus cultivados (Fig. 28). Como muestra la figura 29 las lluvias registradas en el período, alcanzaron valores superiores al promedio anual (1100mm). De todas formas, el tratamiento de 25 % de la ETP se encuentra por debajo de su demanda hídrica. Sin embargo también debe considerarse que el tratamiento control puede haber sufrido exceso hídrico.



**Figura 28.** Precipitación acumulada y ETP en un año. La ETP (25 %) se calculó según la ecuación de Penman-Monteih.

Cuando se comparó la producción de biomasa final entre tratamientos que produjeron la menor y la mayor cantidad de biomasa (Fig. 29), se observó que la producción de *L. corniculatus* es la misma en las dos situaciones hídricas. Sin embargo el híbrido H1-6 produjo en el orden del 30 % más de biomasa cuando la condición de agua no es restrictiva, y también produce más cuando la ETP se situó en el 25% (Fig. 30).



**Figura 29.** Biomasa producida al final del ensayo en *shelter*. Los valores de biomasa corresponden al promedio del peso seco acumulado. Las barras verticales corresponden al desvío estándar y las letras diferentes a diferencias si y las letras diferentes muestran diferencias significativas para un  $p < 0,05$  en la estadística de Tukey.

### 5.2.3 Desarrollo radicular y presencia de rizomas

A un año de crecimiento a campo en el *shelter*, se evaluó el número de plantas vivas, el largo y diámetro de las raíces y la presencia de rizomas (Cuadro 14). Respecto a la longitud de las raíces el problema surgido a nivel de campo fue que la extracción completa de la raíz no permitió determinar su longitud real, y por lo tanto el análisis estadístico no permitió establecer diferencias entre los genotipos en los distintos tratamientos.

Hubo diferencias en el diámetro de la corona (Cuadro 14), los valores mayores correspondieron a *L. uliginosus* en condición control, pero se observó un incremento en el diámetro de la corona del híbrido H1-6 que no se observó en *L. corniculatus*. En relación al número de rizomas (Fig. 30), el híbrido presentó diferente porcentaje en los distintos tratamientos.



**Figura 30.** Sistema radicular y rizomas al momento de levantar el ensayo. La flecha indica un rizoma en el híbrido H1-6.

En la condición de menor disponibilidad de agua se observó el menor porcentaje de rizomas, en la condición más cercana al 100 % de la ETP se vio un mayor porcentaje de rizomas. En el tratamiento de lluvia, el porcentaje fue intermedio. En la figura 30 se muestran los rizomas desarrollados por el híbrido H1-6, al año de crecimiento, en el tratamiento control.

**Cuadro 14.** Características morfológicas de los genotipos crecidos en el *shelter*. Las determinaciones se hicieron un año después de instalado el ensayo. Los datos de las columnas 4 y 5, corresponden a la media de 9 repeticiones  $\pm$  el desvío estándar, letras diferentes corresponden a diferencias significativas, de acuerdo a la estadística de Fisher para  $p < 0,05$ . La presencia de rizomas se hizo por apreciación visual.

| Tratamiento      | Genotipo               | Plantas vivas | Largo raíz (cm) | Diámetro(cm)      | Rizoma |
|------------------|------------------------|---------------|-----------------|-------------------|--------|
| 25% de la ETP    | Híbrido H1-6           | 6             | 33,6 $\pm$ 2,55 | 4,1 $\pm$ 1,8     | 16 %   |
|                  | <i>L. corniculatus</i> | 8             | 39,1 $\pm$ 3,5  | 2,2 $\pm$ 0,9     | no     |
|                  | <i>L. uliginosus</i>   | 9             | 33,2 $\pm$ 4,6  | 3,0 $\pm$ 1,2     | 33,3   |
| 50% de la ETP    | ...Híbrido H1-6        | 6             | 32,3 $\pm$ 2,3  | 4,9 $\pm$ 0,7     | 50%    |
|                  | <i>L. corniculatus</i> | 2             | 35,0 $\pm$ 2,9  | 4,5 $\pm$ 1,3     | no     |
|                  | <i>L. uliginosus</i>   | 9             | 27,0 $\pm$ 3,2  | 8,0 $\pm$ 2,1     | 66%    |
| 75% de la ETP    | ...Híbrido H1-6        | 6             | 43,6 $\pm$ 4,2  | 8,5 $\pm$ 1,4     | 66%    |
|                  | <i>L. corniculatus</i> | 2             | 55,7 $\pm$ 3,6  | 4,5 $\pm$ 0,5     | no     |
|                  | <i>L. uliginosus</i>   | 4             | 33,3 $\pm$ 2,5  | 9,1 $\pm$ 1,5     | 100%   |
| Control (lluvia) | ...Híbrido H1-6        | 5             | 39,5 $\pm$ 3,75 | 9,5 $\pm$ 0,11 a  | 30%    |
|                  | <i>L. corniculatus</i> | 2             | 37,8 $\pm$ 4,5  | 7,2 $\pm$ 0,65 a  | no     |
|                  | <i>L. uliginosus</i>   | 5             | 28,4 $\pm$ 3,42 | 17,8 $\pm$ 2,19 b | 100%   |

## IV DISCUSIÓN

### 1. Obtención de híbridos de *L. uliginosus* x *L. corniculatus* mediante rescate de embriones

La hibridación interespecífica permite obtener individuos que recombinan características de los padres, aunque el producto del cruzamiento puede resultar en un individuo diferente a los progenitores. En cualquier caso, ese producto de recombinación es único y aleatorio, lo que permite potencialmente, generar diversidad genética (Grant, 1999). Por otra parte, la hibridación interespecífica es por el momento la única alternativa viable para lograr progresos en el mejoramiento genético de características complejas, donde intervienen varios genes que no han sido identificados, como los responsables de la apertura de las vainas y la pérdida de semilla (*shattering*) (Grant, 1999). En *L. corniculatus* el *shattering* representa un problema en la medida que impide aumentar la producción de semilla, y genera una brecha entre la producción potencial de semillas y la que se obtiene (Guillén, 2007). También la hibridación interespecífica es una herramienta de interés que se ha usado como estrategia para el mejoramiento genético de lotus y se han obtenido híbridos con el propósito de aumentar la calidad del forraje (Kelman, 2006).

Para la generación de híbridos de lotus se han usado distintas alternativas. Somaroo y Grant (1971 y 1972) para obtener híbridos tetraploides de *L. uliginosus* x *L. corniculatus* tetraploide, usaron colchicina para obtener previamente tetraploides de *L. uliginosus*. Si bien con esta estrategia obtuvieron híbridos usando como madre a *L. uliginosus*, el cruzamiento recíproco entre estas especies no produjo ningún híbrido.

De los cruzamientos entre *L. uliginosus* (4X) x *L. corniculatus* (4X) y *L. corniculatus* (4X) x *L. uliginosus* (4X) obtuvimos híbridos en las dos direcciones, aunque el número de plantas regeneradas en cada caso fue diferente y claramente inferior cuando se usó como madres a *L. corniculatus* (4X). Estos cruzamientos se hicieron sin emasculación, debido a la autoincompatibilidad de las especies utilizadas. Esto constituye una ventaja dado que facilita el procedimiento de cruce dirigida, que es una técnica laboriosa dado el tamaño pequeño de las flores (Beuslink y Mc Graw 2000).

Uno de los parámetros a tener en cuenta para obtención de híbridos en cruzamientos intersepeíficos es la fertilidad de la planta madre. La PI 4 tuvo una abundante producción de flores y semillas, si bien no fue la que produjo el mayor número de semillas por vaina (Cuadro 6). A partir de la PI 4 se obtuvo el mayor número de plantas regeneradas, a pesar que el porcentaje de rescate de embriones fue

similar al de la PI 1. En este sentido nosotros no pudimos establecer una relación clara entre número de plantas regeneradas y la fertilidad de planta madre de la que provenían las semillas. Un ejemplo de esto ocurrió con la PI 2, con un abundante número de semillas y sólo 11 % de porcentaje de regeneración de plantas (Cuadro 6). Estas diferencias entre el número de flores y semillas obtenidas en la F<sub>1</sub> en relación a la cantidad de plantas regeneradas es de difícil interpretación, y pueden estar relacionadas con la distinta habilidad combinatoria entre las especies parentales (García de los Santos, et al., 2001).

El rescate de embriones ha sido y es utilizado en cruzamientos interespecíficos del género *Lotus* para superar barreras reproductivas entre las especies seleccionadas (O'Donoghue y Grant, 1988; Sharma et al., 1996; Galati et al., 2006). En cruzamientos entre especies diferentes de ese género se producen embriones, dado que la barrera es postcigótica. Jungamnovà y Řepróv (2006) en cruzamientos de *L. corniculatus* x *L. uliginosus* observaron que se producía la germinación y elongación del tubo polínico través del estilo, por lo tanto descartaron la presencia de las barreras precigóticas. A su vez, Řepróv y Hofbauer (2009) describieron las barreras postcigóticas presentes en cruzamientos de lotus. Estas barreras están relacionadas a defectos o anomalías en el desarrollo del endosperma, defecto que también observamos en las semillas inmaduras obtenidas en la F<sub>1</sub> obtenidas en ambas direcciones de los cruzamientos, en las que no se observó presencia de endosperma.

Řepróv y Hofbauer (2009) sólo observaron embriones en estadio globular luego de 7 días de desarrollo de la semilla, y con esos embriones no lograron recuperar plantas híbridas de *L. corniculatus* x *L. uliginosus*. Sin embargo nosotros logramos llegar a estados de desarrollo embrionario más avanzados, como corazón, torpedo y cotiledonar, poniendo las semillas inmaduras en un medio simple (MS). En este sentido, para el éxito en la regeneración de plantas fue determinante el estadio de desarrollo del embrión, y su color. Con estas consideraciones fue posible lograr un rescate de embriones exitoso en un rango del 11 al 25 % cuando la madre fue *L. uliginosus* (Cuadro 6) y del 7 % cuando la madre fue *L. corniculatus*. Para explicar esta diferencia en la capacidad de obtener plantas entre cruzamientos recíprocos se debe tener presente, entre las barreras postcigóticas que determinan el éxito o fracaso entre cruzamientos interespecíficos, el EBN (de *endosperm balance number*). Este concepto propuesto por Johnston et al. (1980), plantea que para tener éxito en el desarrollo del endosperma, se requiere una relación 2:1 en un factor genético hipotético, entre el progenitor femenino y el masculino, y que esta relación es más

importante que el nivel de ploidía para determinar el éxito en el cruzamiento (Martínez-Reyna y Vogel, 2002). El EBN funciona como un fuerte mecanismo de barrera postcigótica, que determina el aislamiento y la especiación en vegetales (Cornejo et al., 2006).

El EBN se ha establecido en cruzamientos entre especies del género *Solanum*, *Arachis*, *Medicago* y *Lycopersicum* (Geerts et al., 2002; Talluri, 2012; Carputo et al., 1997), sin embargo no se encontraron referencias sobre el EBN en especies del género *Lotus*. De todas formas podemos pensar que la diferencia en el éxito de la regeneración de plantas, 198 cuando la madre fue *L. uliginosus* y 27 cuando fue *L. corniculatus*, sea consecuencia del EBN, dado que lo que cambia es la dirección de cruzamiento.

