



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**Facultad de Biología
Departamento de Fisiología Vegetal**

**Papel de los carbohidratos en la tolerancia
al estrés hídrico en líneas recombinantes con
sustitución de cromosomas de cebada.
Estudio bioquímico y molecular.**

Tesis Doctoral

Ana María Méndez Espinoza

Salamanca, 2014



Instituto de Recursos Naturales y
Agrobiología de Salamanca
Departamento de Estrés Abiótico



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Facultad de Biología
Departamento de Fisiología Vegetal

**Papel de los carbohidratos en la tolerancia al estrés hídrico en
líneas recombinantes con sustitución de cromosomas de cebada.
Estudio bioquímico y molecular.**

Tesis Doctoral presentada por la Ing. M. SC.

Ana María Méndez Espinoza

para optar al

GRADO de DOCTOR por la Universidad de Salamanca

Directora

Dra. Rosa María Morcuende Morcuende

Científico Titular del Departamento de Estrés Abiótico del Instituto de
Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC)

Tutora

Dra. M^a. Josefa Babiano Puerto

Profesora Titular del Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de
Biología de la Universidad de Salamanca

Programa de Doctorado

«**Agrobiotecnología**»

Salamanca, 2014

La Dra. **ROSA MARÍA MORCUENDE MORCUENDE**, Científico Titular de Organismos Públicos de Investigación (IRNASA-CSIC),

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada “**Papel de los carbohidratos en la tolerancia al estrés hídrico en líneas recombinantes con sustitución de cromosomas de cebada. Estudio bioquímico y molecular**” ha sido realizada en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC) por D^ª. **ANA MARÍA MÉNDEZ ESPINOZA** bajo su dirección, y cumple las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 1 de Septiembre de 2014.

Fdo. Dra. **Rosa María Morcuende Morcuende**

Tutora

**Director del programa de Doctorado
en Agrobiotecnología**

Fdo. Dra. **M^ª. Josefa Babiano Puerto**

Fdo. Dr. **Carlos Nicolás Rodríguez**

Agradecimientos

En primer lugar a mi directora, Dra. Rosa Morcuende, por sus enseñanzas, apoyo y orientación durante estos años de formación científica, sin su confianza este trabajo no habría sido posible. Igualmente, a mi tutora Dra. Josefa Babiano por su disposición y palabras de aliento.

Al grupo de trabajo, a los Dres. Pilar Pérez y Rafael Martínez-Carrasco, María Ángeles Boyero, Ángel Luis Verdejo, Rubén Vicente, Javier Córdoba, Fátima Valeros, Estefanía Uberegui, por su apoyo y cooperación, que han sido indispensables para sentirse motivado todo el tiempo que duró mi estancia en el IRNASA.

Al programa de becas que financió mis años de formación, JAE-Predoc del CSIC (JAEPre-09-02196), y estancias breves en centros extranjeros, que fueron una gran contribución a mi aprendizaje. Mis agradecimientos a los Profesores Patrick Hayes, Oregon State University (USA) (2010ESTCSIC-6139), Alejandro del Pozo, Universidad de Talca (Chile) (2011ESTCSIC -6855) y Arnd Heyer Universität Stuttgart (Alemania) (2012ESTCSIC -7797).

Al proyecto de cooperación internacional entre España y Chile, CSIC-CONICYT (P2007 CLO2) que fue el que permitió tomar el primer contacto para realizar el presente trabajo. Especiales agradecimientos a los investigadores chilenos que nos proporcionaron el material vegetal para poder llevar a cabo esta investigación, Dres. Iván Matus y Alejandro del Pozo, como también, a la Dra. Dalma Castillo y Yerko Quitral, todos ellos mis primeros mentores.

A mis padres, familia y amigos, los que me han acompañado durante todo el camino. Gracias por toda su sabiduría, comprensión y apoyo.

A.M.

A: velocidad de asimilación fotosintética del CO ₂	ISS: índice de sensibilidad a la sequía
Aa: aminoácidos	Isd: diferencia mínima significativa
ABA: ácido abscísico	MES: ácido 2-etanosulfónico
ADP: adenosina difosfato	MOPS: ácido 3-propanosulfónico
ADN: ácido desoxirribonucleico	m.s.n.m.: metros sobre el nivel del mar
ADNasa: desoxirribonucleasa	N: nitrógeno
ADNc: ADN complementario	NADH: nicotinamida adenina dinucleótido
ADP-glucosa: adenosina difosfato glucosa	NAD(P): nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)
AGPasa: ADP-glucosa pirofosforilasa	NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) reducido
ARN: ácido ribonucleico	Nasa: nitrogenasa
ARNasa: ribonucleasa	NiR: nitrito reductasa
ARNm: ARN mensajero	NNEDA: N-naftiletildiamina
ATP: adenosina trifosfato	NR: nitrato reductasa
BSA: seroalbúmina bovina	2-OG: 2-oxoglutarato
C: carbono	PAD: detector amperométrico de pulsos
Chl: clorofila	pb: pares de bases
CDPK: proteína quinasa dependiente de calcio	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
C_i: concentración de CO ₂ en los espacios intercelulares	3PGA: 3-fosfoglicerato
cv: cultivar	6Pgluonato: gluonato-6-fosfato
CWINV2: invertasa de pared celular	PGI: fosfoglucosa isomerasa
Cys: cisteína	Pi: fosfato inorgánico
d.d.s.: días después de la siembra	PK_{III}: proteína quinasa Tipo III
DDT: dicloro difenil tricloroetano	PMS: metasulfato de fenazina
DEPC: dietileno Pirocarbonato	PMSF: fluoruro de fenilmetil sulfonilo
DHAP: dihidroxiacetona fosfato	PPI: pirofosfato inorgánico
dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato	PP2A: proteína fosfatasa del tipo 2A
dATP: desoxiadenosina trifosfato	PVPP: polivinil polipirrolidona
dGTP: desoxiguanosina trifosfato	qRT-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real
dCTP: desoxicitidina trifosfato	RCSL: línea recombinante con sustitución de cromosomas
dTTP: desoxitimidina trifosfato	ROS: especies reactivas de oxígeno
E: velocidad de transpiración	Rubisco: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa
EDTA: ácido etilendiamino tetraacético	RuBP: ribulosa-1,5-bisfosfato
FAD: flavin adenin dinucleótido	RWC: contenido hídrico relativo
FEH: fructano exohidrolasa	S6P: sacarosa-6-fosfato
1-FEH: fructano 1-exohidrolasa	SBE: enzimas ramificadoras de almidón
6-FEH: fructano 6-exohidrolasa	SED: error estándar de la diferencia
1-FFT: fructano:fructano 1-fructosiltransferasa	6-SFT: sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa
6G-FFT: fructano:fructano 6G-fructosiltransferasa	SLA: área foliar específica
F-2,6-bisP: fructosa-2,6-bisfosfato	SPP: sacarosa fosfato fosfatasa
F-2,6-bisPasa: fructosa-2,6-bisfosfatasa	SPS: sacarosa fosfato sintasa
F-1,6-bisPasa: fructosa-1,6-bisfosfatasa	SS: almidón sintasa
F-1,6-bisP: fructosa-1,6-bisfosfato	1-SST: sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa
F6P: fructosa-6-fosfato	SuSy: sacarosa sintasa
F6P2K: fructosa-6-fosfato-2-quinasa	TCA: ciclo de los ácidos tricarbóxicos
G1P: glucosa-1-fosfato	TEA: trietanolamina
G6P: glucosa-6-fosfato	TFs: factores de transcripción
G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	T_m: temperatura de fusión
g_m: conductancia del mesófilo	TP: triosas fosfato
GOGAT: glutamato sintasa	Tre6P: trehalosa-6-fosfato
GS: glutamina sintasa	U: unidades de enzima
g_s: conductancia de los estomas	UDP-glucosa: uridina difosfato glucosa
HK: hexoquinasa	UTP: uridina trifosfato
Hepes: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanosulfónico	WSC: carbohidratos solubles en agua
HPAEC: cromatografía de intercambio aniónico de alta presión	WUE: eficiencia en el uso del agua
IC: índice de cosecha	ψ: potencial hídrico foliar
IRGA: analizador de gases en el infrarrojo	

“Si quieres construir un barco, no empieces por buscar madera, cortar tablas o distribuir el trabajo, sino que primero has de evocar en los hombres el anhelo de mar libre y ancho”

Antoine De Saint Exupery

Índice

1.- Introducción	1
1.1.- Metabolismo del carbono.	4
1.1.1.- Asimilación fotosintética del carbono.	4
1.1.1.1.- Síntesis de almidón.	6
1.1.1.2.- Síntesis de sacarosa.	8
1.1.1.3.- Síntesis de fructanos.	10
1.1.2.- Metabolismo del nitrógeno.	14
1.1.2.1.- Asimilación del nitrógeno.	14
1.2.- Respuestas de la planta al ambiente: sequía.	18
1.2.1.- Fotosíntesis y déficit hídrico.	18
1.2.2.- Efectos del déficit hídrico en las plantas.	21
1.2.3.- Producción de grano y déficit hídrico.	22
1.3.- Descripción de la especie de estudio: cebada.	25
1.3.1.- <i>Hordeum spontaneum</i>	25
1.3.2.- Cebada cultivada (<i>Hordeum vulgare</i> L.).	27
1.3.3.- Características de la cebada.	28
1.4.- Origen del material vegetal usado en este estudio.	29
2.- Objetivos.	35
3.- Materiales y métodos.	39
3.1.- Material vegetal.	41
3.2.- Condiciones de cultivo.	41
3.2.1.- Lugar de cultivo.	41
3.2.2.- Descripción de las macetas y el sustrato.	42
3.2.3.- Siembra en macetas.	43
3.2.4.- Composición de la solución nutritiva.	44
3.3.- Diseño y descripción de los experimentos.	45
3.3.1.- Experimento 1.	46
3.3.2.- Experimento 2.	48

3.4.- Recogida de muestras.....	50
3.4.1.- Criogenización de material vegetal para estudios bioquímicos y/o moleculares.....	50
3.4.2.- Toma de muestras para estudiar el crecimiento del tallo principal de las plantas.....	52
3.5.- Determinación del estado hídrico de las hojas.....	53
3.6.- Producción final.	53
3.7.- Medida de la asimilación fotosintética del carbono.	54
3.8.- Análisis bioquímicos.	55
3.8.1.- Maceración y preparación del material vegetal.....	55
3.8.2.- Extracción de metabolitos.....	56
3.8.2.1.- Determinación de clorofilas.	57
3.8.2.2.- Determinación de carbohidratos solubles.	58
3.8.2.2.1.- Valoración de glucosa y fructosa.....	59
3.8.2.2.2.- Valoración de sacarosa.....	61
3.8.2.2.3.- Valoración de fructanos.	62
3.8.2.3.- Extracción de proteínas.....	62
3.8.2.3.1.- Valoración de proteínas solubles.	63
3.8.2.4.- Extracción y valoración de almidón.....	63
3.8.2.5.- Determinación de aminoácidos.	64
3.8.2.6.- Análisis del grado de polimerización de los fructanos.	65
3.8.3.- Ensayo in vitro de la actividad nitrato reductasa.	67
3.8.4.- Determinación de nitrógeno total.	69
3.9.- Análisis moleculares.	71
3.9.1.- Aislamiento del ácido ribonucleico.	71
3.9.2.- Cantidad y calidad del ácido ribonucleico.....	72
3.9.3.- Electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes.	72
3.9.4.- Digestión con desoxirribonucleasa.	74
3.9.5.- Síntesis de ADN complementario.....	75
3.9.6.- Diseño de primers específicos.....	75

3.9.7.- Condiciones de la PCR cuantitativa en tiempo real.	76
3.9.8.- Comprobación de la especificidad de los primers diseñados.	78
3.9.9.- Selección de genes de referencia para la normalización de los resultados de expresión génica.	79
3.9.10.- Análisis y cuantificación de los resultados de expresión génica.	80
3.10.- Análisis estadístico de los datos.	82
4.- Resultados.	83
4.1.- Experimento 1.	85
4.1.1.- Efecto del déficit hídrico en el intercambio gaseoso de los genotipos de cebada.	85
4.1.2.- Efecto del déficit hídrico en el contenido de metabolitos de los genotipos de cebada.	90
4.1.2.1.- Contenido foliar de carbohidratos.	91
4.1.2.1.1.- Grado de polimerización de los fructanos de las hojas.	94
4.1.2.2.- Contenido de carbohidratos en el último entrenudo del tallo principal.	96
4.1.2.2.1.- Grado de polimerización de los fructanos en el último entrenudo del tallo.	100
4.1.2.3.- Contenido foliar de clorofilas, aminoácidos y proteínas.	102
4.1.2.4.- Contenido de aminoácidos y proteínas en el último entrenudo del tallo principal.	103
4.1.3.- Efecto del déficit hídrico en el crecimiento de los genotipos de cebada.	103
4.1.3.1.- Parámetros de crecimiento de las plantas de cebada al inicio del desarrollo del grano.	104
4.1.3.1.1.- Contenido hídrico relativo de las hojas.	104
4.1.3.1.2.- Superficie verde de las partes del tallo principal.	104
4.1.3.1.3.- Porcentaje de humedad de las partes del tallo principal.	106
4.1.3.1.4.- Peso seco de las partes del tallo principal.	107
4.1.3.1.5.- Longitud de las fracciones del tallo del tallo principal.	109
4.1.3.1.6.- Peso específico de las fracciones del tallo del tallo principal.	110
4.1.3.2.- Parámetros de crecimiento de las plantas de cebada en la madurez.	111
4.1.3.2.1.- Peso seco de las partes del tallo principal.	111
4.1.3.2.2.- Longitud de las fracciones del tallo del tallo principal.	112

4.1.3.2.3.- Peso específico de las fracciones del tallo del tallo principal.	113
4.1.3.2.4.- Biomasa total.....	114
4.1.3.2.5.- Número de tallos y espigas por planta.....	115
4.1.4.- Efecto del déficit hídrico en la producción de grano de los genotipos de cebada.	116
4.1.4.1.- Espiga del tallo principal.....	117
4.1.4.2.- Espigas por planta.	118
4.1.4.3.- Índice de cosecha (IC).....	119
4.1.5.- Efecto del déficit hídrico en el contenido de metabolitos en la madurez de los genotipos de cebada.	119
4.1.5.1.- Contenido de carbohidratos y proteínas en el grano de la espiga del tallo principal... 120	
4.1.5.2.- Contenido de carbohidratos y proteínas en las hojas y en el último entrenudo del tallo.	122
4.2.- Experimento 2.....	125
4.2.1.- Efecto del déficit hídrico en el intercambio gaseoso de los genotipos de cebada.	125
4.2.2.- Efecto del déficit hídrico en el contenido de metabolitos de los genotipos de cebada.	132
4.2.2.1.- Contenido foliar de carbohidratos.	132
4.2.2.2.- Contenido de carbohidratos en el último entrenudo del tallo principal.	136
4.2.2.3.- Contenido de carbohidratos en el penúltimo entrenudo del tallo principal.	139
4.2.2.4.- Contenido foliar de compuestos nitrogenados.....	143
4.2.2.5.- Contenido de proteínas en el último entrenudo del tallo principal.....	145
4.2.2.6.- Contenido de proteínas en el penúltimo entrenudo del tallo principal.	146
4.2.3.- Efecto del déficit hídrico en la actividad nitrato reductasa foliar de los genotipos de cebada.	147
4.2.4.- Efecto del déficit hídrico en el perfil de expresión de genes del metabolismo del carbono y del nitrógeno en los genotipos de cebada.	149
4.2.4.1.- Nivel de expresión de genes del metabolismo del C y N en las hojas.....	149
4.2.4.2.- Nivel de expresión de genes del metabolismo del C y N en el último entrenudo del tallo.	151
4.2.5.- Efecto del déficit hídrico en el crecimiento de los genotipos de cebada.....	153
4.2.5.1.- Parámetros de crecimiento de las plantas de cebada en la fase reproductiva.	153

4.2.5.1.1.- Contenido hídrico relativo de las hojas.....	153
4.2.5.1.2.- Área foliar específica.....	154
4.2.5.1.3.- Superficie verde de las partes del tallo principal.....	155
4.2.5.1.4.- Porcentaje de humedad de las partes del tallo principal.....	158
4.2.5.1.5.- Peso seco de las partes del tallo principal.....	162
4.2.5.1.6.- Longitud de las fracciones del tallo del tallo principal.....	165
4.2.5.2.- Parámetros de crecimiento de las plantas de cebada en la madurez.....	167
4.2.5.2.1.- Peso seco de las partes del tallo principal.....	167
4.2.5.2.2.- Longitud de las fracciones del tallo del tallo principal.....	169
4.2.5.2.3.- Peso específico de las fracciones del tallo del tallo principal.....	170
4.2.5.2.4.- Biomasa total.....	171
4.2.5.2.5.- Número de tallos y espigas por planta.....	172
4.2.6.- Efecto del déficit hídrico en la producción de grano de los genotipos de cebada.....	173
4.2.6.1.- Espiga del tallo principal.....	173
4.2.6.2.- Espigas por planta.....	173
4.2.6.3.- Índice de Cosecha (IC).....	174
5.- Discusión.....	175
5.1.- Experimento 1.....	177
5.1.1.- El déficit hídrico moderado afecta a la asimilación fotosintética del CO ₂ en la post-antesis de la cebada.....	177
5.1.2.- El déficit hídrico altera la partición del C y N en las hojas y el último entrenudo del tallo. Relación con el contenido y grado de polimerización de los fructanos.....	180
5.1.2.1.- Partición del C y N en las hojas.....	181
5.1.2.2.- Partición del C y N en el último entrenudo del tallo.....	188
5.1.3.- El déficit hídrico afecta al crecimiento del tallo principal durante la post-antesis de la cebada.....	194
5.1.3.1.- Crecimiento en el inicio del desarrollo del grano.....	194
5.1.3.2.- Crecimiento en la madurez. Contribución de reservas en el tallo al rendimiento de grano. Repercusiones en el contenido de C y N en el grano.....	200

5.1.4.- El déficit hídrico afecta a la acumulación de biomasa y rendimiento de grano de las plantas de cebada.	208
5.2.- Experimento 2.....	212
5.2.1.- El déficit hídrico de menor intensidad afecta a la asimilación fotosintética del CO ₂ en la post-antesis de la cebada	212
5.2.2.- El déficit hídrico altera la partición del C y N en las hojas y los entrenudos del tallo. Relación con la actividad de los enzimas y/o la expresión de genes de su síntesis y/o degradación.	216
5.2.2.1.- Partición del C y N en las hojas.....	216
5.2.2.2.- Partición del C y N en el último y penúltimo entrenudos del tallo.	223
5.2.3.- El déficit hídrico afecta al crecimiento del tallo principal durante la post-antesis de la cebada.	231
5.2.3.1.- Crecimiento durante la fase reproductiva.	231
5.2.3.2.- Crecimiento en la madurez y rendimiento de grano.	234
5.2.4.- El déficit hídrico afecta a la acumulación de biomasa y rendimiento de grano de las plantas de cebada.	237
6.- Conclusiones	241
7.- Bibliografía	245

1.- Introducción

Entre los distintos factores ambientales que afectan al crecimiento y la productividad de los cultivos, tales como la intensidad luminosa, la temperatura, la salinidad, la disponibilidad de agua y nutrientes, el CO₂ etc., se considera a la sequía como uno de los principales factores limitantes de la productividad agrícola (Boyer, 1982; Ellis *et al.*, 2000; Benešová *et al.*, 2012). Incluso las regiones agrícolas más productivas experimentan anualmente periodos breves de sequía y, ocasionalmente, pueden llegar a soportar anualidades con una sequía severa. Por lo que los cultivos experimentan con cierta frecuencia periodos de escasez de agua durante su ciclo vital, cuya intensidad depende de la incidencia y probabilidad de la pluviosidad, de la evaporación y de la capacidad de almacenaje de humedad de los suelos (Wery *et al.*, 1994; Stanca *et al.*, 2003). Las condiciones climáticas extremas y el hecho de que aproximadamente un cuarto de la superficie terrestre pertenezca a zonas áridas o semiáridas hacen que la sequía sea uno de los estreses ambientales más habituales y con mayores repercusiones en la producción alimentaria a nivel mundial (Rouphael *et al.*, 2012). Las previsiones de cambio climático global auguran un descenso de las precipitaciones en la cuenca Mediterránea con periodos de sequía aún más severos y frecuentes (IPCC, 2013). Pronósticos que agravarán aún más las limitaciones en la disponibilidad de agua y comprometerán el crecimiento y rendimiento de los cultivos en las zonas más vulnerables (Araus *et al.*, 2002). Con la disminución de los recursos hídricos en la agricultura y la necesidad de satisfacer la creciente demanda de alimentos como consecuencia del incremento de la población a nivel mundial se requerirán cultivos mejor adaptados a la sequía (Eisenstein, 2013). La cebada es uno de los cereales más ampliamente cultivados en áreas mediterráneas (Ullrich, 2010), y el crecimiento y la productividad de la cebada es altamente sensible a una reducción en la disponibilidad hídrica del suelo. En áreas mediterráneas, la escasez de lluvias y, por tanto, la sequía tiene lugar frecuentemente durante la etapa de llenado del grano de los cereales (Dolferus *et al.*, 2013). Esto puede limitar la fotosíntesis y la producción de asimilados fotosintéticos que son directamente transferidos al grano, por lo que la redistribución y translocación de las reservas almacenadas durante el desarrollo vegetativo y etapas tempranas de la fase reproductiva pueden llegar a ser la fuente predominante de asimilados al grano (Schnyder, 1993; Zhang *et al.*, 2006). Los carbohidratos solubles en agua almacenados en el tallo pueden contribuir en mayor medida a mantener el suministro de asimilados al grano, lo cual influirá en el rendimiento de grano (Gebbing and Schnyder, 1999; Yang and Zhang, 2006). Los programas de mejora genética han permitido el desarrollo de genotipos con características que confieren adaptabilidad a la sequía. Por ello, el estudio de la variabilidad genotípica en la capacidad de acumulación y translocación de asimilados al grano en condiciones de escasa disponibilidad hídrica puede ser de utilidad para la selección de genotipos más eficientes y con un mayor rendimiento en las condiciones descritas.

1.1.- Metabolismo del carbono.