Geerts et al., (2002) atribuyen las diferencias en el porcentaje de embriones rescatados en cruzamientos en diferentes direcciones entre *P. vulgaris* y *P. polyanthus* a defectos asociados al desarrollo del endosperma, sin considerar el EBN. Estos autores plantearon tres causas posibles que pueden explicar la falta de desarrollo del endosperma. Una, es la no división del núcleo del endosperma con desarrollo de un endotelio compacto, otra es que el núcleo del endosperma se divide pero con retraso respecto a las divisiones del cigoto, y la tercera es que se desarrollan varios núcleos en el endosperma, con excesiva vacuolización. Estas anomalías en la formación del endosperma provocarían el aborto del embrión. Según esta perspectiva, podríamos pensar que la siembra de las semillas F<sub>1</sub> inmaduras *in vitro* durante 10 días en medio de cultivo MS, previo al rescate, fue un factor determinante para la nutrición y desarrollo de embriones, porque cuando estos se extraían de semillas sin precultivo en medio MS, no se rescataban plantas a partir de ellos. En este sentido, Mehetre y Aher (2004) plantean que el éxito en el rescate de embriones depende en gran medida de la composición del medio de cultivo y cuanto más inmaduro es el embrión al momento de rescate, más dependiente será del medio de cultivo y la composición del medio deberá ser más compleja (Sharma et al., 1996).

En las vainas provenientes del cruzamiento de *L. uliginosus* x *L. corniculatus* fueron observados diferentes estadios de desarrollo del embrión dentro de una misma vaina (Cuadro 6 y Fig. 11). Esto evidencia una asincronía en el desarrollo de los óvulos. La falta de sincronización en el desarrollo de los óvulos es una estrategia generalizada en plantas alógamas para ampliar el período de receptividad de los óvulos (Sage et al., 1999).

## 2. Confirmación del estatus híbrido

Las especies utilizadas en los cruzamientos para la obtención de híbridos interespecíficos, *L. uliginosus* y *L. corniculatus*, no tienen marcadores morfológicos evidentes como diferentes pigmentos, forma de la hoja, distancia de entrenudos, entre otros. De hecho, los híbridos de la  $F_1$  crecidos en invernáculo, presentaron un parecido tal con *L. uliginosus*, que no permitió identificarlos. En cambio en la  $F_2$  en condición de campo en *shelter* no se pudieron diferenciar los híbridos de *L. corniculatus*. Como además, las flores no fueron emasculadas, pudo haber habido polinización entre plantas de la misma especie. Por estas razones fue necesario contar con técnicas de identificación precisas para confirmar el estatus híbrido de la progenie. Para esto se pusieron a punto dos técnicas para testar masivamente los híbridos putativos  $F_1$ : el tamaño del genoma por CF y mediante marcadores moleculares. Ambas metodologías son rápidas y con alto poder de resolución, si se las compara con otras como las isoenzimas o el conteo y análisis de cromosómico (Řeprová y Hofbauer, 2009).

La CF es una técnica potente y rápida para medir partículas celulares o sub-celulares como el núcleo, y en general ha sido más usada en células animales. Esta técnica también resultó ser útil en células vegetales para la estimación de su contenido de ADN, dado que el yoduro de propicio emite fluorescencia proporcional al contenido de ADN, que es detectada al pasar a través de un láser. Entre las ventajas de esta técnica está la repetibilidad de los resultados, simplicidad, y posibilidad de analizar alto número de muestras en poco tiempo (Doležel et al. 1991; Doležel y Bartôš 2005; Amano et al., 2007). Como se trata de un análisis cuantitativo es necesario el uso de un estándar interno, que en este caso fue *S. lycopersicum* que tiene 1,96 pg de ADN, un valor adecuado para trabajar con *L. uliginosus* y *L. corniculatus* que tienen contenidos de ADN de 2,22 pg y 2,50 pg respectivamente (Fig. 12). El contenido de ADN de los híbridos fue 2,28 pg y 2,44 pg (Figura 13), intermedio respecto a los parentales. Además, entre los híbridos evaluados se observó una dispersión en los valores del contenido de ADN que permitió agruparlos en tres categorías, una integrada por plantas con valores cercanos al parental masculino (*L. corniculatus*) otra más cerca del parental femenino (*L. uliginosus*) y una tercera intermedia entre las anteriores (Fig. 13).

De esta forma se pudo confirmar mediante CF que los individuos  $F_1$  analizados eran híbridos interespecíficos. Sin embargo no siempre ocurre que el contenido de ADN de los híbridos sea intermedio respecto al de los parentales. En el cruzamiento denominado recíproco (*L. corniculatus* x *L. uliginosus*)

hubo individuos con contenidos de ADN mayores a 2,50 (*L. corniculatus*), que igual sirvió para confirmar el estatus híbrido. Amano et al. (2007) determinaron híbridos interespecíficos e intergenéricos en las especies ornamentales *Gloriosa* spp., *Lottonia modesta* y *Sandersonia aurantica*, utilizando CF y RAPD. Cuando *S. aurantiaca* fue usada como parental, algunos híbridos intergenéricos, exhibieron valores mayores o menores que el valor promedio del contenido de ADN. La limitación de la CF surge cuando no se logra diferenciar el tamaño del genoma de parentales (Simonovick et al. 2007).

Otra estrategia para determinar el estatus híbrido es el uso de marcadores moleculares. Para lotus se dispone de marcadores definidos en la especie modelo *L. japonicus*, disponibles en la base de datos Kazusa. A partir de ésta se seleccionaron 18 secuencias y se usaron otras 2 suministradas por N. Sandall (Universidad de Dinamarca) (Cuadro 4). De los 10 microsatélites evaluados se seleccionaron 2 de ellos, TM1150 y EH380069, mostraron polimorfismo entre las especies parentales (Fig 14). Estos microsatélites permitieron diferenciar a los parentales entre sí, con una banda característica cada uno, y a los parentales de los híbridos que presentaban ambas bandas, una de cada parental (Fig. 14).

El microsatélite EH3880069 se encuentra dentro de la secuencia de un gen que codifica para una enzima de la síntesis taninos condensados. La función del gen se dedujo por homología con la secuencia de ese gen en *Arabidopsis thaliana*. Los microsatélites dentro de genes revisten una importancia aún mayor si están asociados a características de interés, como en este caso. El polimorfismo observado con este microsatélite entre ambos parentales podría estar relacionado a diferencias en la cantidad y/o calidad de estos taninos, debido a que hay diferencias en esta característica en las distintas especies del género *Lotus* (Gruber, 2008; Acuña et al., 2008). Este tipo de microsatélite intragénico es particularmente útil para utilizar en selección asistida por marcadores.

Los microsatélites se pueden utilizar en especies diferentes y también en diferentes géneros (Eujayl et al., 2004; Gaitán-Solís et al., 2002; Wang et al., 2004; Mian et al., 2005). La base de datos Kazusa ([www.kazusa.or.jp/lotus/](http://www.kazusa.or.jp/lotus/)) permite el acceso a la información generada a partir del proyecto de secuenciación de *L. japonicus*. El uso de esta información en genética comparativa entre una especie modelo *L. japonicus* y especies de uso agronómico como *L. corniculatus* y *L. uliginosus* puede ser útil para avanzar en el mejoramiento genético (Zhu et al., 2005). Una idea importante detrás del concepto de leguminosa modelo, es el aprovechar la sintenia entre especies modelo y cultivadas para acelerar el

aislamiento y la caracterización de genes de importancia en las leguminosas cultivadas menos caracterizadas. Esta estrategia, requiere que las regiones de los genomas respectivos contengan los mismos genes, en el mismo orden en los modelos y las cultivadas. Los marcadores de anclaje, revelaron una conservación amplia (macrosintenia) entre poroto y Lotus (informe proyecto Lotassa, cap 2)

Nualsri et al., (1998) utilizaron exitosamente RAPD para verificar la obtención de híbridos en el cruzamiento entre germoplasma autógeno de *L. corniculatus* y 5 accesiones de especies de *Lotus* spp. originarias de Marruecos con presencia de rizomas. Sin embargo, los RAPD presentan limitaciones en su aplicación, derivadas de la escasa repetibilidad de los resultados. Por el contrario, los microsatélites presentan muy buena repetibilidad, naturaleza multialélica, así como amplia cobertura y distribución en el genoma (Powell et al., 1996). Además son codominantes y permiten identificar la contribución de cada parental. Esto también contribuye a que sean más usados que los RAPD, que son dominantes y no permiten distinguir los individuos heterocigotas en la F<sub>1</sub> (Burrow y Blake, 1998).

### 3. Fertilidad de los híbridos de la F<sub>1</sub>

Los híbridos F<sub>1</sub> se cruzaron en forma manual entre sí (policruza) y las plantas produjeron un número variable de semillas en la primera estación de crecimiento. Tres plantas F<sub>1</sub> produjeron más de mil semillas (Cuadro 7), lo que representa una producción mayor en relación a las otras plantas evaluadas. De todas formas, sería posible mejorar la fertilidad de estas plantas híbridas retrocruzándolas con los parentales, alternativa usada en *Lotus* spp. por Řeprova y Hofbauer (2009). Isobe et al. (2001) en cruzamientos interespecíficos de *Trifolium* spp. también consideraron a los retrocruzamientos como una forma de aumentar la fertilidad de los híbridos. La escasa fertilidad de los híbridos, y en algunos casos la esterilidad, fue atribuida a la falta de cromosomas homólogos, que impide el apareamiento de los mismos durante la meiosis (Van Tuyl y De Jeu).

En relación al tamaño de la semilla del híbrido, a pesar de no haberse cuantificado, se observó que es de mayor tamaño que la semilla de *L. uliginosus* y levemente inferior al de la semilla de *L. corniculatus*. El tamaño de la semilla, está asociado al vigor de la planta, y podría determinar una mejor capacidad de implantación del híbrido frente a *L. uliginosus*, que presenta dificultad en la implantación por el escaso vigor inicial de las plantas (Ayala y Carámbula, 2009). Por otro lado, para *L. corniculatus* tiene

una alta mortalidad de plantas por susceptibilidad a enfermedades como el *damping off* (Wen et al., 2002), y en Uruguay de 600 plantas por m<sup>2</sup> se implantan efectivamente alrededor de 200 (Pérez et al., 2000).

Entre los híbridos se encontró variabilidad de la fertilidad del polen, pero al ser una especie alógama no afectaría la producción de semilla.

#### **4. Evaluación de los híbridos en condiciones de estrés**

##### **4.1 Transpiración y EUA**

Varios procesos fisiológicos de la planta pueden ser alterados por el déficit hídrico (Chaves et al., 2009), y uno de los más estudiados es la fotosíntesis. La tasa fotosintética decrece con progresivas disminuciones del potencial hídrico en el suelo (Jaleel et al., 2009) y este descenso es consecuencia del cierre estomático, una de las respuestas más inmediatas de la planta frente al déficit hídrico (De Boeck et al., 2007). La pérdida de agua de la planta hacia la atmósfera tiene lugar por dos vías: a través de la cutícula y por los estomas. La cutícula produce una fuerte resistencia a la pérdida de agua, y sólo un 5% que se pierde por esta vía (Taiz y Zeigler, 2006), que no es regulable a corto plazo. La transpiración estomática está regulada por la conductancia estomática (Verslues et al., 2006) y la medición de la pérdida de agua por los folíolos es una manera de comparar el comportamiento estomático entre genotipos, con resultados menos variables en condición de humedad y temperatura controladas.

La pérdida de agua por folíolos de los parentales y de los híbridos H1-6 y H1-87 se evaluó en condiciones controladas (Fig. 18). Si bien no se observaron diferencias significativas en este parámetro entre los genotipos, *L. uliginosus* proveniente del tratamiento 100 % de HR mostró en valores absolutos mayor pérdida de agua respecto a los otros genotipos, lo que sería consecuencia de un ajuste estomático más lento que los otros.