El crecimiento y la producción de las plantas dependen de la asimilación fotosintética del carbono y de la asimilación de nutrientes inorgánicos, de los cuales el nitrógeno es cuantitativamente el más importante (Cross *et al.*, 2006), y de los programas de desarrollo que influyen en la eficiencia de la conversión del carbono en biomasa (Sulpice *et al.*, 2010). La fotosíntesis es el proceso biológico fundamental para la vida mediante el cual se produce la conversión de la energía solar en energía química (Medrano and Flexas, 2000) que permite la asimilación del carbono en compuestos orgánicos, carbohidratos, los cuales son utilizados a su vez en la síntesis de otros compuestos como los ácidos orgánicos, aminoácidos y lípidos (Geigenberger *et al.*, 2005), los componentes básicos para la acumulación de biomasa.

1.1.1.- Asimilación fotosintética del carbono.

La fotosíntesis en plantas comprende dos fases, una primera, la captación de la energía solar para generar energía química en forma de ATP y poder reductor (NADPH) por medio del transporte electrónico y la fotofosforilación. Y una segunda, la utilización de estos productos altamente energéticos para reducir los elementos constitutivos de la materia orgánica (C, H, O, N, S...) tomados de fuentes inorgánicas (agua, CO₂ atmosférico, nitratos, sulfatos etc.) e incorporarlos a la materia orgánica a través de diferentes rutas biosintéticas dentro y fuera del cloroplasto (Lawlor, 1993). La asimilación fotosintética del CO₂ requiere la operación conjunta del ciclo de Calvin-Benson y la síntesis de productos finales (Stitt *et al.*, 2010). El ciclo de Calvin-Benson en plantas C₃ tiene lugar en el estroma del cloroplasto y comprende tres fases que engloban trece reacciones catalizadas por once enzimas. El ciclo se inicia con la **carboxilación** de la molécula aceptora del CO₂, la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), por el enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) para dar lugar a dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3PGA) (Fig. 1.1). En una siguiente etapa, **reductiva**, la inmensa mayoría del poder reductor y el ATP generados en las reacciones luminosas de la fotosíntesis se utilizan en la reducción del 3PGA a triosas fosfato (TP). En una fase final, conocida como **regenerativa**, por isomerizaciones, condensaciones y reordenaciones, las TP se emplean para producir la molécula aceptora del CO₂, la RuBP, proceso que requiere también consumo de energía en forma de ATP (Farquhar *et al.*, 2001; Heldt, 2005). Las TP generadas en el ciclo pueden ser utilizadas en la síntesis de productos finales como la sacarosa y el almidón a través de rutas gluconeogénicas físicamente separadas que tienen lugar en el citosol y el cloroplasto, respectivamente (Stitt *et al.*, 2010). Ciertos aminoácidos y lípidos son sintetizados también en el cloroplasto a partir del carbono fijado en la fotosíntesis (Geigenberger *et al.*, 2005; Stitt *et al.*, 2010).

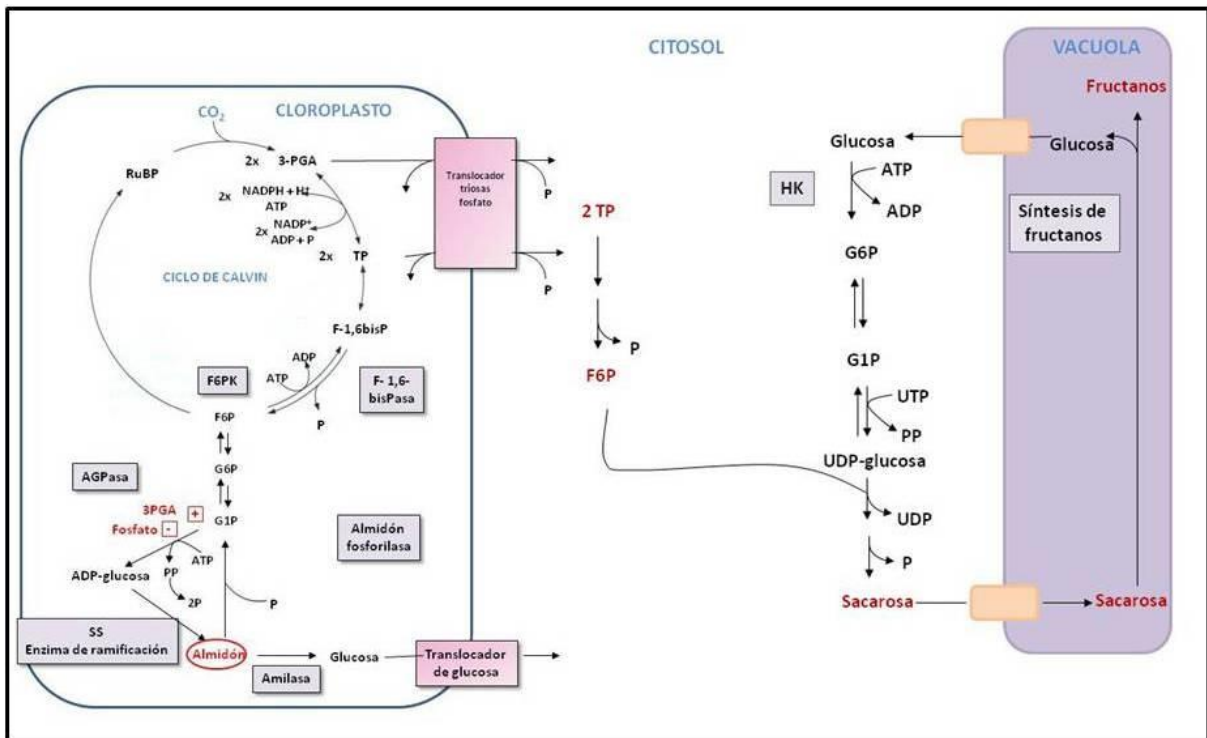


Figura 1.1. El producto de la fijación fotosintética del CO_2 son las triosas fosfato, parte de las cuales pueden ser transportadas al citosol a través del translocador de triosas fosfato para ser transformadas en sacarosa, o bien pueden ser convertidas en almidón en el cloroplasto. La sacarosa puede distribuirse al resto de la planta o servir de sustrato para la biosíntesis de fructanos en la vacuola. (Adaptado de Heldt, 2005).

En la mayoría de las plantas, los productos primarios de la asimilación fotosintética del carbono en las hojas son la sacarosa y el almidón (Zeeman *et al.*, 2007), y la velocidad de síntesis de sacarosa en el citosol está coordinada con la velocidad de fijación de CO_2 y la síntesis de almidón en el cloroplasto (Lunn, 2007). Estas rutas están unidas por el translocador de triosas fosfato en la membrana del cloroplasto (Fig. 1.1), ya que parte de las triosas fosfato generadas en el ciclo de Calvin-Benson pueden ser exportadas al citosol en intercambio estequiométrico con fosfato inorgánico (P_i) a través de dicho translocador y servir como fuente de carbono para la síntesis de sacarosa, o bien pueden ser utilizadas en el cloroplasto para la síntesis de almidón (Heldt, 2005). La sacarosa es uno de los principales productos de la fotosíntesis y el carbohidrato más comúnmente transportado en plantas vasculares (Aoki *et al.*, 2012). Como tal, proporciona la mayoría de la energía y el carbono necesario para el crecimiento de órganos no fotosintéticos y para el mantenimiento de la biosíntesis de almidón, fructanos y reservas de lípidos en semillas, tubérculos, tallos y frutos (MacRae and Lunn, 2012). La sacarosa es una forma de almacenaje de carbono que a menudo se acumula en plantas expuestas al frío o la sequía (Pérez *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2008b; Méndez *et al.*, 2011), actuando como soluto compatible para proteger la integridad celular (Xue *et al.*, 2008b). Y actúa también como molécula señalizadora, modulando la expresión de genes involucrados en el metabolismo y desarrollo (Koch, 2004; Osuna *et al.*, 2007). El almidón, por su parte, es el principal carbohidrato de almacenaje en plantas superiores, se deposita en gránulos en los cloroplastos de los tejidos fotosintéticos y representa un almacenaje transitorio de carbono, que se moviliza durante la noche para mantener la respiración, la exportación de sacarosa y el crecimiento en la oscuridad (Scofield *et al.*, 2009). En este contexto, el almidón se ha identificado como el principal integrador en la regulación del crecimiento de las plantas frente a cambios en la disponibilidad de carbono (Sulpice *et al.*, 2009). Además, se almacena en amiloplastos en el endospermo, tubérculos y raíces, en los que

desempeña un papel importante en la nutrición de los embriones en germinación y en el sostenimiento de la propagación vegetativa.

1.1.1.1.- Síntesis de almidón.

El almidón es un polímero insoluble de glucosa formado por amilosa, un glucano predominantemente lineal con enlaces $\alpha(1-4)$, y por amilopectina, generalmente el más abundante de los dos polímeros, en el que entre los enlaces $\alpha(1-4)$ se intercalan enlaces $\alpha(1-6)$ que generan ramificaciones en la cadena de glucano (Comparot-Moss and Denyer, 2009). En los cloroplastos y el endospermo de las semillas, la amilosa y la amilopectina se organizan en gránulos de tamaño variable (Taiz and Zeiger, 2006a). La síntesis de almidón tiene lugar en los plastidios de plantas superiores, concretamente, en los cloroplastos en hojas y frutos verdes y en los leucoplastos en tejidos heterotróficos (Heldt, 2005). El paso inicial en esta ruta biosintética es el catalizado por la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), que utiliza la glucosa-1-fosfato (G1P) y el ATP generado fotoquímicamente para sintetizar la ADP-glucosa y pirofosfato inorgánico (PPi) (Fig. 1.1). La ADP-glucosa generada actúa como el donador inmediato de glucosilos para las diferentes clases de almidón sintetasas (SS) (Heldt, 2005; Geigenberger, 2011), las cuales permiten la elongación de las cadenas de glucano con enlaces $\alpha(1-4)$ de los dos polímeros de almidón insolubles que componen el gránulo, la amilosa y la amilopectina (Geigenberger, 2011). En plantas se conocen cinco tipos diferentes de SS, la almidón sintasa unida al gránulo que es la responsable de la síntesis de amilosa, y cuatro SS solubles (SS I a SS IV) involucradas en la síntesis de amilopectina (Geigenberger, 2011). Las ramificaciones se deben a la acción de dos tipos de enzimas ramificadoras de almidón (SBE I y II), las cuales difieren en la longitud de la cadena de glucano transferida y en la especificidad de los sustratos (Börnke and Sonnewald, 2011). La síntesis de almidón requiere también la participación de dos tipos de enzimas desramificadoras, las cuales degradan ramificaciones de los glucanos ramificados y facilitan la cristalización dentro del gránulo. Estudios genéticos han proporcionado evidencias de que la acción coordinada de las diferentes isoformas de almidón sintetasas y de las enzimas ramificadoras y desramificadoras del almidón desempeñan un papel importante en la síntesis de la matriz cristalina del gránulo de almidón (Geigenberger, 2011). Y las SS III y SS IV parecen ser las responsables de la iniciación del gránulo de almidón (Szydłowski *et al.*, 2009).

En la mayoría de los tejidos, la AGPasa se encuentra exclusivamente en los plastidios. En hojas, la G1P es sintetizada a partir de un intermediario del ciclo de Calvin-Benson, la fructosa-6-fosfato (F6P), por la acción concertada de los enzimas fosfoglucosa isomerasa y fosfoglucosa mutasa, mientras que el ATP es generado por la fotofosforilación en la membrana tilacoidal. En tejidos no fotosintéticos, la sacarosa es transformada por una serie de reacciones citosólicas en glucosa-6-fosfato (G6P), la cual es importada al amiloplasto en intercambio con fosfato inorgánico a través del translocador G6P/Pi (Kammerer *et al.*, 1998) donde es convertida en G1P por la fosfoglucosa mutasa plastidial. El segundo sustrato de la AGPasa, el ATP, procede de la respiración mitocondrial y es importado al interior de los plastidios a través de un transportador de membrana ATP/ADP (Tjaden *et al.*, 1998). Sin embargo, en el endospermo de las semillas de cereales, como cebada, trigo, maíz y arroz, la AGPasa está principalmente localizada en el citosol, y la mayoría de la ADP-glucosa necesaria para la síntesis de almidón se produce en el citosol y debe ser importada al interior de los plastidios vía un transportador específico (Denyer *et al.*, 1996; Tetlow *et al.*, 2003). Estudios con mutantes han mostrado evidencias de que la ruta biosintética de almidón en el endospermo de cereales requiere

dos pasos adicionales, la AGPasa citosólica y un transportador de ADP-glucosa, los cuales no se precisan en otros tejidos de los cereales o en otras especies vegetales (Kirchberger *et al.*, 2007).

Se ha propuesto una ruta alternativa a la ruta de síntesis de almidón clásica en hojas, que indica que la ADP-glucosa se sintetiza en el citosol no por la AGPasa sino por el enzima sacarosa sintasa (SuSy), utilizando ADP y sacarosa como sustratos, la cual es posteriormente importada al cloroplasto para sintetizar almidón (Baroja-Fernández *et al.*, 2004; Muñoz *et al.*, 2005). Esta nueva ruta biosintética del almidón ha sido objeto de considerable debate (Neuhaus *et al.*, 2005; Lunn, 2007).

La reacción catalizada por la AGPasa plastidial se considera el principal paso limitante del proceso biosintético, por tratarse de un enzima altamente regulado en todas las plantas analizadas (Ballicora *et al.*, 2004). La AGPasa es un heterotetrámero compuesto de dos subunidades grandes y dos pequeñas (Okita *et al.*, 1990), las cuales son necesarias para el óptimo funcionamiento del enzima, aunque la contribución de cada una de ellas no es equivalente (Iglesias *et al.*, 1993). Las subunidades grandes desempeñan más un papel regulador, y las pequeñas poseen propiedades catalíticas y reguladoras (Cross *et al.*, 2004). La investigación de la regulación a nivel transcripcional de la AGPasa ha mostrado que la sacarosa y la glucosa aumentan la expresión de varios de los genes que codifican la AGPasa en plantas (Müller-Röber *et al.*, 1990; Sokolov *et al.*, 1998; Tiessen *et al.*, 2003), y la trehalosa incrementa también los niveles de transcritos de uno de los genes que codifica la subunidad grande de la AGPasa en *Arabidopsis* (Wingler *et al.*, 2000), mientras que el nitrato (Scheible *et al.*, 1997b) y el fosfato (Nielsen *et al.*, 1998) disminuyen la expresión del enzima. Este tipo de control a nivel transcripcional podría permitir que la acumulación de almidón responda a alteraciones en el estado nutricional o de carbono de la planta y del ambiente (Geigenberger, 2011).

Se ha observado que las variaciones en los niveles de transcritos de los genes que codifican la proteína frecuentemente no se correlacionan con cambios en la cantidad de proteína y/o la actividad del enzima, lo que sugiere mecanismos de regulación adicionales a nivel post-transcripcional (Gibon *et al.*, 2004a). Existen evidencias de que la AGPasa de tejidos fotosintéticos y heterotróficos, con la excepción del endospermo del trigo y la cebada, es alostéricamente activada por 3PGA e inhibida por Pi (Tetlow *et al.*, 2004), lo que permite que la velocidad de síntesis de almidón aumente cuando los intermediarios fosforilados se acumulan y el Pi disminuye en el estroma (Ballicora *et al.*, 2004). Dicha regulación alostérica posibilita que se ajuste la velocidad de síntesis de almidón en respuesta a cambios en el balance entre la fotosíntesis y la síntesis de sacarosa en las hojas (Stitt *et al.*, 1987) y entre la hidrólisis de sacarosa y la respiración en los tubérculos (Geigenberger *et al.*, 1998).

La AGPasa está sujeta a una regulación redox post-traducciona que involucra la formación de un puente entre moléculas de cisteína (Cys82) de las dos subunidades pequeñas del enzima. Este tipo de control del enzima conlleva a que la forma reducida y activa de la AGPasa muestre ambas subunidades pequeñas como un monómero, y en la forma oxidada e inactiva se encuentren como un dímero (Tiessen *et al.*, 2012). La reducción de la AGPasa incrementa la afinidad del enzima por los sustratos y la sensibilidad por el activador alostérico 3PGA, a la vez que disminuye la sensibilidad a la inhibición por Pi. La iluminación de hojas o de cloroplastos aislados conduce a una rápida activación redox de la AGPasa, la cual desaparece completamente en la oscuridad (Hendriks *et al.*, 2003). Estudios con plantas transgénicas han mostrado que la regulación redox contribuye a la coordinación de la síntesis y degradación de almidón en respuesta a un ciclo de luz/oscuridad (Stitt *et al.*, 2010). Se ha indicado también que la regulación alostérica de la AGPasa en respuesta a cambios en las concentraciones de 3PGA y Pi en los plastidios podría proporcionar un mecanismo adicional para la

modulación de la biosíntesis de almidón a transiciones de luz/oscuridad. Ambos tipos de regulación de la AGPasa parecen estar interrelacionados y podrían actuar sinérgicamente induciendo la activación de la síntesis de almidón en la luz y su inactivación en la oscuridad (Stitt *et al.*, 2010; Geigenberger, 2011).

A lo largo de un ciclo diurno de luz/oscuridad tienen lugar alteraciones en el balance de carbono de la planta. En hojas de *Arabidopsis*, se ha observado un aumento de la activación redox de la AGPasa durante el día cuando los carbohidratos foliares se acumulan, efecto que puede llegar a ser más pronunciado cuando la utilización del carbono para el crecimiento disminuye (Hendriks *et al.*, 2003; Gibon *et al.*, 2004b). Además, en hojas incubadas con sacarosa o glucosa en la oscuridad se ha encontrado también una activación redox de la AGPasa y de la síntesis de almidón, efecto que fue dependiente de los azúcares e independiente de la luz (Hendriks *et al.*, 2003; Kolbe *et al.*, 2005), mientras que la iluminación de las hojas condujo a una activación adicional. Esto parece indicar que las activaciones redox de la AGPasa dependientes de los azúcares y de la luz pueden ser aditivas (Hendriks *et al.*, 2003). Aun cuando se desconoce el mecanismo implicado, se ha propuesto que un intermediario fosforilado de la biosíntesis de trehalosa, la trehalosa-6-fosfato (Tre6P), podría ser la molécula señal en la ruta de transducción que media la activación redox de la AGPasa dependiente de sacarosa (Kolbe *et al.*, 2005; Lunn *et al.*, 2006), a la vez que podría también estar involucrada en la comunicación entre el citosol y el cloroplasto (Lunn, 2007). Se ha observado que el suministro de Tre6P a cloroplastos aislados promueve la activación redox de la AGPasa (Kolbe *et al.*, 2005) y que los niveles de Tre6P se correlacionan con los de sacarosa (Lunn *et al.*, 2006). De manera que la acumulación de sacarosa en la hoja podría acompañarse de un aumento de los niveles de Tre6P en el citosol, y el incremento de dicho metabolito podría inducir la activación de la AGPasa en el cloroplasto, lo que facilitaría el desvío de fotosintatos desde la sacarosa hacia el almidón y mantendría la fijación del CO₂ (Lunn, 2007).

1.1.1.2.- Síntesis de sacarosa.

La sacarosa es un disacárido formado por glucosa y fructosa. Su síntesis tiene lugar fundamentalmente en el citosol de las células del mesófilo de las hojas (Koroleva *et al.*, 1998) a partir de las triosas fosfato exportadas desde el cloroplasto, las cuales se emplean en la síntesis de fructosa-1,6-bisfosfato, que una vez hidrolizada por la fructosa-1,6-bisfosfatasa (F-1,6-bisPasa) produce fructosa-6-fosfato, la molécula aceptora para la reacción catalizada por la sacarosa fosfato sintasa (SPS) (Fig. 1.2). La isomerización de la F6P por la fosfoglucosa isomerasa genera glucosa-6-fosfato, que es transformada en glucosa-1-fosfato por la fosfoglucosa mutasa. La G1P permite la síntesis de UDP-glucosa, en la reacción catalizada por la UDP-glucosa pirofosforilasa, que es el donador de grupos glucosilos en la reacción catalizada por la sacarosa fosfato sintasa. Dicho enzima cataliza la penúltima reacción en la síntesis de sacarosa, la formación de sacarosa-6-fosfato (S6P) a partir de UDP-glucosa y F6P, la cual es posteriormente hidrolizada a sacarosa por la sacarosa fosfato fosfatasa (SPP) (Lunn and Ap Rees, 1990; Lunn and MacRae, 2003). La ruta de síntesis de sacarosa opera tanto en tejidos fotosintéticos como heterotróficos (Huber and Huber, 1996).

La coordinación de la síntesis de sacarosa en el citosol con la fijación fotosintética del CO₂ y la síntesis de almidón en el cloroplasto involucra cambios en las concentraciones de varios metabolitos en el estroma y el citosol, como las triosas fosfato, hexosas fosfato y fosfato inorgánico, los cuales

modular las SPS de dicotiledóneas, y una proteína quinasa dependiente de calcio (CDPK) que podrían fosforilar las SPS de monocotiledóneas (Huang and Huber, 2001). La SPS es alostéricamente activada por G6P e inhibida por Pi como se ha indicado anteriormente. Y dichos metabolitos no sólo actúan como efectores alostéricos del propio enzima, sino también como efectores de los enzimas de interconversión de la SPS. El Pi inhibe la PP2A y la G6P inhibe la PK_{III} (Weiner *et al.*, 1993). Por ello, cualquier cambio metabólico tendrá implicación en la regulación de la velocidad de síntesis de sacarosa con la asimilación fotosintética (Lunn, 2007).

1.1.1.3.- Síntesis de fructanos.

Junto a la sacarosa y el almidón existe un tercer carbohidrato de reserva en plantas, los fructanos, y entre las especies acumuladoras de estos carbohidratos destacan los cereales de gran cultivo, como el trigo y la cebada (Pollock and Cairns, 1991). Los fructanos son polímeros lineales o ramificados de fructosa derivados de la sacarosa (Lasseur *et al.*, 2006). Constan de una molécula de sacarosa con fructosas adicionales unidas en las posiciones $\beta(2-1)$ y/o $\beta(2-6)$ (Gadegaard *et al.*, 2008). Los fructanos se sintetizan a partir de sacarosa en la vacuola por un grupo de fructosiltransferasas que pertenecen a una familia de 32 enzimas glucósido hidrolasas de plantas (Van den Ende *et al.*, 2011). La incorporación de una molécula de fructosa a uno de los tres grupos alcoholes primarios de la sacarosa da lugar a uno de los tres trisacáridos básicos, 1-kestosa, 6-kestosa o 6G-kestosa (neokestosa) (Fig. 1.3), los cuales son los precursores de todos los fructanos de mayor grado de polimerización. Las uniones entre el C2 de una fructosa y el grupo alcohólico primario del C1 o C6 de otra dan lugar a las uniones $\beta(2-1)$ (inulina) o $\beta(2-6)$ (levano), respectivamente (Chalmers *et al.*, 2005).