Otro parámetro que puede ser evaluado a través de la actividad estomática es la EUA. El cierre estomático, provoca una disminución de la conductancia estomática (Mafakhire et al., 2010; Lawlor 2002) y como consecuencia de esto una respuesta rápida en la apertura o cierre de los estomas determinará una mayor eficiencia en el intercambio gaseoso de H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub>. La EUA de las especies parentales y los híbridos H1-6 y H1-87 no presentó diferencias significativas en condiciones de déficit hídrico, definido como ¼ de CC. Si bien no fuimos capaces de determinar diferencias, en los tres ensayos realizados con este

propósito no controlamos la evapotranspiración del sustrato, que se consideró igual en todos los casos. Sin embargo recientemente, en determinaciones de la EUA en RILs (*recombinant imbrend lines*) de lotus realizadas en el Laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía se pudieron establecer diferencias en ese parámetro (Quero, com. pers.). Muttoni (2008) pudo determinar diferencias en la EUA, entre genotipos de *L. corniculatus* sensibles y tolerantes a sequía. En nuestro caso, a pesar de no haber diferencias significativas entre los genotipos, la EUA en condición de estrés hídrico aumentó el valor absoluto en *L. corniculatus* y en los híbridos, mientras que en *L. uliginosus* descendió.

Cuando se determinó la EUA a través de la discriminación isotópica del  $^{13}\text{C}$  ( $\Delta^{13}\text{C}$ ), criterio que es usado para apoyar el mejoramiento genético, hubo diferencias significativas entre los materiales evaluados en condición de estrés hídrico ( $\frac{1}{4}$  CC). El  $^{13}\text{CO}_2$  por ser más pesado que el  $^{12}\text{CO}_2$  tiene una tasa más baja de difusión en la hoja y también de asimilación por la rubisco, respecto a las del  $^{12}\text{C}$ . Por esto la proporción de  $^{13}\text{C}$  es menor en los tejidos vegetales que en la atmósfera. Esta proporción varía con la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  en la hoja, y depende de la conductancia estomática.

En la condición de estrés hídrico y en CC *L. corniculatus*, presentó la mayor  $\Delta^{13}\text{C}$  (Fig. 22), pero tuvo menor EUA respecto a *L. uliginosus* y a los híbridos H1-6 y H1-87 (Fig. 21). De hecho, los altos rendimientos de las cosechas están asociados a alto consumo de agua, que significa una menor EUA, lo que implica un aumento de  $\Delta^{13}\text{C}$  (Tsialtas y Tokatlidis, 2008). Los genotipos que muestran altos valores de producción de biomasa y de  $\Delta^{13}\text{C}$  en ambientes con déficit hídrico, tienen mayor capacidad de explorar el suelo a través de un sistema radicular que alcanza los horizontes más profundos (Tsialtas y Tokatlidis, 2008). Dentro de los mecanismos que cuentan las plantas para superar la condición de sequía se encuentran los cambios morfológicos, como disminución del área foliar o desarrollo de sistema radicular profundo, que aumenta la relación raíz / tallo (Levitt 1980). *L. corniculatus* mostró un incremento de la relación raíz / tallo en respuesta al déficit hídrico (Fig. 23) lo que debe ser considerado para explicar, en parte, su mejor tolerancia a la sequía respecto a *L. uliginosus*.

La  $\Delta^{13}\text{C}$  de *L. uliginosus* fue menor que la de *L. corniculatus* (Fig. 22), lo que se relaciona con la menor conductancia estomática en condición de déficit hídrico, y con la mayor cantidad de  $^{13}\text{C}$  en sus tejidos. En relación a este parámetro, los híbridos presentaron valores intermedios de  $\Delta^{13}\text{C}$  en la situación control. Esto permite proponer que durante la situación de déficit hídrico superarían a *L. uliginosus* en la

medida que controla mejor la pérdida de agua, debido a una mayor capacidad para regular la actividad estomática.

La  $\Delta^{13}\text{C}$  es usada para asistir el mejoramiento genético porque da información precisa sobre la EUA, y no es una técnica destructiva. En cuanto a la limitación de su uso hay que considerar que no es un estimador instantáneo y se necesita de un espectrómetro de masa, que aunque su uso está cada vez más difundido (Tsiatas y Tokatlidis 2008), representa un costo importante.

Otro parámetro asociado a la evaluación de la actividad estomática fue la medición de la conductancia estomática que se determinó en los parentales y en plantas  $F_2$  del híbrido H1-6, creciendo en condiciones de campo (*shelter*). La conductancia estomática, presentó diferencias significativas entre los tratamientos con diferente cantidad de agua en suelo, pero no entre los genotipos (Cuadro 11). La conductancia estomática de los genotipos evaluados en los tratamientos a 25% y a 50% de la ETP fue significativamente diferente respecto a los obtenidos en los tratamientos a 75 % de ETP y al control (lluvia). La conductancia estomática es una medida muy útil en la evaluación de la respuesta al déficit hídrico. Sin embargo tiene como principal desventaja la alta variabilidad, debida a la luz y a la presión de vapor del  $\text{CO}_2$ , aspectos que deben ser controlados para minimizar errores en su medición (Munns et al., 2010). En el ensayo de campo, *L. corniculatus* tuvo la mayor conductancia estomática, el híbrido ocupó un lugar intermedio y *L. uliginosus* la menor. Estos resultados obtenidos en el ensayo de campo, en términos generales son concordantes con la pérdida de agua por los folíolos realizada en el laboratorio, que también es una forma de evaluar el comportamiento estomático (Fig. 18).

#### **4.2 Parámetros de fluorescencia y tolerancia a estrés**

El descenso de la actividad estomática trae como consecuencia una disminución en la actividad fotosintética. (Flexas et al., 2002). Esta actividad depende de la eficiencia fotosintética estimada a través de la relación  $F_v/F_m$ , que refleja la eficiencia cuántica potencial del PSII y se usa como un indicador de la eficiencia fotosintética de las plantas (Dell y Toivonen, 2003). La eficiencia cuántica es regulada por mecanismos de control fisiológico que optimizan el desempeño de la planta y proveen protección de los efectos dañinos como la luz excesiva (Krall y Edward 1992). Factores de estrés como la sequía o las temperaturas extremas incrementan el riesgo y gravedad de la fotoinhibición (Cornic 1994, Flexas y Medrano 2002).

La relación Fv/Fm de *L. uliginosus*, *L. corniculatus* y de los híbridos H1-6 y H1-87 se mantuvo constante hasta el día 5 después de iniciados los tratamientos de estrés, y mostró un descenso leve al séptimo día en el tratamiento que combinó estrés hídrico y térmico. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Sainz et al., (2010), en el modelo *L. japonicus* en las mismas situaciones de estrés. De esta forma, al no variar la relación Fv/Fm se puede inferir que los fotosistemas no se dañaron como consecuencia del estrés impuesto, lo que puede deberse a la deriva de los electrones a otros destinos.

Después de 6 días en condición de estrés hídrico y térmico se produjo un descenso en la relación Fv/Fm similar en los híbridos H1-6 y H1-87 y *L. uliginosus*, mientras que en *L. corniculatus* la relación Fv/Fm se mantuvo constante. Recién el día 7 hubo un descenso de la relación Fv/Fm en todos los genotipos (Cuadro 9). De esta forma, *L. corniculatus* fue el genotipo más tolerante a la combinación de ambos estreses, lo que podría estar relacionado con su mayor tolerancia al estrés ambiental. De hecho es el genotipo más tolerante a sequía y el de mayor distribución geográfica a nivel mundial (Díaz et al., 2005b).

El NPQ es otro parámetro usado para interpretar las respuestas de la fotosíntesis ante diferentes agentes causantes de estrés. Los valores de NPQ, determinados junto a la relación Fv/Fm, no superaron en ninguno de los tratamientos el valor de 0,5 (Cuadro 10). De esta forma no parece haber daño en la maquinaria fotosintética como consecuencia de los estreses ensayados, dado que el NPQ indica daño cuando sus valores se sitúan entre 0,5, y hasta 1,0 (Broetto et al., 2007).

El contenido de las clorofilas a y b es un indicador de la capacidad de fotosíntesis de las plantas (Hassanzadeh et al., 2009). Los valores de clorofila a, no presentaron diferencias entre los genotipos ni entre los tratamientos pero la clorofila b mostró un incremento marcado en los tratamientos de estrés hídrico y térmico, principalmente en los híbridos H1-6 y H1-87 (Cuadro 8). Este resultado reafirmaría que el destino del exceso de electrones no tiene como blanco a los pigmentos fotosintéticos. Sainz (2008) encontró que la relación clorofila a / clorofila b está relacionada a diferente termosensibilidad entre *L. corniculatus* y *L. japonicus*.

#### **4.3 Acumulación de prolina**

Una estrategia celular para enfrentar el déficit hídrico es el ajuste osmótico a través de la acumulación de solutos compatibles (Anjum et al., 2011; Yoo et al., 2009). El ajuste osmótico por un lado

mantiene la turgencia celular y el potencial hídrico del tejido y por otro genera una diferencia de potencial hídrico con el suelo, lo que permite que la planta continúe absorbiendo agua bajo condiciones de sequía. Entre los solutos que se acumulan se encuentran azúcares solubles, la glicín-betaína y la prolina. La prolina ha sido ampliamente estudiada ya que su acumulación es una respuesta temprana y rápida de las plantas expuestas a situación de estrés y se le han propuesto varias funciones (Szabados y Saviouré, 2010; Anjum et al., 2011).

Lotus es una especie que acumula prolina en respuesta al déficit hídrico (Borsani et al. 1999; Díaz et al., 2005a, Díaz et al., 2010). Cuando se analizó en *L. corniculatus*, *L. uliginosus* y los híbridos H1-6 y H1-87 la acumulación de prolina como respuesta déficit hídrico, se encontró que excepto *L. uliginosus*, todos acumularon más prolina que el control, y que el híbrido H1-6 acumuló más que los otros genotipos, tanto en estrés hídrico como en hídrico más térmico (Fig. 17). A diferencia de *L. uliginosus*, la acumulación de prolina en condición de estrés hídrico más térmico en *L. corniculatus* y en los híbridos H1-3 y H1-87 fue menor la obtenida en condición de estrés hídrico (Fig. 17). En alta temperatura algunas especies pueden inhibir la acumulación de prolina inducida por estrés hídrico (Gür et al., 2010, Rizhsky et al., 2004) por lo que ciclos más largos de alta temperatura pueden evitar la acumulación progresiva de prolina. Esto podría explicar el descenso de su concentración cuando se suma al estrés hídrico el térmico.

#### 4.4 Defensa antioxidante enzimática

Otra consecuencia temprana del déficit hídrico en las plantas es la generación de ERO. La acumulación de ERO está relacionada con la actividad de enzimas detoxificadoras, por lo que su análisis es clave para entender los mecanismos de respuesta frente al daño oxidativo (Bandurska et al., 2010). Enzimas antioxidantes como SOD, CAT y APX desempeñan un papel central en el metabolismo de las plantas sometidas a estrés ambiental, como la sequía (Xu et al., 2010). La SOD cataliza la reacción de dismutación de aniones superóxido en  $O_2$  y  $H_2O_2$  (Scandalios et al., 1993). El  $H_2O_2$  puede ser detoxificado por enzimas como las catalasas y peroxidases.