Al igual que el almidón, los fructanos sirven como polisacáridos de almacenaje en plantas. Se almacenan predominantemente en la vacuola y pueden encontrarse tanto en el grano como en órganos vegetativos - tallo, hojas y raíces - dependiendo del estado de desarrollo de la planta y las condiciones ambientales, tales como la intensidad luminosa, la temperatura y la disponibilidad hídrica y nutricional (Morcuende *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Morcuende *et al.*, 2005; Verspreet *et al.*, 2013). Junto a su papel como reserva de carbohidratos, los fructanos confieren tolerancia al frío y a la sequía (Pilon-Smits *et al.*, 1995; De Roover *et al.*, 2000; Kawakami *et al.*, 2008), contribuyen al mantenimiento del potencial osmótico, participan en la estabilización de las membranas (Hincha *et al.*, 2000) y desempeñan un papel importante durante el llenado del grano (Joudi *et al.*, 2012; Verspreet *et al.*, 2013). Recientemente, se ha sugerido que podrían contrarrestar el estrés oxidativo (Peshev *et al.*, 2013).

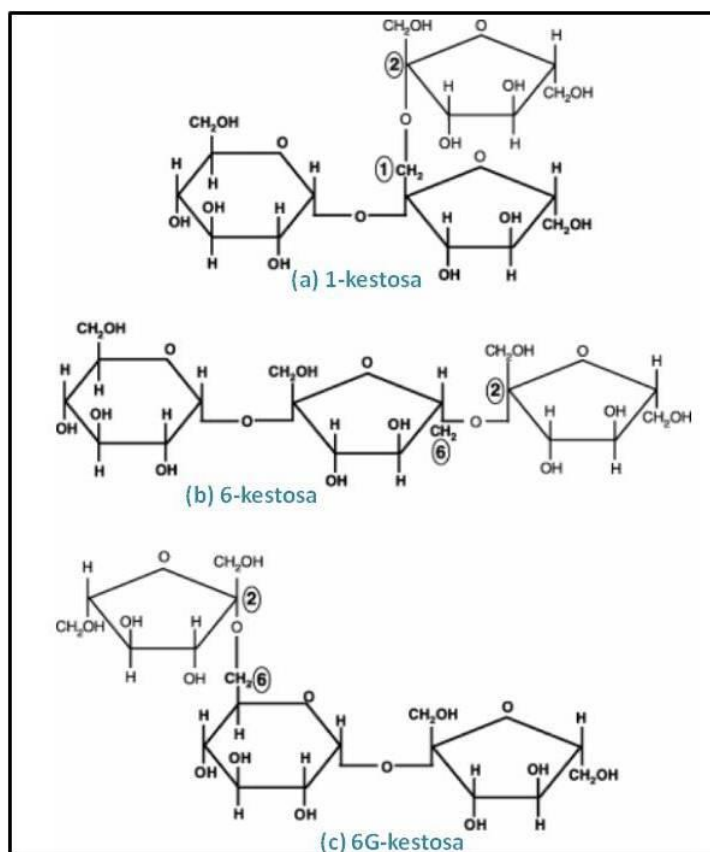


Figura 1.3. Estructura molecular de los tres trisacáridos precursores de los fructanos de plantas. Todas las estructuras resultan de la adición de un residuo de fructosa a la sacarosa (consta de una molécula de glucosa y otra de fructosa, se resalta en negrita en la imagen). Se indican las uniones $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$. (Adaptado de Chalmers *et al.*, 2005).

Los fructanos poseen diferentes estructuras y difieren unos de otros por la longitud de la cadena (grado de polimerización, que puede oscilar entre tres y cientos de unidades de fructosas), las ramificaciones, el tipo de uniones entre fructosas adyacentes y la posición del residuo de glucosa (Lasseur *et al.*, 2011). En plantas se han identificado cinco tipos de fructanos según su estructura:

- inulina lineal:** derivados de la 1-kestosa con uniones $\beta(2-1)$. Este tipo de fructanos se encuentra frecuentemente en plantas del género *Asterales*.
- inulina neoseris:** derivados de la neokestosa con uniones $\beta(2-1)$.
- levano:** derivados de la 6-kestosa con uniones $\beta(2-6)$. Se encuentran presentes en el género *Poaceae*.
- levano neoseris:** derivados de la neokestosa con uniones $\beta(2-6)$.
- levano mixto:** derivados de la 1-kestosa y 6-kestosa con uniones $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$. Se conocen más comúnmente como fructanos del “tipo gramíneas” y se componen de unidades de fructosa con uniones $\beta(2-6)$ y ramificaciones $\beta(2-1)$.

En plantas superiores se han descrito cuatro tipos de fructosiltransferasas que catalizan la síntesis de los diferentes tipos de fructanos: la sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST) permite la transferencia de una fructosa de una molécula de sacarosa a otra para generar 1-kestosa y glucosa (Kawakami and Yoshida, 2005). La sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa (6-SFT) transfiere la fructosa de una sacarosa donadora a la 1-kestosa para formar la 1,6-kestotetraosa y facilita también

la elongación de las moléculas de fructanos por transferencia de fructosilos desde la sacarosa a fructanos con uniones $\beta(2-6)$ (Duchateau *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 2011). La fructano:fructano 1-fructosiltransferasa (1-FFT) cataliza la unión de la fructosa de un fructano a otro o a la sacarosa, generando uniones $\beta(2-1)$ (Kawakami and Yoshida, 2005). La fructano:fructano 6G-fructosiltransferasa (6G-FFT) transfiere la fructosa de una molécula de fructano al residuo glucosilo de otro fructano o sacarosa y facilita la posterior elongación de la cadena con uniones $\beta(2-1)$ o $\beta(2-6)$, lo que permite la formación de fructanos del tipo inulina neoserias o levano neoserias, respectivamente (Chalmers *et al.*, 2005).

Las plantas dicotiledóneas acumulan predominantemente fructanos de la serie inulina (Van Laere and Van den Ende, 2002) y las monocotiledóneas producen mezclas de tipos de fructanos (Chalmers *et al.*, 2005). En trigo y cebada predominan los fructanos estructuralmente más complejos del tipo levano mixto o gramíneas (Bancal *et al.*, 1992). A pesar de la amplia variabilidad de fructanos descritos en plantas no se ha encontrado hasta el momento ninguna especie vegetal que contenga los cuatro genes que codifican las cuatro fructosiltransferasas involucradas en la síntesis de fructanos y que posean a su vez los cinco tipos de fructanos que se han aislado en plantas. En trigo se han clonado y caracterizado el máximo número de fructosiltransferasas - la 1-SST, 1-FFT y 6-SFT - (Kawakami and Yoshida, 2005), las cuales parecen estar involucradas en la biosíntesis de fructanos del tipo gramíneas (Yoshida *et al.*, 2007). La 6G-FFT no se ha mostrado que exista en trigo y se sabe que la cebada carece de dicho enzima (Lasseur *et al.*, 2011). En otras especies vegetales, como es el caso de la cebolla, se ha mostrado que las enzimas 1-SST y 6G-FFT parecen ser suficientes para la síntesis de los tipos de fructanos naturalmente presentes en esta planta (Ritsema and Smeekens, 2003; Weyens *et al.*, 2004). En cebada, se ha propuesto un modelo que comprende la 1-SST y la 6-SFT para la biosíntesis de fructanos del tipo gramíneas (Duchateau *et al.*, 1995; Wiemken *et al.*, 1995). En el que la 6-SFT cataliza la formación de bifurcosa (1,6-kestotetraosa), empleando sacarosa como donador fructosilo y 1-kestosa (producida por la 1-SST) como aceptor fructosilo. La 6-SFT también cataliza la elongación de las moléculas de fructanos transfiriendo fructosilos desde la sacarosa a fructanos con uniones $\beta(2-6)$ (Duchateau *et al.*, 1995). El estudio del patrón de expresión génica y la actividad de los enzimas 1-SST y 6-SFT en hojas de cebada separadas de la planta ha mostrado que la 1-SST desempeña un papel crucial como enzima que controla el flujo del carbono hacia la biosíntesis de fructanos (Nagaraj *et al.*, 2004). Si bien, en condiciones ambientales cambiantes, la 6-SFT puede llegar a desempeñar un papel importante como enzima regulador clave de la biosíntesis de fructanos. La expresión de los genes que codifican la 1-SST y 6-SFT en trigo parece ser modulada por un factor de transcripción R2R3-MYB, el cual está estrechamente co-regulado con dichas fructosiltransferasas (Xue *et al.*, 2011). Y las proteínas quinasas y las fosfatasa parecen estar involucradas en la inducción de las fructosiltransferasas (Martínez-Noël *et al.*, 2009).

La acumulación de fructanos en plantas de trigo y cebada es influenciada por factores ambientales y genéticos (Ehdaie *et al.*, 2006b; Ruuska *et al.*, 2006; McIntyre *et al.*, 2011). Se ha mostrado que tanto la iluminación como la sacarosa incrementan la síntesis de fructanos (Nagaraj *et al.*, 2001; Morcuende *et al.*, 2004), ya que la sacarosa es no sólo el sustrato para la síntesis de fructanos sino que induce también la expresión génica (Müller *et al.*, 2000; Ruuska *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2011) y la actividad (Müller *et al.*, 2000; Joudi *et al.*, 2012) de las fructosiltransferasas cuando se suministra exógenamente. La trehalosa, un disacárido homólogo a la sacarosa, induce la actividad y, en menor extensión, el nivel de expresión de la 6-SFT (Müller *et al.*, 2000). Y las hexosas susceptibles de ser fosforiladas por la hexoquinasa no incrementan la acumulación de fructanos, lo que sugiere que la regulación de la biosíntesis de fructanos por carbohidratos es independiente de la

hexoquinasa y parece depender de la sensibilización por sacarosa (Müller *et al.*, 2000). A diferencia de los carbohidratos, que inducen la acumulación de fructanos, otros nutrientes, como el nitrato y el fosfato, disminuyen el contenido de dichos azúcares (Morcuende *et al.*, 2004; 2005). El nitrato es una señal negativa para la expresión de al menos una de las fructosiltransferasas, la 6-SFT, e independiente de la señalización por carbohidratos (Morcuende *et al.*, 2004). Y el fosfato disminuye la actividad sacarosa fosfato sintasa y reduce los niveles de sacarosa, el sustrato para la biosíntesis de fructanos (Morcuende *et al.*, 2005). Además, ciertos estreses ambientales, como la sequía (Xue *et al.*, 2008b), las temperaturas bajas (Pérez *et al.*, 2001), la reducción del tamaño del colector (Martínez-Carrasco *et al.*, 1993), la deficiencia en nitrógeno (Wang *et al.*, 2000) y el CO₂ elevado (Pérez *et al.*, 2005; Aranjuelo *et al.*, 2011) conducen a una mayor acumulación de fructanos.