El análisis de la actividad SOD en respuesta a déficit hídrico en los distintos genotipos mostró que a excepción del híbrido H1-87, todos incrementaron la actividad de esta enzima respecto al control (Fig. 20 A). El incremento de la actividad SOD en condición de estrés hídrico es una respuesta bien conocida en *L. corniculatus* (Borsani et al., 2001; Díaz et al. 2005a; Sainz et al., 2010) y nuestros resultados confirman que

esta respuesta también la tiene *L. uliginosus*. El híbrido H1-87 presentó actividad SOD basal significativamente más alta que el resto de los genotipos y ésta no varió como consecuencia del déficit hídrico. La alta actividad basal SOD en el híbrido puede conferirle ventajas en la tolerancia al estrés, como se ha encontrado en otras especies vegetales (Arora et al., 2002). En relación a las enzimas que metabolizan el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observaron respuestas variables. En *L. corniculatus* descendió la actividad CAT y APX en situación de estrés, mientras que en *L. uliginosus*, la APX también disminuyó en situación de estrés, pero la actividad CAT se incrementó en esas condiciones. Sin embargo en los dos híbridos aumentaron la actividad APX y CAT en respuesta al estrés. Estas diferencias en el comportamiento de las enzimas antioxidantes explicarían el diferente nivel de daño oxidativo evaluado a través de TBAR, en los cuatro genotipos.

La peroxidación de lípidos de la membrana celular y de los organelos afecta el normal funcionamiento de la célula. El nivel de peroxidación de lípidos ha sido usada como indicador del daño producido por las ERO en condiciones de estrés (Türkan et al., 2005). La evaluación de daño oxidativo medido por TBAR en los cuatro genotipos evidenció un mayor daño en *L. corniculatus* en los tratamientos de estrés hídrico e hídrico más térmico (Fig. 19). A pesar que en *L. corniculatus* se observó un incremento de la actividad de la SOD en condiciones de estrés, las actividades APX y CAT no se incrementaron, lo que podría explicar el mayor nivel de TBAR encontrado en este genotipo. Por otro lado, los híbridos presentaron en condición de déficit hídrico menor daño oxidativo que los parentales, que podría ser consecuencia de la diferente respuesta en la actividad CAT y APX. En este sentido *L. uliginosus* tuvo un nivel de daño muy bajo, que podría ser consecuencia del alto contenido de taninos condensados, el doble que en *L. corniculatus* (Meagher et al., 2004) que actuarían como compuestos antioxidantes (Ramakrishna y Aswathanarayana, 2011)

##### **5. Parámetros morfológicos en la respuesta al estrés**

En una población de híbridos F<sub>2</sub> descendientes del cruzamiento entre híbridos F<sub>1</sub> se evaluó la respuesta al déficit hídrico inducido *in vitro* con PEG y en el campo (*shelter*).

Los agentes osmóticos como el PEG 8000 permiten establecer estrés hídrico en condiciones controladas en sistemas *in vitro*. El PEG tiene ventajas frente a otros agentes osmóticos porque no penetra

en la célula ni en el apoplasto y no es iónico, por lo que permite imitar el efecto de un suelo en proceso de desecación (Verslues et al., 2006).

Las especies parentales, en los 4 potenciales osmóticos ensayados (-0,5, -0,7, -1,2 y -1,7 Mpa), mostraron diferencias en el crecimiento radicular. En este sentido se observó una disminución del largo de la raíz a medida que bajó el potencial osmótico del medio. *L. corniculatus* mantuvo el crecimiento radicular hasta un potencial de -1,2 Mpa, en cambio *L. uliginosus* redujo el crecimiento radicular partir de -0,5 Mpa, potencial que fue tan limitante como -1,7 Mpa para *L. corniculatus*.

Para la evaluación de los 10 híbridos incluidos en este ensayo se usó un potencial de -1Mpa, suficiente para observar diferencias entre los genotipos. Respecto a los híbridos, el H1-76 tuvo un crecimiento radicular similar a *L. corniculatus*, en 2 híbridos fue similar a *L. uliginosus* y 7 híbridos tuvieron crecimiento intermedio. El método de evaluación, con imposición del estrés osmótico y transpiración mínima, permitió discriminar las respuestas a déficit hídrico entre los genotipos (Fig. 24 y 25). La metodología usada permitió evaluar un carácter complejo de estimar en condiciones de campo, como lo es el crecimiento radicular (Zhu et al., 2011; Ober y Sharp, 2007).

En situaciones reales de déficit hídrico una de las respuestas más comunes de las plantas, es la reducción de la biomasa producida, como consecuencia de la reducción de la fotosíntesis (Anjum et al., 2011). Las especies parentales y el híbrido H1-6 se instalaron en el campo, en un *shelter*, para evaluar producción de biomasa en diferentes condiciones de disponibilidad de agua y luego su sistema radicular. Y desarrollo de rizomas Cuando el agua no fue limitante, todos los genotipos produjeron valores acumulados de biomasa sin diferencias significativas (Fig. 27). En cambio, cuando las plantas fueron sometidas a una situación de déficit hídrico, definido como el 25 % de la ETP, los valores de biomasa acumulada, presentaron diferencias significativas.

La mayor producción de biomasa en el híbrido H1-6 puede ser consecuencia de una combinación de parámetros fisiológicos (fluorescencia, relación de clorofila a/b, EUA, y  $\Delta^{13}\text{C}$ ) y metabólicos (defensa antioxidante, acumulación de prolina), junto con parámetros morfológicos como una alta relación raíz / tallo en condición de déficit hídrico (Fig. 20). La tolerancia al estrés hídrico está relacionada con la partición de materia seca hacia el sistema radical de la planta, incrementando el peso relativo de las raíces en relación con la parte aérea.

En relación a parámetros relacionados con la arquitectura de la planta, se evaluó el hábito de crecimiento, la presencia de rizomas y el diámetro de la corona. El híbrido H1-6 tuvo el mismo hábito de crecimiento erecto que tiene *L. corniculatus*, diferente a *L. uliginosus* que tiene hábito de crecimiento postrado (Fig. 27).

Los rizomas están relacionados con la persistencia en la medida que son órganos que participan en la propagación vegetativa. Además acumulan reserva que permanece almacenada durante el invierno y están disponibles en primavera (Beuselinck et al., 2005). En el campo, el 60 % de las plantas de la F<sub>2</sub> desarrolló rizomas después de una estación de crecimiento. Esta variabilidad en la progenie puede ser producto de la segregación de esta característica, o consecuencia de la interacción genotipo-ambiente. Beuselinck et al., (2005) estudiaron la expresión de rizomas en la introgresión de esta característica en otros genotipos de *L. corniculatus*, desde un material rizomatoso de *L. corniculatus* seleccionado en Marruecos. Estos autores, observaron que la edad de la planta y las condiciones ambientales, afectan la expresión de esta característica (Beuselinck et al., 2005; Nualsri et al., 1998). Beuselinck et al. (2004) cruzaron germoplasma con rizomas con el producto de *L. L. uliginosus* x *L. corniculatus* para aumentar la expresión de este carácter. El objetivo de ese cruzamiento fue la generación de un material con mayor adaptación a diferentes ambientes. Los híbridos obtenidos aumentaron la sobrevivencia en comparación a la de *L. corniculatus*. También se obtuvo un resultado similar a favor de la sobrevivencia de especies de lotus rizomatosas respecto a no rizomatosas por Kallembach et al. (2001). Los estudios genéticos en materiales con rizoma demostraron que su presencia es un carácter de herencia simple y dominante. (Beuselinck et al., 2004; registro ARS 2424).

Si bien *L. L. corniculatus* tolera más la sequía que *L. L. uliginosus*, el exceso de agua afecta más a *L. L. corniculatus*. Nosotros observamos, en los lisímetros con mayor disponibilidad de agua, una pérdida alta de plantas de *L. corniculatus*, de 36 plantas murieron 22, en el híbrido H1-6 de 36 murieron 13 y en *L. uliginosus* de 36 murieron 9 (Cuadro 14). Si bien no se determinó la causa de la muerte de las plantas, esta podría estar asociada al exceso de agua, que favorece la aparición de enfermedades provocadas por hongos que afectan genotipos susceptibles como *L. corniculatus* (Altier et al., 2000).

Los híbridos generados en esta tesis son materiales que pueden tener ventajas provenientes de *L. L. uliginosus*, como lo es la presencia de rizomas y el mayor nivel de taninos condensados que confieren

---

resistencia a enfermedades (Acuña et al., 2008) y pueden actuar como antioxidantes no enzimáticos. *L. corniculatus* conferiría ventajas en lo que hace a parámetros de estructura de la planta, como el desarrollo de sistema radicular profundo. La expresión de estos caracteres durante el establecimiento y desarrollo de las plantas es clave para la persistencia de las la pasturas. La evaluación de estos híbridos en lo referente a un potencial uso agronómico será objeto de futuros trabajos.

---

## VI CONCLUSIONES

En relación a conclusiones relacionadas con aspectos metodológicos se consideran las siguientes:

El estatus híbrido de lotus puede ser confirmado indistintamente por CF o con marcadores moleculares. De todas formas estos últimos parecen ser más adecuados que por razones de facilidad en su implementación.

El uso de PEG para simular déficit hídrico fue útil para determinar diferencias cuantificables de crecimiento radicular entre distintos genotipos en estadio de plántula. Esta estrategia podría ser aplicada en la evaluación de la tolerancia – sensibilidad de especies de lotus de interés agronómico para asistir programas de mejoramiento genético.

El *shelter* fue una herramienta adecuada para validar a nivel de campo, el comportamiento de los genotipos en condiciones de sequía. Para el cálculo de la evapotranspiración del cultivo es importante, seleccionar los coeficientes del cultivo similares a las especies evaluadas.

Los resultados presentados confirman la validez de la aplicación de métodos de hibridación interespecífica para ampliar la base genética a efectos de aplicar la selección de individuos que recombinen características de interés, sobre todo cuando éstas son determinadas por varios genes, como lo es la tolerancia a la sequía.

El precultivo de los embriones permite mayor éxito en la regeneración de plantas porque posibilita superar la barrera poscigótica relacionada al desarrollo del embrión, que es determinante para regenerar plantas. El precultivo permitiría que el embrión continúe su desarrollo en la semilla y al momento de rescate estar en fases más avanzadas.

La causa del bajo éxito en la regeneración de plantas cuando la madre es *L. corniculatus* puede deberse a que se invierte la relación adecuada para el EBN o bien a la habilidad combinatoria entre especies y plantas.

Las especies parentales presentan diferencias en relación a la acumulación de prolina, EUA, fotosíntesis y daño oxidativo, todos parámetros relacionados con la tolerancia a estrés, características que son interesantes para lograr diversidad a través de la recombinación.

Los híbridos mostraron una recombinación de parámetros morfológicos, fisiológicos y metabólicos que determinarían ventajas respecto a las especies parentales por su comportamiento en condición de estrés a nivel de laboratorio. Del mismo modo, en condición de estrés hídrico a campo, la producción de biomasa del un híbrido fue superior a los parentales.

## VII BIBLIOGRAFÍA

Abbo, S. and G. Ladizinsky. (1994). Genetical aspects of hybrid embryo abortion in the genus *Lens* L. *Heredity*, 72: 193-200.

Acevedo, E. H.; Baginsky, C. G.; Solar, B.R. y S. Ceccarelli. (1997). <sup>13</sup>C Isotopic Discrimination as related to yield and transpiration efficiency of landraces and improved barley genotypes grown under various watering regimes. *INVESTIGACIÓN AGRÍCOLA (CHILE)*, 17: 41 – 54.

Acuña, H.; Concha, A.; and M. Figueroa. (2008). Condensed Tannin Concentrations of Three *Lotus* Species Grown in Different Environments. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 68(1):31-41.

Airaki, M.; Leterrier, M.; Mateos, R. M.; Valderrama, R.; Chaki, M.; Barroso, J. B.; Del Río, L. A, Palma, J. M. and F.J. Corpas. (2012). Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant Cell & Environment*, 35(2): 281-295. 1-13 pp.

AL-Ghamdi A.A. (2009). Evaluation of Oxidative Stress Tolerance in Two Wheat (*Triticum aestivum*) Cultivars in Response to Drought . *International Journal of Agriculture and Biology*, 11: 7–12.

Allen, R. G.; Pereira, L. S.; Raes, D.; and M. Smith, (1998). "Crop evapotranspiration: Guidelines for computing crop water requirements." FAO Irrigation and Drainage Paper No. 56, Rome.

Altamirano, A. (1976). Carta de reconocimiento de suelos del Uruguay. Tomo 1 Clasificación de suelos.

Amano, J.S.; Kuwayama, Y.; Mizuta, T.; Oomiya, T.; Nakamura N. and M. Nakano. (2007). Early Identification of Intra- and Intergeneric Hybrids among Colchicaceous Ornamentals, *Gloriosa* spp., *Littonia modesta* Hook. and *Sandersonia aurantiaca* Hook., by Flow Cytometry and Amplified Polymorphic DNA Analyses *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science*, 76(1):73-78.

Anjum S.A.; Xie X.; Wang L.; Saleem M.F; Man Ch.; and W. Lei. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress *African Journal of Agricultural Research*, 6(9): 2026-2032.

Arora, A.; Sairam R. K. and G. C. Srivastava. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *CURRENT SCIENCE*, 82(10): 1227-1238.

Asada, K. (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue. In: Foyer CH, Mullineaux PM, eds. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Boca Raton: CRC Press, 77–104.

Ashraf, M. and M.R. Foolad. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59 (2): 206–216.

Ayala W., y M. Carámbula. (2009). El valor agronómico del género *Lotus*. Montevideo, INIA. 424 p.

Bandurska, H. and E. Jozwiak. (2010). A comparison of the effects of drought on proline accumulation and peroxidases activity in leaves of *Festuca rubra* L. and *Lolium perenne* L.. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 79(2):11-116.

Barry, T.N.; Kemp, P.D.; Ramírez-Restrepo, C.A. and N. López-Villalobos. (2003). Sheep production and agronomic performance of *Lotus corniculatus* under dryland farming. In: Moot, D.J. (ed). Legumes for dryland pastures. Proceedings of a New Zealand Grassland Association (Inc.) Symposium held at Lincoln University, 18-19 November, 2003. pp.109-115. (Grassland Research and Practice Series, No. 11).

Bennett, M. D and I. J. Leitch. (2005). Plant Genome Size Research: A Field In Focus. *Annals of Botany*., 95(1): 1–6.

Bennett, M.D.; Bhandol, P. and I.J. Leitch. (2000). Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses—807 new estimates. *Annals of Botany* , 86(4): 859–909.

Berriel, V.,;Sainz, M.; Díaz, P. Borsani, O. y J. Monza. (2006). Evaluación de la eficiencia del uso del agua por discriminación isotópica en especies del Género *Lotus* V JORNADAS DE LA SOCIEDAD URUGUAYA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR. Montevideo Uruguay.

Beuselinck, P.R. and R.L. McGraw. (2000). Vestigial Corolla in Flowers of Birdsfoot Trefoil. *Crop Science*, 40:964-967.

Beuselinck, P.R.; Steiner J.J. and Y.W. Rim. (2003). Morphological Comparison of Progeny Derived from 4x-2x and 4x-4x Hybridizations of *Lotus glaber* Mill. and *L. corniculatus* L. *Crop Science*, 43:1741-1746.

Beuselinck P.R., (2004) Registration of ARS-2424 Birdsfoot Trefoil Germplasm . *Crops Science*,44: 2276-2277.

Beuselinck, P.R.; D.K. Brummer, K.H.; Asay, R.R.; Smith, J.; Steiner J. and D.K. Brauer. (2005). Genotype and Environment Affect Growth of Birdsfoot Trefoil. *Crop Science*, 45:1736-1740.

Blokhina, O.; Virolinen, E.; and K. Fagerstedt. (2003). Antioxidants, Oxidative and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany*, 91: 179-194.

Blum, A. (2009). Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research*, 112: 119–123.

Bonal, D. ; Sabatier, D. ; Montpied, P. ; Tremeaux, D. and J.M. Guehl. (2000). Interspecific variability of delta 13 C among trees in rainforests of French Guiana: functional groups and canopy interactions. *Oecologia* 124:454-468.

Bonnecarrère, V.; Borsani, O.; Díaz, P.; Capdevielle, F.; Blanco, P.; and J. Monza. (2011). Response to photooxidative stress induced by cold in japonica rice is genotype dependent. *Plant Science*, 180:726–732.

Borsani, O.; Díaz, P.; and J. Monza. (1999). Proline is involved in water stress responses of *Lotus corniculatus* nitrogen fixing and nitrate fed plants. *Journal of Plant Physiology*. 155: 269-273.

Borsani O.; Casaretto, E.; Diaz, P.; Márquez, A.; Rebuffo, M. and J. Monza. (2008). Búsqueda de marcadores fisiológicos asociados con tolerancia-sensibilidad a déficit hídrico en leguminosas. In: Taller de Divulgación del Proyecto LESIS; Leguminosas para Sistemas Sustentables (1º., 2008, Montevideo). Resúmenes. Montevideo, FONTAGRO. p. 5.

Borsani, O.; Díaz P.; Azziz, G.; Sainz, M.; and J. Monza. (2006). Technical report period april-october 2006, Partner 4, Laboratory of Biochemistry, Facultad de Agronomía-UDELAR. In: LOTASSA Contractors Meeting (2<sup>nd</sup>, 2006, Porto Alegre, Brazil). Abstracts. Montevideo, PROCISUR. s.p.

Borsani, O.; Díaz, P.; Agius, F.; Valpuesta, V. and J. Monza. (2001). Water stress induces an oxidative stress through the induction of a specific Cu/Zn superoxide dismutase in *Lotus corniculatus* leaves. *Plant Science*, 161:757-763

Borsani, O.; Díaz, P.; Azziz, G.; Sainz, M.; Monza J. (2007). Technical report period october 06-october 07, Partner 4, Laboratory of Biochemistry, Facultad de Agronomía-UDELAR. In: LOTASSA Contractors Meeting (3<sup>rd</sup>, 2007, Granada, Spain). Abstracts. Montevideo, PROCISUR. s.p.

Bowler, C.; Montagu, M.V. and D. Inze. (1992) Superoxide Dismutase and Stress Tolerance Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43: 83-116.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-54.

Broetto F.; Monteiro Duarteb, H. and U. Lüttgeb. (2007). Responses of chlorophyll fluorescence parameters of the facultative halophyte and C3–CAM intermediate species *Mesembryanthemum crystallinum* to salinity and high irradiance stress. *Journal of Plant Physiology* 164: 904-912.

Burczyk, J.; Adams, T.; Birkes, D. S and I. J. Chybicki. (2006) .Using Genetic Markers to Directly Estimate Gene Flow and Reproductive Success Parameters in Plants on the Basis of Naturally Regenerated Seedlings. *Genetics*, 173: 363–372.

Burrow, M.D. and T.K. Blake. (1998). Molecular tools for the study of complex traits. p. 13–29. *In* A.H. Paterson (ed.) *Molecular dissection of complex traits*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Carámbula M. (1996). *Pasturas naturales mejoradas*. Montevideo, Hemisferio Sur. 524 p.

Carámbula, M.; Carriquiry, E. y W. Ayala. (1994). Mejoramiento de campo con *Lotus subbiflorus* cv. Rincón. Montevideo, INIA Treinta y Tres. (INIA Boletín de Divulgación; 44). 21pp.

Carputo, D.; Barone, A.; Cardi, T.; Sebastiano, A.; Frusciante, L.; and S. Peloquin. (1997). Endosperm balance number manipulation for direct *in vivo* germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.) *Proceeding National Academy of Science. USA* Vol. 94, pp. 12013–12017.

Charest, C. and Phan, C. 1990. Cold acclimation of wheat (*Triticum aestivum*): Properties of enzymes involved in proline metabolism *Physiologia Plantarum*, 80:159-68.

Chase, M. W.; Hanson, L.; Albert, V.; Whitten, W.M. and N. H. Williams. (2005). Life History Evolution and Genome Size in Sub tribe Oncidiinae (Orchidaceae) *Annals of Botany*, 95(1): 191–199.

Chaves, M.M.; Flexas J.; and C. Pinheiro. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103: 551–560,

Chaves, M.M. and M. Olivera. (2004). Mechanism underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture *Journal of Experimental Botany*, 55 (407): 2365-2384.

Chen, C. and K. Asada (1989). Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties, *Plant Cell Physiology*, 30: 987–998.

Chimenti, C.A.; Marcantonio, M.; and A.J. Hall. (2006). Divergent selection for osmotic adjustment results in improved drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) in both early growth and flowering phases *Field Crops Research*, 95 (2-3): 305-315.

Chinnusamy, V.; Schumaker, K.; and J. Zhu. (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 55 (395): 225-236.

Condon, A. G. and R. A. Richards (1993). Exploiting genetic variation in transpiration efficiency in wheat; an agronomic view. In: Ehleringer, J. R.; Hall, A. E.; Farquhar, G.D. eds. *Stable isotopes and plant carbon-water relations*. San Diego, Academic Press. pp. 435-450.

Cornejo, P.; Camadro E.L. and R.W. Masuelli. (2006). The importance of *Arabidopsis* seed mutants in the elucidation of the molecular basis of Endosperm Balance Number in tuber bearing *Solanum* species. *Biocell*, 30(3): 413-421.

Cornic, G. and J. M. Briantais. (1991). Portioning of photosynthetic electron flow between CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> reduction in C<sub>3</sub> leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO<sub>2</sub> concentrations and during drought stress, *Planta* 183, 178-84.

Davies W.J. (2007). Root Growth Response and Functioning as an Adaptation in Water Limiting Soil. In: Jenks, M.A., P.M. Haegawa, S.M. Jain (eds). *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Dordrecht: Springer. pp.55-72.

De Boeck H.J., Lemmens C.M., Gielen B., Malchair S., Carnol M., Merckx R., Van den Berge R., Ceulemans R., and I. Nijs (2007) Biomass production in experimental grasslands of different species richness during three years of climate warming. *Biogeosciences Discuss.*, 4, 4605–4629.

Dell J. and M.A. Toivonen (2003) *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*

Devanand, P.S.; Wan, J.; Rangaswamy, M.; and H. Ikehashi. (1999). Plant genetic resources: isozyme divergence between maintainers and restorers in hybrid rice breeding programs in India. *Crop Science*, 39:831-835.

Díaz, P. (2005). Acumulación de prolina en *Lotus*, sp. en condiciones de estrés hídrico. Montevideo: UdelaR, Fac.Ciencias. Tesis de Maestría PEDECIBA, 75 pp.

Díaz, P.; Betti, M.; Sánchez, D. H.; Michael, K.; Udvardi, M.; Monza, J.; and A. Márquez. (2010). Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress, *New Phytologist*, 188: 1001–1013.

Díaz, P.; Borsani, O.; Márquez, A.; and J. Monza (2005a) Osmotically induced proline accumulation in *Lotus corniculatus* leaves is affected by light and nitrogen source, *Plant Growth Regulation*, 46, 223-32.

Díaz, P.; Monza, J.; Márquez, A. J. (2005b). Drought and saline stress in *Lotus japonicus* In: Márquez, A. J. ed. *Lotus japonicus* handbook. Dordrecht, Springer. pp. 39-50.