La acumulación y removilización de fructanos en plantas involucra la acción concertada de las fructosiltransferasas y las fructano exohidrolasas, las cuales están estrecha y coordinadamente reguladas, junto a las invertasas (Joudi *et al.*, 2012). La degradación de fructanos es catalizada por las fructano exohidrolasas (FEH) que liberan unidades de fructosa terminales. Se han aislado diferentes isoformas de FEH, que incluyen la fructano 1-exohidrolasas (1-FEH) y la fructano 6-exohidrolasas (6-FEH), que hidrolizan los fructanos con uniones $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$, respectivamente (Van den Ende *et al.*, 2004). Las fructano exohidrolasas se regulan a nivel transcripcional, de manera que los niveles de transcritos de las fructano exohidrolasas se relacionan con variaciones en el contenido de fructanos (Xue *et al.*, 2008b). Un aumento de actividad 1-FEH se ha encontrado durante la removilización de fructanos desde el tallo al grano en crecimiento (Van den Ende *et al.*, 2003). Las invertasas ácidas también pueden degradar oligofructanos, si bien hidrolizan preferentemente sacarosa. Dependiendo de su localización celular se distinguen dos tipos: las invertasas de pared celular que se encuentran en el apoplasto y las vacuolares (Lammens *et al.*, 2009). Las isoformas de invertasas de paredes celulares son más activas en semillas en desarrollo y pueden estar involucradas en la partición de sacarosa (Eschrich, 1989) y en la osmoregulación (Meyer and Boyer, 1981). Mientras que las invertasas ácidas solubles o vacuolares regulan los niveles de hexosas/sacarosa en las vacuolas (Winter and Huber, 2000). Se ha observado que algunas invertasas de pared celular no muestran actividad invertasa, y estudios con plantas de tabaco defectivas en invertasas de pared celular sugieren que dichas invertasas podrían desempeñar una función reguladora de la actividad de las invertasas de pared celular activas (Le Roy *et al.*, 2013).

1.1.2.- Metabolismo del nitrógeno.

1.1.2.1.- Asimilación del nitrógeno.

Los requisitos básicos para el crecimiento y la producción de biomasa de las plantas son la luz, el agua, el CO₂ y los elementos minerales. Entre los nutrientes minerales, el nitrógeno (N) es el macronutriente más importante y crucial para el desarrollo de las plantas (Marschner, 1995). Es esencial para la síntesis de aminoácidos, los constituyentes principales de las proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas y otros metabolitos y componentes celulares (Campbell, 1999; Stitt *et al.*, 2002). Las plantas demandan mayores cantidades de nitrógeno que de ningún otro elemento mineral. Ese mayor requerimiento se refleja en la gran cantidad de N invertido en proteínas fotosintéticas, particularmente en Rubisco, y en proteínas cosechadoras de la luz (Zhu *et al.*, 2008), lo que facilita el uso dependiente de la luz del CO₂, el agua y el nitrógeno inorgánico en la producción de carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos, los componentes básicos necesarios para la acumulación de biomasa (Nunes-Nesi *et al.*, 2010). La cantidad y la fuente de nitrógeno afecta a la absorción, asimilación y distribución del N entre los diferentes órganos (Campbell, 1999) y a la regulación de muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, tales como la arquitectura de la raíz, la razón tallo/raíz, la senescencia foliar, la floración etc. (Scheible *et al.*, 2004; Vidal and Gutiérrez, 2008). Por ello, el nitrógeno es un factor determinante de la capacidad fotosintética y la productividad de los cultivos (Nunes-Nesi *et al.*, 2010).

En plantas, el nitrato y el amonio son absorbidos por las raíces y su asimilación puede tener lugar en las raíces o en la parte aérea de la planta dependiendo de la especie vegetal, de la concentración exógena de nitrógeno y de la temperatura e intensidad luminosa (Smirnov and Stewart, 1985). La asimilación del nitrógeno inorgánico en compuestos orgánicos nitrogenados es energéticamente costosa, ya que requiere equivalentes de reducción, ATP y esqueletos carbonados, especialmente cuando el nitrato es la principal fuente de N. Cuando el N inorgánico es asimilado en las raíces, la energía y los esqueletos carbonados provienen de la respiración de la sacarosa, la cual es importada desde las hojas. Alternativamente, el nitrato y el amonio pueden ser asimilados en las hojas después de ser transportados desde las raíces a través del xilema. La velocidad de asimilación de N en hojas es mucho mayor en la luz que en la oscuridad (Scheible *et al.*, 1997a; Matt *et al.*, 2001), resaltando la importancia del metabolismo fotosintético en la provisión de poder reductor, ATP y carbohidratos en este proceso biológico vital. Ello muestra la estrecha coordinación existente entre la asimilación de nitrógeno y la fotosíntesis, y su integración con la respiración y la fotorrespiración. Y evidencia que las plantas poseen mecanismos de regulación complejos, que coordinan la asimilación de nitrógeno con el metabolismo del carbono, la disponibilidad de nutrientes y otros factores ambientales, y la demanda para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Nunes-Nesi *et al.*, 2010). La partición del carbono asimilado entre la síntesis de ácidos orgánicos, almidón y sacarosa es notablemente modificada por la disponibilidad de N, lo que sugiere que tienen lugar mecanismos de regulación en respuesta al nitrógeno tanto a nivel transcripcional como post-traducciona (Scheible *et al.*, 1997c; Stitt *et al.*, 2002; Foyer *et al.*, 2007). La interacción del metabolismo del C y del N involucra cambios en la expresión génica y en la actividad de enzimas claves del complejo entramado metabólico mediada por señales derivadas del nitrato, el amonio y metabolitos que contienen nitrógeno, como la glutamina, el glutamato y el aspartato, además de señales del metabolismo del carbono (Coruzzi and Zhou, 2001; Scheible *et al.*, 2004; Osuna *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2008). Estas señales metabólicas interactúan con hormonas, como las citoquininas, que responden a la disponibilidad de nitrógeno y regulan el metabolismo y el desarrollo (Coruzzi and Zhou, 2001; Argueso *et al.*, 2009).

Los niveles de NADH desempeñan también un papel crucial en la asimilación de amonio y nitrato (Dutilleul *et al.*, 2005).

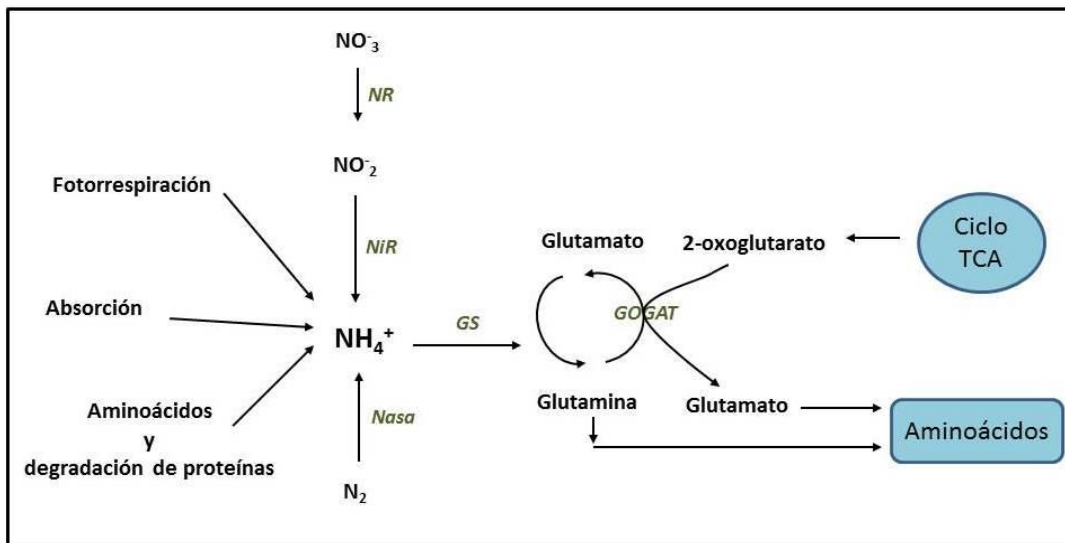


Figura 1.4. Esquema de la asimilación del nitrógeno inorgánico (N) en compuestos orgánicos nitrogenados en plantas superiores. Se resaltan en color verde las principales enzimas implicadas: **NR**: nitrato reductasa, **NiR**: nitrito reductasa, **Nasa**: nitrógenasa, **GS**: glutamina sintetasa, **GOGAT**: glutamato sintasa. La asimilación final del amonio a través de la ruta GS/GOGAT facilita la formación de glutamina y glutamato, los precursores de todos los compuestos nitrogenados en plantas. (Adaptado de Andrews *et al.*, 2013).

La principal fuente de nitrógeno en plantas superiores es el nitrato, que actúa no sólo como nutriente sino como molécula señal (Stitt *et al.*, 2002; Vidal and Gutiérrez, 2008). En hojas, la nitrato reductasa (NR) cataliza el primer paso del metabolismo primario del nitrógeno, la reducción del nitrato a nitrito en el citosol usando equivalentes de reducción proporcionados por el NADH. El producto de la reacción, el nitrito es transportado y reducido a amonio en los plastidios por la nitrito reductasa, el cual es posteriormente incorporado en aminoácidos (Campbell, 1999). La asimilación del amonio a través de la ruta GS/GOGAT catalizada por la acción combinada de la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT) facilita la formación de glutamina y glutamato (Forde and Lea, 2007; Andrews *et al.*, 2013) (Fig. 1.4). Dichos aminoácidos sirven como compuestos transportadores y donadores de nitrógeno en la biosíntesis de la mayoría de los aminoácidos (Lam *et al.*, 1995; Stitt *et al.*, 2002) y de otros compuestos nitrogenados como los ácidos nucleicos y las clorofilas (Von Wettstein *et al.*, 1995; Bieker and Zentgraf, 2013).

La reacción catalizada por la nitrato reductasa se considera el paso limitante en la asimilación del nitrato (Campbell, 1999; Stitt *et al.*, 2002). La NR es una proteína homodimérica que alberga tres cofactores, cada uno de los cuales se unen a dominios separados y generan una cadena de transferencia de electrones (Lambeck *et al.*, 2010). La estructura compleja de la NR consta de un dominio que contiene molibdeno en el N-terminal, un dominio del citocromo tipo *b* de unión del Fe-hemo y un dominio con el flavin adenin dinucleótido (FAD) en el C-terminal, conectados entre sí por regiones de anclaje o bisagras (Campbell, 1999; Fischer *et al.*, 2005) (Fig. 1.5). La NR es un enzima altamente regulado tanto a nivel transcripcional como post-traduccionally por señales ambientales y endógenas (Vidal and Gutiérrez, 2008). El nitrato induce la expresión de los genes *NIA* que codifican la NR (Cheng *et al.*, 1992; Scheible *et al.*, 1997c) y aumenta la actividad del enzima (Campbell, 1999). Estudios de expresión génica global con microarrays han mostrado que la inducción de la expresión génica de la NR por nitrato es muy rápida (Wang *et al.*, 2003; Scheible *et al.*, 2004). La luz aumenta la

velocidad de asimilación de nitrato y la oscuridad la disminuye (Kaiser and Huber, 2001). La regulación diurna de la NR es el resultado de cambios en la transcripción y el nivel de proteína, y del estado de fosforilación del enzima (Scheible *et al.*, 1997a; Kaiser and Huber, 2001). La NR está sujeta a una fuerte regulación post-traduccional que involucra la fosforilación/desfosforilación del enzima (Kaiser *et al.*, 2002), aunque también la oxidación/reducción y la histeresis están involucradas (Kaiser and Huber, 1997; Reda and Kłobus, 2008). La oscuridad induce la fosforilación de la proteína y la unión posterior de una proteína inhibidora del tipo 14-3-3 en presencia de Mg^{+2} , formando un complejo inactivo que resulta en un descenso de actividad. La luz, por su parte, facilita la activación del enzima por desfosforilación y liberación de la proteína 14-3-3 (Kaiser and Huber, 2001; Lillo *et al.*, 2004). El suministro de azúcares, como la glucosa y la sacarosa, en la oscuridad puede reemplazar a la luz en la inducción de la expresión génica de la NR (Cheng *et al.*, 1992; Vincentz *et al.*, 1993), promueve la desfosforilación de la proteína y facilita el mantenimiento de la actividad del enzima (Kaiser *et al.*, 2002). Además, la expresión de la NR puede ser totalmente inhibida cuando los carbohidratos disminuyen por debajo de un nivel umbral crítico (Klein *et al.*, 2000). La asimilación de nitrógeno interacciona también con el metabolismo de los ácidos orgánicos, ya que el 2-oxoglutarato (2-OG) se requiere como precursor y aceptor primario de amonio para la síntesis de aminoácidos en la ruta de la glutamato sintasa (Hodges, 2002). Y se han mostrado evidencias de que el suministro de 2-OG a discos foliares de hojas de tabaco aumenta los niveles de transcritos y la actividad de la NR (Ferrario-Méry *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2001). Lo que sugiere que el 2-OG puede actuar como una molécula señal, regulando la asimilación del nitrógeno, en consonancia con la estrecha interrelación existente entre el metabolismo del C y N en plantas (Stitt *et al.*, 2002).

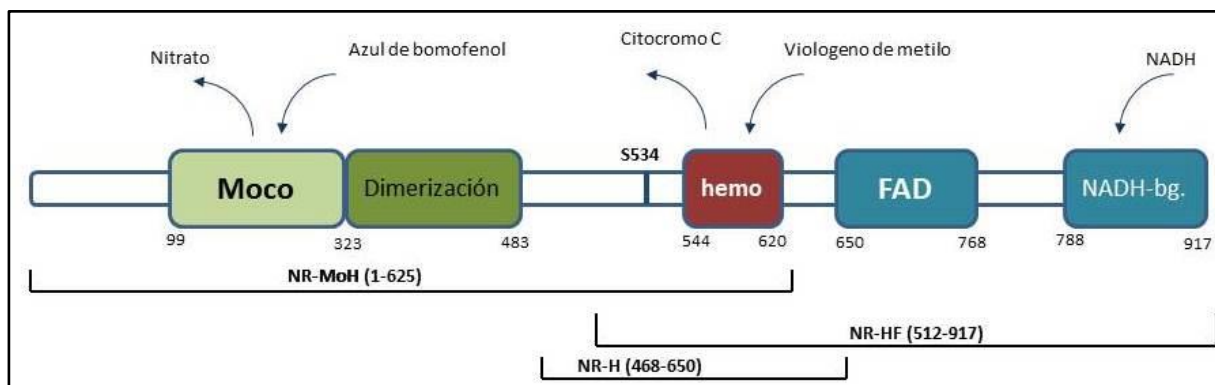


Figura 1.5. Dominios de la estructura de la NR y fragmentos de la NR. En la parte central, se muestran los dominios y cofactores de la NR, los números indican el primer y el último residuo de un dominio. La dimerización de los dominios y la unión del NADH (NADH-bg.). El residuo serina regulador aparece como (S534). En la parte superior, se muestran los donadores electrónicos y aceptores en color gris. En la parte inferior, se representan los fragmentos de la NR y sus respectivas longitudes (NR-MoH, fragmento Mo-hemo; NR-HF, fragmento hemo-FAD; NR-H, fragmento hemo). (Adaptado de Lambeck *et al.*, 2012).

El metabolismo del nitrógeno puede ser regulado negativamente por compuestos nitrogenados que son generados en la asimilación posterior del nitrógeno (Gutiérrez *et al.*, 2008). La glutamina y el glutamato regulan la expresión génica de las plantas (Vidal and Gutiérrez, 2008). La glutamina ejerce un control negativo en la absorción de nitrato y en la expresión de genes que codifican proteínas transportadoras de nitrato (Vidmar *et al.*, 2000), disminuye la expresión de la NR (Vincentz *et al.*, 1993) y facilita la fosforilación y el descenso de actividad del enzima (Morcuende *et al.*, 1998). El estado de activación de la NR describe los efectos post-traducción y refleja la cantidad de enzima que se encuentra en forma activa no fosforilada (Huber *et al.*, 1992). Morcuende *et al.* (1998) mostraron que los carbohidratos modulan la regulación post-traduccional de la NR, actúan sinérgicamente junto

con nitrato y antagonizan el efecto de la glutamina, y aumentan la actividad y el estado de activación de la nitrato reductasa.

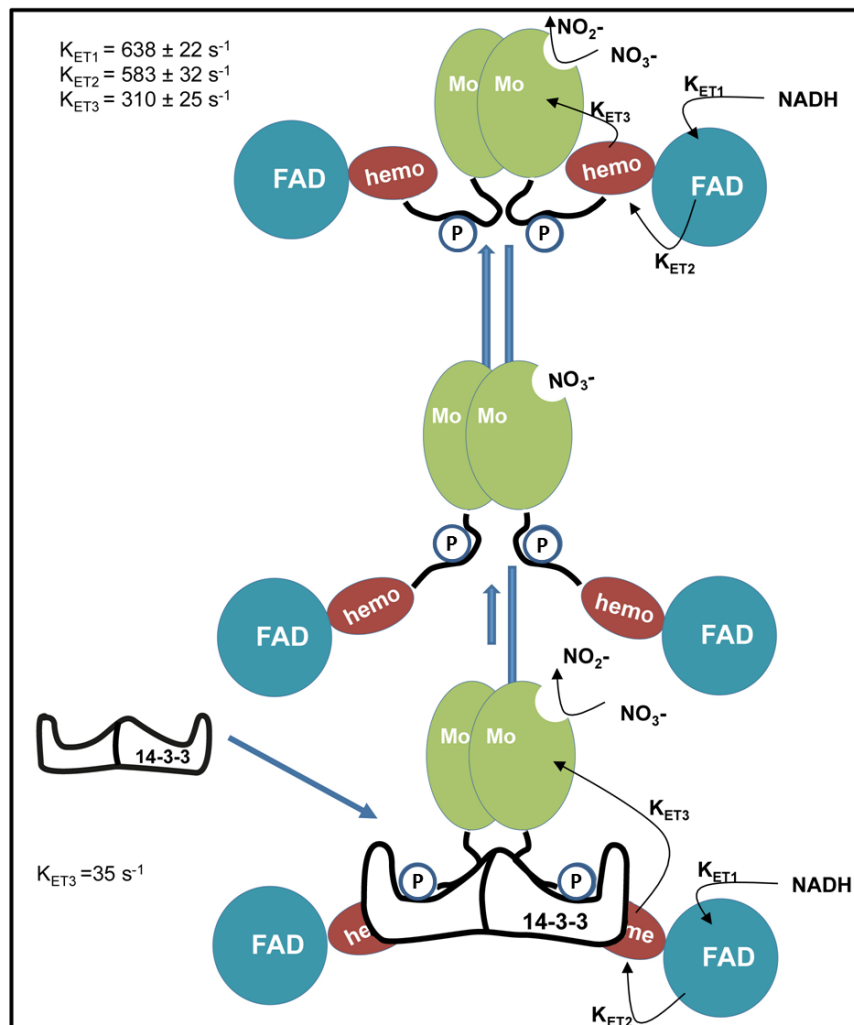


Figura 1.6. Modelo de inhibición de la NR por proteínas 14-3-3. Los dominios de la NR se representan según su tamaño y la Ser-534 fosforilada (P). El mecanismo propuesto para la inhibición de la NR involucra un cambio conformacional en la estructura de la proteína. En la parte superior, la NR presenta una conformación cerrada con poca distancia entre el hemo y el molibdeno que favorece la transferencia electrónica efectiva y la reducción del NO_3^- . En la parte intermedia, la NR presenta una conformación abierta con mayor separación entre el hemo y el molibdeno que permite la unión de la proteína 14-3-3. En la parte inferior, la proteína 14-3-3 se une a la NR fosforilada y la conformación abierta se estabiliza, lo que dificulta la transferencia electrónica desde el hemo al molibdeno y disminuye la actividad de la NR. (Adaptado de Lambeck *et al.*, 2012).

La regulación post-traducciona de la nitrato reductasa involucra la fosforilación de un sitio de fosforilación conservado, la serina 534 en Arabidopsis, localizado en la región de anclaje entre los dominios que contienen el cofactor de molibdeno y hemo, junto a la unión posterior de una proteína inhibidora 14-3-3, que inactiva el enzima. El mecanismo molecular implicado en la inactivación de la NR en plantas ha sido objeto de intensa investigación en los últimos años. Lambeck *et al.* (2010) han mostrado que el ciclo catalítico completo de la NR involucra cuatro etapas: 1) la reducción inicial de 2 electrones del cofactor FAD por el NADH, 2) la transferencia secuencial de un único electrón desde el FAD al grupo hemo, 3) dos transferencias de un único electrón desde el hemo al cofactor de molibdeno, lo que permite la reducción del molibdeno desde el estado Mo^{VI} a Mo^{IV} , y finalmente, 4) la reducción de nitrato a nitrito. El mecanismo propuesto para la inhibición de la NR sugiere que la unión de la proteína 14-3-3 induce un cambio conformacional en la estructura de la proteína que

incrementa la distancia entre los dos sitios activos redox y limita la transferencia electrónica desde el hemo al cofactor de molibdeno (Lambeck *et al.*, 2012) (Fig. 1.6). La fosforilación parece ser mediada por proteínas quinasas, de las que se han descrito dos que pertenecen a las quinasas dependientes de calcio (CDPK), y una quinasa relacionada con la sacarosa no fermentante (SNF1). Mientras que la activación del enzima tiene lugar por desfosforilación mediada por proteínas fosfatasas del tipo 2A (Kaiser *et al.*, 2002).

1.2.- Respuestas de la planta al ambiente: sequía.

El déficit hídrico afecta a la mayoría de los procesos fisiológicos vitales de la planta, como la fotosíntesis, la respiración, las relaciones hídricas y el metabolismo antioxidante y hormonal (Bhargava and Sawant, 2013). Dependiendo de la intensidad y duración del déficit hídrico (Araus *et al.*, 2002), de la especie vegetal y el genotipo (Rampino *et al.*, 2006), del estadio de desarrollo de la planta (Zhu *et al.*, 2005) y del modo de imposición de la limitación en la disponibilidad hídrica, las plantas perciben y responden a alteraciones en el estado hídrico induciendo una serie de cambios fisiológicos, morfológicos, celulares (Chaves *et al.*, 2009; Livingston *et al.*, 2009) y moleculares, que incluyen la regulación transcripcional de un gran número de genes (Bray, 2004; Xue *et al.*, 2008a). Respuestas que permiten el mantenimiento de la integridad funcional de las células y de la planta entera y facilitan la adaptación a la sequía (Sečenji *et al.*, 2010).