DIEA-MGAP. 2011. Censo general agropecuario 2011. Capítulo 2. Disponible en línea: [www.mgap.gub.uy](http://www.mgap.gub.uy)

Doležel, J. (1991). *KARYOSTAR*: Microcomputer program for modelling of monoparametric flow karyotypes. *Biología*, 46:1059-1064.

Doležel, J., and J. Bartôš. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann. Bot. (Lond)* 95:99-119.

Doležel, J., J. Greilhuber and J. Suda. (2007). Estimation of nuclear content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2 (9):2233-2244.

Doležel, J., S. Sgorbati and S. Lucretti. (1992). Comparison of three fluorochromes for flow cytometry estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia plantarum*, 85: 625-631

Dongre, A. and V. Parkhi. (2005). Identification of Cotton Hybrid through the Combination of PCR Based RAPD, ISSR and Microsatellite Markers. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 14: 53-55

Dourado Neto, D.; Timm, C.; Oliveira, J.C.M.; Reichardt, K.; Bacchi, O.O.S.; Tominaga T.T.; Cássaro, F.A.M. (1999). State-space approach for the analysis of soil water content and temperature in sugarcane crop. *Scientia Agricola*. Vol. 56, 1215-1221.

Eujayl, I.; Sledge, M.K.; Wang, G.D.; May, K.; Chekhovskiy, J.; Zwonitzer, C. and M.A. Mian. (2004). *Medicago truncatula* EST–SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. *Theoretical Applied Genetics*, 108:414-422.

FAO. (1996). Report of the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (PGRFA) for the International Technical Conference on Plant Genetic Resources, Leipzig, Germany, 17-23 June 1996. (CD-ROM).

Farquhar, G.D. and R.A. Richards. (1984). Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology*, 11: 539-552.

Farquhar, G.D.; O'Leary, M.H. and J.A. Berry, (1982). On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, 9: 121-137.

Flexas J., Josefina Bota, J., José M. Escalona J.M., Bartolomé Sampo B., and H. Medrano. (2002). Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biology* 29, 461–471.

Foyer, C.; Lelandais, M. and K. Kunert. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 92(4):696–717.

Foyer, C.H. and G. Noctor. (2000). Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist*, 146: 359-388.

Fu, X.; Lu, Y.; Liu, X. and J. Li. (2008). Crossability Barriers in the Interspecific Hybridization between *Oryza sativa* and *O. meyeriana* *Journal of Integrative Plant Biology*, p 1-8.

Gaitán-Solís, E.; Duque, M.C.; Edwards, K.J. and J. Tohme. (2002). Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. *Crop Science*, 42:2128-2136.

Galati, B.G., S. Rosenfeldt and G.M. Tourn. (2006). Embryological studies in the *Lotus glaber* (*Fabaceae*). *Annales Botanici Fennici* 43(2):97-106.

García de los Santos, G.; Steiner, J.J. and P.R. Beuselinck. (2001). Adaptive Ecology of *Lotus corniculatus* L. Genotypes: II. Crossing Ability *Crop Science*, 41:564–570.

Gaspar, T.; Franck, T.; Bisbis, B.; Kevers, C.; Jouve, L.; Hausman, J.F. and J. Dommes. (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 37: 263–285.

Gebrehiwot, L.; Beuselinck, P. and C. Roberts. (2002). Seasonal Variations in Condensed Tannin Concentration of Three *Lotus* Species. *Agronomy Journal*, 94:1059–1065.

Geerts P., Toussaint A., Mergeai G., and J. P. Baudoin (2002) Study of the early abortion in reciprocal crosses between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus polyanthus* Greenm. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environmental*, 6 (2): 109–119.

Gepts, P.; Beavis, W.; Brummer, E.; Shoemaker, C.; Stalker, H.; Weeden, N. and Y. Kevin. (2005). Legumes as a Model Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology*, 137:1228-1235.

Gill, S.S. and N. Tuteja. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48:909-930.

Godo, T.; Miyazaki, J.; Kuwayama, S.; Shinjiro Ogita, S.; Kato, S.; Nakano, M. and M. Nakata. (2009). Interspecific hybridization between triploid Senno (*Lychnis senno* Siebold et Zucc., caryophyllaceae) and allied taxa of the genus *Lychnis*. *Plant Biotechnology*, 26: 301–305.

Gomathi, R. and P. Rakkiyapan (2011). Comparative lipid peroxidation, leaf membrane thermostability, and antioxidant system in four sugarcane genotypes differing in salt tolerance *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 3(4): 67-74.

Gomez, M.; Denwar, N.N.; Ramasubramanian T.; Simpson, E.; Burow, G.; Burke, J.J.; Puppala, N. and M.D. Burow. (2008). Identification of Peanut Hybrids Using Microsatellite Markers and Horizontal Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Peanut Science*, 35:123–129

Grant, W. (1995). A chromosome atlas and interspecific- intergeneric index for *Lotus* and tetragonolobus (*Fabaceae*). *Canadian Journal of Botany*, 37: 1787-1809.

Grant, W.F. (1999). Interspecific Hybridization and Amphidiploidy of Lotus as it Relates to Phylogeny and Evolution in Trefoil. p. 43-60 *In* Beuselinck P.R. (ed.). Trefoil: The Science and technology of the *Lotus*, Proceeding of a Symposium cosponsored by the American Society of Agronomy and the Crop Science Society of America in Saint Louis, MO, 22-24 March 1994. Wisconsin, USA. (CCSA Special Publication Number 28).

Gruber, M., B. Skudhauge, M. Yu, A. Muir and K. Richard. (2008). Variation in morphology, plant habit, proanthocyanidins, and flavonoids within a *Lotus* germplasm collection. *Can. J. of Plant Sci.* 88(1):121-132.

Guillén R. (2007) Consideraciones en la producción de semillas de *Lotus* spp. *Lotus Newsletter* Volume 37 (1), 47-51.

Gupta, P.K.; Balyan, H.S.; Sharma, P.C.; and B. Ramesh. (1996). Microsatellites in Plants: A new class of molecular markers. *Current Science*, 70 (1): 45-54.

Gür A.; Demirel U.; Özden M.; Kahraman A., and O. Çopur. (2010). Diurnal gradual heat stress affects antioxidant enzymes, proline accumulation and some physiological components in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *African Journal of Biotechnology* , 9(7):1008-1015.

Halliwell, B. and J.M. Gutteridge. (2006). Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899: 136-147.

Handberg, K. and Stougaard, J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics, *The Plant Journal* 2, 487-96.

Harb, A.; Krishnan, A.; Ambavaram, M. and A. Pereira. (2010). Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in *Arabidopsis* Reveals Early Responses Leading to Acclimation in Plant Growth. *Plant Physiology* , 154, 1254–1271.

Harris, C.A.; Blumenthal, M.J. and J. Scott. (1993). Survey of use and management of *Lotus pedunculatus* cv. Grasslands Maku in eastern Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 33:41-47.

Hasegawa, P.M.; Bressan, R.A. and J.M. Pardo. (2000). The dawn of plant salt tolerance genetics. *Trends in Plant Science*, 5: 317-319.

Hashemi, S.H.; Mirmohammadi-Maibody, S.; Nematzadeh, G.A. and A. Arzani. (2009). Identification of rice hybrids using microsatellite and RAPD markers. *African Journal of Biotechnology*, 8 (10):2094-2101.

Hassanzadeh M., Ebadi, A., Panahyan-e-Kivi M., Eshghi A., Jamaati-e-Somarin, Saeidi M, and Z.-e-Mahmoodabad. (2009). Evaluation of Drought Stress on Relative Water Content and Chlorophyll Content of Sesame (*Sesamum indicum* L.) Genotypes at Early Flowering Stage. *Research Journal of Environmental Sciences*. 3(3):345-350.

Hatfield, M.P.; Wright, G.C. and W.R. Tapsall. (1990). A Large, Retractable, Low Cost and Re-Locatable Rain Out Shelter Design. *Experimental Agriculture*, 26: 57-62.

Hubick, K. T. and G. Farquhar. (1989). Carbon isotope discrimination and the ratio of carbon gained to water lost in barley cultivars. *Plant Cell and Environment*, 12: 795-804.

Hubick, K. T.; Farquhar, G. D. and R. Shorter. (1986). Correlation between water-use efficiency and carbon isotope discrimination in diverse peanut (*Arachis*) Germplasm. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13(6): 803-816.

Hubick, S.H.; and A. Gibson. (1993). Diversity in the relationship between carbon isotope discrimination and transpiration efficiency when water is limited. In: Ehleringer, J. R.; Hall, A. E.; Farquhar, G. D. eds. *Stable isotopes and plant carbon-water relations*. San Diego, Academic Press. pp. 47-70.

Ichii, M.; Hong ,DL.; Ohara, Y.; Zhao, CM.; and S. Taketa. (2003). Characterization of CMS and maintainer lines in indica rice (*Oryza sativa* L.) based on RAPD marker analysis. *Euphytica*, 129: 249-252.

Ismail, A.M. and A.E. Hall. (1992). Correlation between Water-Use Efficiency and Carbon Isotope Discrimination in Diverse Cowpea Genotypes and Isogenic Lines. *Crop Science*, 32 (1): 7-12.

Isobe, S., A. Sawai, H. Yamaguchi, M. Gau and K. Uchiyama. (2001). Breeding potential backcross progenies of a hybrid between *Trifolium medium* x *T. pratense* to *T. pratense*. *Canadian Journal of Plant Science*. 395-399.

Jaleel Ch.A., Manivannan P., Wahid A., Farooq M., Al-Juburi H.J., Somsundaram R., and R.Panneerselvam (2009) Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *Int. J. Agric. Biol.*, Vol. 11, No. 1.

Jaspers, P. and J. Kangasjärvi. (2010). Reactive oxygen species in abiotic stress signaling . *Physiologia Plantarum*, 138 (4):405-413.

Johnston SA, den Nijs TPM, Peloquin SJ, Hanneman RE (1980).The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theoretical Applied Genetics*, 57: 5-9.

Jones, H. (2004). What is water use efficiency? In: Bacon, M. A. ed. *Water use efficiency in plant biology*. Oxford, Blackwell. pp. 1-26.

Jungmanová, B and Repková, (2006). Identification of interespecific barriers in the genus *Lotus*(Poster) in the XII International Conference on Plant embryology 3-5 sep. Cracow Poland.

Kallenbach, R.L.; McGraw, R.L.; Beuselinck, P.R. and C.A. Roberts. (2001). Summer and Autumn Growth of Rhizomatous Birdsfoot Trefoil. *Crop Science*, 41:149–156.

Kangasjärvi, J.; Jaspers, P. and H., Kollist. (2005). Signalling and cell death in ozone-exposed plants *Plant, Cell & Environment*, 28: 1021–1036.

Kaustsky, H.; Appel, W. and H. Amann, (1960). Chlorophyll fluorescenz und kohlenassaassimilation. XIII. Die fluoreszenzkurve und die photochimie der pflanze. *Biochemische Zeitschrift*, 322: 277-292.

Kelman, W.M. (2006). Germplasm sources for improvement of quality in *L. corniculatus* L. and *L. uliginosus* Schkurhr (Fabaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:1707-1713.

Kirkbride, J.H.Jr. (1999). *Lotus* Systematic and Distribution. in Trefoil. p. 1-20 *In* Beuselinck P.R. (ed.) Trefoil: The Science and technology of the *Lotus*, Proceeding of a Symposium cosponsored by the American Society of Agronomy and the Crop Science Society of America in Saint Louis, MO, 22-24 March 1994. Wisconsin, USA. (CCSA Special Publication Number 28).

Krall, J. P. & G. Edwards. (1992.) Relationship between photosystem II activity and CO<sub>2</sub> fixation in leaves. *Physiologia Plantarum* 86: 180-187

Krizek, D. (1985). Methods of inducing water stress in plants. *Horticultural Science*, 20 (6): 1028-1034.

Kudo, N.; Matsui, T. and T.Okada. (2008). A novel interspecific hybrid plant between *Hydrangea scandens* ssp. *chinensis* and *H. macrophylla* via ovule culture. *Plant Biotechnology*, 25: 529–533.

Lamb, Ch. and R. A. Dixon. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 251-275.

Lambers, H.; Chapin, F.S and T.L. Pons. (1998). *Plant physiological ecology*. New York, NY: Springer-Verlag. 540pp libro on line. Disponible on-line:

[http://www.google.com.uy/search?hl=es&tbo=p&tbn=bks&q=inauthor:%22Francis+Stuart+Chapin+\(III.\)%](http://www.google.com.uy/search?hl=es&tbo=p&tbn=bks&q=inauthor:%22Francis+Stuart+Chapin+(III.)%22)

22 Consultado el: 2/09/2010

Lawlor D.,(2002). Limitations to Photosynthesis in water-stressed Leaves: Stomata vs. Metabolism and the Rol of ATP. *Annals of Botany*, 89:871-885.

Levitt, J. (1980). Responses of plants to environmental stresses.: Water, radiation, salt, and other stresses. (*Physiological Ecology* Vol. 2). pp. 607pp. on line Disponible online: URL. Consultado el: 10/9/2010.

Li, B. and P.R. Beuselinck. (1996). Plant Genetic Resources. Rhizomatous *Lotus corniculatus* L.: II Morphology and Anatomy of Rhizomes. *Crop Science*, 36:407-411.

Li, Y.C.; Korol, A.B.; Fahima, T.; Beiles, A. and E. Nevo. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11:2453-2465.

MacAdam, J. W.; Griggs, T. C.; Beuselinck, P. R., and J. H. Grabber. (2006). Birdsfoot trefoil, a valuable tannin-containing legume for mixed pastures. Online. *Forage and Grazinglands* doi:10.1094/FG-2006-0912-01-RV.

Mafakheri, A.; Siosemardeh, A.; Bahramnejad, B.; Struik, P.C. and Y. Sohrabi. (2010) Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars *Australian Journal of Crops Science*, 4(8):580-585.

Martin, B. and Y. R. Thorstenson. (1988). Stable carbon isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ), water use efficiency, and biomass productivity of *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pennellii*, and the F<sub>1</sub> hybrid. *Plant Physiology*. 88: 213-217.

Martínez-Reyna J. M. and K. P. Vogel (2002) Incompatibility Systems in Switchgrass. *Crop Science*, 42:1800–1805.

Masayoshi, K.; Pedrosa, A.; Yano, K.; Hayashi, M.; Murooka, Y.; Saito, K.; Nagata, T.; Namai, K.; Nishida, H.; Shibata, D.; Sato, S.; Tabata, S.; Hayashi, M.; Harada, K.; Sandal, N.; Stougaard, J.; Bachnair, A. and W. Grant. (2005). *Lotus burttii* takes a position of third corner in the *Lotus* molecular genetic triangle. *DNA Research*, 12: 69-77.

Maxwell, K.; and G.N. Johnson, (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51 (345): 659-668.

Meagher L.P.; Lane, G. Sivakumarana, S. Tavendalea, M.H. and K. Fraser. (2004) Characterization of condensed tannins from *Lotus* species by thiolytic degradation and electrospray mass spectrometry. *Animal Feed Science and Technology*, 117 :151–163.

Medrano, H.; Bota, J.; Cifre, J.; Flexas, J.; Ribas-Carbó, M. y J. Gulías. (2007). Eficiencia en el uso del agua por las plantas. *Investigaciones Geográficas*, nº 43 -73.

Medrano, H.; Escalona, J.; Cifre, M.; Bota, J. and J. Flexas. (2003). Regulated deficit irrigation effects in cv. 'Tempranillo' vineyards grown under semiarid conditions in mid-Ebro river valley (Spain). *Functional Plant Biology*, 30: 607–619.

- Medrano, H.; Escalona, M.; Bota, J.; Gulías, J. and J. Flexas. (2002). Regulation of Photosynthesis of C<sub>3</sub> Plants in Response to Progressive Drought Stomatal Conductance as a Reference Parameter. *Annals of Botany*, 89:895-905.
- Mehetre, S.S. and A.R. Aher. (2004) Embryo rescue: a tool to overcome incompatible interspecific hybridization in *Gossypium* Linn.- A review. *Indian Journal of Biotechnology*, 3: 29-36.
- Menendez, C. and A. Hall, (1996). Heritability of carbon discrimination and correlations with harvest index in cowpea. *Crop Science*, 36: 233-238.
- Méthy, M.; Oliso, A. and L. Trabaud. (1994). Chlorophyll fluorescence as a tool for management of plant resources *Remote Sensing of Environment*, 47(1) :2-9.
- Mexal, J.; Fisher, J.T.; Osteryoung, J.; and C.P. Reid. (1975). Oxygen availability in polyethylene glycol solutions and its implications in plant-water relations. *Plant Physiology*, 55(1):20–24.
- Mian, M.A., M.C. Saha, A.A. Hopkins and Z.Y. Wang. (2005). Use of tall fescue EST–SSR markers in phylogenetic analysis of cool season forage grasses. *Genome* 48:637-647.
- Miller, G.; Susuki, N.; Ciftci-Yilmaz, S. and R. Mittler (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment*, 33:453-467.
- Min, B.R. and S.P. Hart. (2003). Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science*, 81(E. Suppl. 2):102–109.
- Minotti, G. and Aust, S. (1987). The Requirement for Iron(III) in the Initiation of Lipid Peroxidation by Iron(II) and Hydrogen Peroxide, *The Journal of Biological Chemistry* 262: 1098-1104.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7: 405–410.
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; and F. Van Breusegem. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9: 490–498.
- Moreno- Salazar, S.; Esqueda, M.; Martínez ,J. and G. Palomino. (2007). Nuclear Genome Size and Karyotype of *Agave angustifolia* and *a. rhodacantha* from Sonora Mexico. *Revista Fitotécnica Mexicana*, 30 (1):13-23.

- Moreno, J. A.. (1961).Clima do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Secretaria da Agricultura, 42p.
- Morgan, M.T. and J.K. Conner. (2001). Using genetic markers to directly estimate male selection gradients. *Evolution*, 55: 272–281.
- Morgante, M.; Hanafey M. and W. Powell. (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 30:194-200.
- Morón, A. (2003). Principales contribuciones del experimento de rotaciones cultivos-pasturas de INIA La Estanzuela en el área de fertilidad de suelos (1963-2003). In Morón A. y Díaz R. (eds) Simposio 40 años de rotaciones agrícolas-ganaderas. Montevideo: INIA. (INIA Serie Técnica; 134) p.1-7.
- Munns, R.; James, R.; Sirault, R.; Furbank, R.; and H.G. Jones. (2010). New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit *Journal of Experimental Botany*, Vol. 61, No. 13, pp. 3499–3507.
- Murashige, T. and F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia. Plantarum*, 15:473-497.
- Muttoni, G. (2008). Evaluación bioquímica y fisiológica de poblaciones de *Lotus corniculatus* L. sensibles y tolerantes a sequía. Montevideo: UdelaR, Fac.Agronomía. Tesis de grado. 81 p.
- Nandakumar, N.; Singh, A.; Sharma, K.; Mohapara, R.K.; Prabhu, T.K, and F.U. Zaman. (2004). Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. *Euphytica*, 136: 257-264.
- Nandini, A.; Hammett, K.; and B. Murray. (1999). Interspecific hybridization in perennial species of *Lathyrus* (fabaceae) *Agronomie*, 19:521-529.
- Nualsri, C., P. Beuselinck and J. Steiner 1998. Rhizomatous *Lotus corniculatus* L. III Introgression of Rhizomes into Autogamous Germplasm. *Crop Sci.* 38:503-509.
- O'Donoghue, L.S. and W.F. Grant. 1988. New sources of indehiscence for birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*, *Fabaceae*) produced by interspecific hybridization. *Genome* 30:459-468.

Ober, E. and R. Sharp. (2007). Regulation of Root Growth Responses to Water Deficit In: Matthew A. Jenks Hasegaewa P. and M.Jain (eds). *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Dordrecht : Springer, p.33-53.

O'Leary, M. (1981). Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*, 20: 553- 567.

Otto, F. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Crissman, H.A., Darzynkiewicz, Z. (eds) *Methods in Cell Biology*, vol 33. Academic Press, New York, pp 105–110

Pan, Y. ; Wu, L. J. and Z. L. Yu. (2006) Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis Fisch*) *Plant Growth Regulation*, 49 (2-3): 157-165.

Pecetti, L.; Annicchiarico, P.; Battini, F. and S. Cappelli. (2009). Adaptation of forage legume species and cultivars under grazing in two extensive livestock systems in Italy. *European Journal of Agronomy*, 30: 199–204.

Percival, G.; and C. Sheriffs. (2002). Identification of drought- tolerance woody perennials using chlorophyll fluorescence. *Journal of Arboriculture*, 28(5): 215-223.

Pérez Asseff, J. M.; Peña, E. J. and C. Torres. (2007). Efecto del nitrógeno y la irradiación en la eficiencia fotosintética del anamú *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, 31 (118): 49-55.

Perez C., De la Fuente L., Arias A. y N. Altier. (2000) Uso de *Pseudomonas* nativas para el control de enfermedades de implantación en *Lotus corniculatus* L. *Agrociencia* Vol 4 N1: 41-47.

Pinheiro, R.G.; Rao, M.V.; Palyath, G.; Murr, D.P. and R.A. Fletcher. (2001). Changes in the activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol - induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiology*, 114(2):695-704.

Pirzad, A.; Reza Shakiba, M.; Zehtab-Salmasi, S.; Mohammadi, R.; Darvishzadeh, S.A. and A. Samadi. (2011). Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates in *Matricaria chamomilla* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(12): 2483-2488.

Powell, W., G.C. Machray and J. Provan.(1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant. Science*, 1:215-222.

Quero, G., (2011) IDENTIFICACIÓN DE QTLs DE RESPUESTAS A ESTRÉS SALINO Y OSMÓTICO EN UNA POBLACIÓN DE MAPEO *Lotus japonicus* x *L. burtii*. Maestría en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía. UdelaR, 81 pp.

Rahnama, A.; Poustini, K.; Tavakkol-Afshari, R. and A. Tavakoli. (2010). Growth and Stomatal Responses of Bread Wheat Genotypes in Tolerance to Salt stress. *International Journal of Biological and Life Sciences*, 6(4). 216-221.

Ramakrishna A., and G. A.Ravishankar. (2011) . Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants, *Plant Signaling & Behavior*, 6:11, 1720-1731.

Rayburn, A. L.; McCloskey, R.; Tatum, T.C.; Bollero, G.; Jeschke, M. R. and P.J. Tranel. (2005). Genome Size Analysis of Weedy *Amaranthus* Species. *Crop Science*, 45:2557–2562.

Rebuffo, M. (2005). Plant Breeding: *Lotus corniculatus* and *Lotus uliginosus*. *Lotus Newsletter* 35 (1) 9-10.

Reddy, A.R.; Chaitanya, K. and M. Vivekanandan. (2004). Drought- induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants, *Journal of Plant Physiology*, 161: 1189-1202.

Řepková, J. and J. Hofbauer. (2009). Review Seed Pod Shattering in the Genus *Lotus* and its Overcoming. *Czech. Journal of Genetic and Plant Breeding*, 45(2):39-44.

Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S. and Mittler, R. (2004) When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress, *Plant Physiology*, 134:1683-96.

Romero-Carpio, M. and R. Estrada-Jiménez. (2005). Selection of cDNAs differential fragments related to water stress in *Ullucus tuberosus* Loz. (Bassellaceae) «olluco» *Revista Peruana de Biología* 12(1): 135-140.

Sage, T., F. Strumas, W. Cole and S. Barrett. (1999). Differential ovule development following self and cross-pollination: the basis of self-sterility in *Narcissus Triandrus* (Amaryllidaceae). *American J. of Botany*. 86 (6):855-870.

Sainz, M. (2009). El fotosistema II como blanco del estrés abiótico en *Lotus* sp. Montevideo : UdelaR, Facultad de .Agronomía. Tesis de maestría PEDECIBA. 82 pp.

- Sainz, M.; Díaz P.; Monza, J. and O. Borsani. (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: 46-56.
- Salgado, K.C.; Vieira, M.G.; Pinho, R.V.; Guimaraes, C.T.; Pinho, G.V. and L.V. Souza. (2006). Genetic purity certificate in seeds of hybrid maize using molecular markers. *Revista Brasileira de Sementes*, 28:169-175.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Ed. Nolan. C. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandal, N.; *et al.* (2006). Genetics of Symbiosis in *Lotus japonicus*: Recombinant Inbred Lines, Comparative Genetic Maps, and Map Position of 35 Symbiotic Loci *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(1): 80–91.
- Scandalios John G. (1993). Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiology*, 101: 7-12.
- Schraudner, M.; Langebartels, C., and H., Sanderman. (1997). Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environment pollutant ozone. *Physiologia Plantarum*, 100: 274-280.
- Schulze, E.D. (1986). Carbon dioxide and water vapor Exchange in response to drought in the atmosphere and the soil. *Annual Review of plant physiology*, 37: 247-274.
- Scott, D. and J.F. Charlton. (1983). Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) as a potential dryland herbage legume in New Zealand. *Proceedings NZ Grassland Association*, 44: 96.105.
- Sgherri, C.L.; Maffei, M. and F. Navari-Izzo. (2000). Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering: *Journal of Plant Physiology* ,157(3): 273-279.
- Shaikh, N.; Guan, L.M. and T. Adachi. (2001). Ultrastructural Analyses on Breeding Barriers in Post-fertilization Interspecific Hybrids of Buckwheat. *The Proceeding of the 8<sup>th</sup> ISB*:319-329.
- Shao, H.; Chu, L.; Jaleel, Ch..A. and Ch. Zhao. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 215–225.
- Sharma, D.R.; Kaur, R. and K. Kumar. (1996). Embryo rescue in plants - a review. *Euphytica*, 89: 325-337.

Sharma, P., Jha, A.B.; Dubey, R. S. and M. Pessarakli (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions Journal of Botany vol. 2012, Article ID 217037, 26 pages, 2012. doi:10.1155/2012/

Sharma, S.; Villamor, J.G. and P. E. Verslues. (2011). Essential Role of Tissue-Specific Proline Synthesis and Catabolism in Growth and Redox Balance at Low Water Potential. Plant Physiology. 157: 292–304.

Sharp, R. E.; Poroyko, V.; Hejlek, L.; Spollen, W.G.; Springer, G.K.; Bohnert, H.J and H.T. Nguyen. (2004). Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. Journal of Experimental Botany, Vol. 55, No. 407, Water-Saving Agriculture Special Issue, 55(407): 2343–2351.

Simonovik, B.; Ivančič A., Jakšič, J. and B. Bohanec. (2007). Production and genetic evaluation of inter-specific hybrids within the genus *Sambucus*. Plant Breeding 122(6):628-633.

Sisko, M.; Ivančič, A; and B. Bohanec. (2003). Genome size analysis in the genus *Cucurbita* and its use for determination of inter-specific hybrids obtained using the embryo rescue technique. Plant Science, 165:663-669.

Smith, J.S.; Chin, E.C.; Shu, L.H.; Smith, O.S.; Wall, S.J.; Senior M. L.; Kresovich S. and J. Ziegler. (1997). An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPS and pedigree. Theoretical Applied Genetics, 95: 163 -173.

Somaroo, B. H. and W. Grant. (1972). Crossing Relationships between Synthetic *Lotus* Amphidiploids and *L. corniculatus*. Crop Science, 12:103-105.

Somaroo, B.H. and W.F. Grant. (1971). Inter-specific hybridization between diploid species of *Lotus* (*Leguminosae*). Genetica 42:353-367.

Sotiropoulos, T. F. (2007). Effect of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugars in the apple rootstock M4 cultured in vitro. Biologia Plantarum, 51: 177-180.

Squeo, F. A.; Ehleringer, J. R. (2004). Isótopos estables; una herramienta común para la ecofisiología vegetal y animal. In: Cabrera, H. M. ed. Fisiología ecológica en plantas mecanismos y respuestas a estrés en los ecosistemas. Valparaíso, EUV. pp. 59-80.

Steinier, J.J. and C.J. Poklemba. (1994). L.c. classification by seed globulin polypeptides and relationship to accession pedigrees and geographic origin. Crop Science, 34:255-264.

Subbarao, G.V.; Chauhan, Y.S. and C. Johansen (2000). Patterns of osmotic adjustment in pigeonpea — its importance as a mechanism of drought resistance. *European Journal of Agronomy*, 12(3–4): 239–249.

Suzuki, N. and R. Mittler. (2006). “Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction”. *Physiologia Plantarum*, 126:45-51.

Szabados, L. and A. Saviouré. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2): 89-97.

Taiz, L. and E. Zeiger. (2006). *Plant physiology*. 4<sup>th</sup> ed. Massachusetts, Sinauer Associates. 764 p.

Talluri R. (2012) Interploidy interspecific hybridization in *Fuchsia* *Journal of Genetics*, Vol. 91, No. 1, 71-74.

Terzi, R. and A. Kadioglu. (2006). Drought stress tolerance and the antioxidant enzyme system in *Ctenanthe setosa*. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica* 48/2: 89–96.

Tixier, M.H., P. Sourdille, M. Roder, P. Leroy and M. Bernard. (1997). Detection of wheat microsatellites using a non radioactive silver- nitrate staining method. *J. Genet. Breed.* 51:175-177.

Troll, W. and Lindsley, J. (1955). A photometric method for the determination of proline, *Journal of Biological Chemistry* 215, 655-60.

Tsialtas, J.T. and L.S. Tokatlidis. (2008). Use of Carbon Isotope Discrimination ( $\Delta$ ) in Breeding of C3 Cereals under Water Deficit Conditions. *Asian Journal of Plant Sciences* 7 (6): 518-525.

Turkan, I.; Bor, M.; Ozdemir, F., and H.Koca. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress, *Plant. Science*, 168: 223-231.

van der Weele, C.M.; Spollen, W.G.; Sharp, R.E. and T.I. Baskin. (2000). Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany*, 51:1555–1562.

Van Genuchten, M. Th., (1980). A closed-form equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soils. *Soil Sci. Am. J.* 44, 892-898.

Van Tuyl J.M. & M. J. De Jeu. METHODS FOR OVERCOMING INTERSPECIFIC CROSSING BARRIERS Chapter 13 In: Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement (Ed. V. K. Sawhney & K. R. Shivanna) <http://www.liliumbreeding.nl/pollenbitech.PDF>, disponible on line. Consultado 10/1/2012.

Varshney, R.; Bertoli, J.; Moretzsohn, M.; Vadez, C.V.; Krishnamurthy, L.; Aruna, R.; Nigam, S.; Moss, J.; Seetha, J.; Ravi, K.; He, G.; Knapp, S. and A. Hoisington. (2009) The first SSR-based genetic linkage map for cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Theoretical Applied Genetics, 118:729–739.

Verslues, P. E. and E. A. Bray. (2004). LWR1 and LWR2 Are Required for Osmoregulation and Osmotic Adjustment in Arabidopsis. Plant Physiology, 136: 1–12.

Verslues, P.E.; Agarwal, M.; Katiyar-Agarwal, S.; Zhu, J. and J. Zhu. (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.

Verslues, P.E.; Ober, E.S. and R.E. Sharp. (1998). Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. Plant Physiology, 116: 1403–1412.

Vižintin, L. and B. Bohanec. (2004). *In vitro* manipulation of *Cucumis sativus* L. pollen and microspores: isolation procedures, viability test, germination, maturation. Acta Biologica Cracoviensa. Series Botanica 46:177-183.

Wang, M.L.; Gillaspie, A.G.; Newman, M.L.; Dean, R.E.; Pittman, R.N.; Morris, J.B. and G.A. Pederson. (2004). Transfer of simple sequence repeat (SSR) markers across the legume family for germplasm characterization and evaluation. Plant Genetic Resources, 2:107-119.

Wang, Z.; Weber, J.L.; Zhong, G. and S.D. Tanksley (1994). Survey of plant short tandem DNA repeats. Theoretical and Applied Genetics, 88(1): 1-16.

Weber, J.L. and C. Wonc. (1993). Mutation of human short tandem repeats. Human Molecular Genetics, 2: 1123-1128.

Wellburn, A. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology, 144, 307-13.

Wen, L.; R. Kallenbach, J.; Williams, C.; Roberts, P.R.; Beuselinck, P.; McGraw R. and H.R. Benedict. (2002). Performance of steers grazing rhizomatous and nonrhizomatous birdsfoot trefoil in pure stands and in tall fescue mixtures. *Journal of Animal Science*, 80:1970-1976.

Woodward, S. L.; Laboyrie, P. J. and E.B. Jansen (2000). *Lotus Corniculatus* and Condensed Tannins – Effects on Milk Production by Dairy Cows. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 13 Supplement July A: 521-525.

Wrzaczek, M.; Vainonen, J.; Gauthier, A.; Overmyer, K.; and J. Kangasjärvi . (2011). Reactive Oxygen in Abiotic Stress Perception-From Genes to Proteins, in A K Shanker & B Venkateswarlu (eds) , *Abiotic Stress Response in Plants : Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives* InTech , Croatia , pp. 27-54 .

Xu, Z Zhou G.,, and H. Shimizu. (2010) Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signaling & Behavior*, 5:6, 649-654.

Yashitola, J.; Thirumurgan, T.; Sundaram, R.M.; Naseerullah, M.K.; Ramesha, M.S.; Sarma, N.P.; and R.V. Sonti. (2002). Assessment of purity of rice hybrid using microsatellite and STS markers. *Crop Science*, 42: 1369-1373.

Yoo, Ch.;Pence, H.E.; Hasegawa, P.M. and M.V. Mickelbart. (2009). Regulation of Transpiration to Improve Crop Water Use. *Critical Reviews in Plant Science*, 28:410- 431.

Young, N.D.; Cannon, S.B.; Sato, S.; Kim, D.; Cook, D.R.; Town, Ch.D.; Roe, B.A. and S. Tabata. (2005). Sequencing the Gene spaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 137: 1174–1181.

Zhang, Y.; Stedje, M. and J. Bouton. (2007). Genome Mapping of white clover (*Trifolium repens* L.) and comparative analysis within the *Trifolieae* using cross-species SSR markers. *Theoretical Applied Genetics*, 114:1367-1378.

Zhu J., Ingram P.A., Benfey P.,and T. Elich. (2011) From lab to field, new approaches to phenotyping root system architecture . *Current Opinion in Plant Biology* ,14:310–317.

Zhu, H.,. Choi H.K, Cook D. and R. Shoemaker. (2005). Bridging Model and Crop Legumes through comparative genomics. *Plant Physiology*,137:1189-1196.