1.2.1.- Fotosíntesis y déficit hídrico.

Como proceso clave del metabolismo primario, la fijación fotosintética del CO₂ desempeña un papel importante en la respuesta de las plantas a una reducción en la disponibilidad hídrica del suelo (Flexas *et al.*, 2004; Lawlor and Tezara, 2009). El déficit hídrico limita la fotosíntesis como consecuencia de un cierre de los estomas y/o alteraciones metabólicas, cuyo impacto relativo parece depender de la intensidad y duración del estrés y de la especie vegetal (Bhargava and Sawant, 2013).

En plantas superiores se ha observado un descenso de fotosíntesis cuando el contenido hídrico relativo (RWC) y el potencial hídrico foliar (ψ) disminuyen (Lawlor and Cornic, 2002). La limitación de la fotosíntesis inducida por el déficit hídrico normalmente no se atribuye a una restricción de las reacciones fotoquímicas, pues el aparato fotosintético es bastante resistente a la desecación (Cornic, 1994). Más bien se relaciona con una escasa disponibilidad del CO₂ en el cloroplasto como consecuencia de un descenso progresivo de la conductancia de los estomas (g_s) al disminuir el contenido hídrico de las hojas y el cierre consiguiente de los estomas (Chaves, 1991; Cornic, 2000). Sin embargo, la importancia relativa de la conductancia de los estomas en la restricción del suministro de CO₂ para el metabolismo (limitación estomática), y de la alteración metabólica que disminuye la fotosíntesis potencial (limitación-no estomática), es incierta y objeto de controversia (Lawlor, 2002). La respuesta de la conductancia de los estomas y de la fotosíntesis al ψ y/o RWC, los parámetros más comúnmente usados para analizar el estado hídrico de la planta y la intensidad de la sequía, parece depender del genotipo (Tardieu and Simonneau, 1998) y de la velocidad de imposición de la sequía (Flexas *et al.*, 1999), entre otros factores. Por lo que para discernir la severidad del déficit hídrico, que conduce a limitaciones metabólicas de la fotosíntesis, se ha

propuesto como parámetro de referencia la estimación de la concentración intercelular de CO_2 (C_i). El cálculo de la C_i por medidas de intercambio gaseoso puede conducir a una sobreestimación de dicho parámetro por el cierre irregular de los estomas en hojas deshidratadas (Terashima, 1992) o por cambios en la conductancia de la cutícula al vapor de agua (Boyer *et al.*, 1997). Cuando dichas limitaciones se superan por concentraciones altas de CO_2 (Quick *et al.*, 1992), una característica de la limitación estomática es que el incremento de la concentración de CO_2 en la atmósfera aumenta la concentración de CO_2 en los espacios intercelulares y en el estroma del cloroplasto, y recupera la fotosíntesis a la fotosíntesis potencial (Lawlor, 1995). Mientras que en el caso de la limitación no estomática, el CO_2 elevado no permite la recuperación de la fotosíntesis máxima. Ello se ha atribuido a la inhibición de procesos metabólicos claves como la fotofosforilación, que comienza a disminuir con estrés hídrico moderado (Tezara *et al.*, 1999). Cuando la C_i fue estimada por el método de la fluorescencia de la clorofila (Dai *et al.*, 1992), para distinguir entre limitaciones estomáticas y no estomáticas de la fotosíntesis cuando puede haber cierre irregular de los estomas, se ha encontrado que el déficit hídrico moderado inhibe la fotosíntesis como consecuencia del cierre de estomas (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 1999; Cornic, 2000).

Las plantas pierden agua fundamentalmente a través de los estomas de las hojas (Lee and Luan, 2012). La apertura y cierre de los estomas facilita la entrada de CO_2 para la fotosíntesis y la pérdida de H_2O por transpiración (Farooq *et al.*, 2009). Una de las respuestas de la planta al déficit hídrico es el cierre progresivo de los estomas, lo que limita la transpiración, disminuye la pérdida de vapor de agua y permite el mantenimiento de la turgencia celular (Chaves, 1991; Chaves and Oliveira, 2004; Farooq *et al.*, 2009). Varios estudios han mostrado que la regulación del grado de apertura de los estomas parece estar más estrechamente relacionada con el contenido de humedad del suelo que con el estado hídrico foliar, lo que sugiere un mecanismo de control vía señalización química, el cual involucra la transferencia de información química desde las raíces a la parte aérea de la planta vía xilema (Dodd *et al.*, 1996; Wilkinson and Davies, 2010). Control que difiere de la señalización hidráulica, en la que la transmisión de la reducción de la disponibilidad hídrica del suelo tiene lugar vía cambios en la presión del xilema (Dodd *et al.*, 1996). El ácido abscísico (ABA) es la señal química (Dodd *et al.*, 1996) que controla el estado hídrico y la función de los estomas (Lee and Luan, 2012). El ácido abscísico se sintetiza tanto en las hojas como en las raíces de la planta y puede moverse rápidamente a través de la planta por el xilema y el floema y distribuirse entre los diferentes compartimentos de los distintos tejidos en función del pH (Sauter *et al.*, 2001). Se ha mostrado una correlación entre el contenido de ABA en el xilema y la conductancia de los estomas (Socias *et al.*, 1997). El ABA tiene también un efecto inhibitorio del desarrollo foliar (Van Volkenburgh and Davies, 1983) y desempeña un papel regulador en el mantenimiento del crecimiento de la raíz en suelos deshidratados (Sharp *et al.*, 1994). En condiciones de sequía, parece ser que el ABA es transportado desde las raíces deshidratadas a las hojas a través del xilema y al alcanzar las células oclusivas de los estomas modifica su apertura (Sauter *et al.*, 2001). Este cierre de los estomas disminuye la pérdida de agua y ralentiza la deshidratación (Chaves and Oliveira, 2004; Wilkinson and Davies, 2010), y ejerce también un efecto similar, limitando el desarrollo foliar (Van Volkenburgh and Davies, 1983) y manteniendo el desarrollo radicular (Sharp *et al.*, 1994). Otras hormonas, tales como el etileno, las auxinas y/o citoquininas tienden a inhibir el cierre de estomas mediado por ABA, mientras que los brasinoesteroides, los jasmonatos y el ácido salicílico muestran una acción sinérgica con ABA (Wilkinson and Davies, 2010). El ácido abscísico también se ha relacionado con la regulación a nivel transcripcional de un importante grupo de genes relacionados con la respuesta de las plantas al estrés (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Y estudios del control transcripcional de genes fotosintéticos por factores de transcripción (TFs) han mostrado que varios TFs pertenecientes a la

familia MYB están involucrados en la regulación del número y tamaño de los estomas, y de los componentes metabólicos del sistema fotosintético (Saibo *et al.*, 2009), y podrían desempeñar un papel importante en las limitaciones estomáticas y no estomáticas de la fotosíntesis.

La limitación de la difusión del CO₂ desde la atmósfera a los lugares de la carboxilación se considera la principal causa por la que disminuye la fotosíntesis con el estrés hídrico suave o moderado (Cornic, 2000; Chaves and Oliveira, 2004; Flexas *et al.*, 2004; Grassi and Magnani, 2005). Esta limitación incluye dos componentes, uno estomático y otro del mesófilo (Flexas *et al.*, 2004). Y la magnitud de este último componente no está exenta de cierta controversia, en la que la mayor crítica deriva de la metodología empleada para la estimación de la concentración de CO₂ intercelular o cloroplástica, antes mencionada (Bunce, 2009; Lawlor and Tezara, 2009). La conductancia del mesófilo (g_m) comprende componentes físicos (solubilidad del CO₂, área superficial de las rutas apoplásticas y simplásticas del CO₂) y metabólicos (acuaporinas y anhidrasa carbónica). Ambos son dependientes de las especies vegetales, y presumiblemente son el resultado de las diferencias en la contribución relativa de los componentes bioquímicos y anatómicos y de las condiciones experimentales. Se ha mostrado que el déficit hídrico del suelo puede reducir la g_m (Flexas *et al.*, 2008), aunque generalmente la g_m es menos sensible a la limitación hídrica que la g_s (Bunce, 2009). Con una mayor reducción de la g_s , cuando la sequía aumenta, puede tener lugar una limitación de la actividad fotoquímica. Y se han encontrado descensos de la actividad Rubisco (Flexas and Medrano, 2002; Lawlor and Cornic, 2002); sin embargo, los efectos difieren entre estudios, desde fuertes reducciones de la actividad por unidad de área foliar (Maroco *et al.*, 2002) o por mg de proteína (Parry *et al.*, 2002), a la ausencia de efectos (Panković *et al.*, 1999; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 1999; Pelloux *et al.*, 2001), variabilidad que podría relacionarse con el grado de intensidad de la sequía. Con un estrés hídrico severo, se han observado descensos de la actividad (Tezara *et al.*, 2002) y la cantidad de proteína Rubisco (Parry *et al.*, 2002; Flexas *et al.*, 2006). Y se ha sugerido que el factor clave en la disminución de dicha actividad enzimática podría ser el descenso de Rubisco activasa (Lawlor and Tezara, 2009). En un estudio con 11 especies vegetales Mediterráneas, se ha mostrado que la baja concentración de CO₂ cloroplástica en déficit hídrico podría inducir la desactivación de la Rubisco, y el umbral para desencadenar dicho efecto parece depender de las características foliares (Galmés *et al.*, 2011).

La fotoinhibición puede ocurrir eventualmente en condiciones muy severas de sequía y un cierre de los estomas casi completo (Flexas and Medrano, 2002). En plantas sujetas a déficit hídrico, al disminuir la concentración de CO₂ en los cloroplastos, la energía luminosa que no es utilizada en la reducción fotosintética del CO₂ deberá de ser disipada. La elevada energía de excitación puede ser disipada por extinción no fotoquímica (ciclo de las xantofilas) o procesos alternativos, como el metabolismo fotorrespiratorio (Niyogi, 2000). Katona *et al.* (1992) han sugerido que la fotorrespiración protege a las hojas deshidratadas frente a la fotoinhibición, no sólo aliviando la reducción excesiva de la cadena de transporte de electrones, sino también evitando el exceso de energía de excitación entre los dos fotosistemas. En ausencia de disipación, los electrones acumulados en la cadena de transporte de electrones pueden transferirse al oxígeno (reacción de Mehler) y generar especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS pueden inactivar el centro de reacción del fotosistema II y causar fotoinhibición, y por su elevado potencial reactivo, pueden también reaccionar y dañar componentes celulares (proteínas, ADN y lípidos), y generar estrés oxidativo. La detoxificación de especies reactivas requiere enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa (Bhargava and Sawant,

2013), y antioxidantes no enzimáticos como el ascorbato, α -tocoferol y carotenoides (Larson, 1988), para mitigar el daño celular.

1.2.2.- Efectos del déficit hídrico en las plantas.

Entre las respuestas más inmediatas de las plantas a una limitación en la disponibilidad hídrica del suelo se encuentran el cierre de los estomas, la inhibición del desarrollo de la parte aérea de la planta y la reducción de la expansión foliar (Tardieu *et al.*, 2000). Mientras que se mantiene el crecimiento de la raíz primaria y se inhibe el desarrollo de las raíces laterales, lo que facilita la absorción de agua desde las capas más profundas del suelo (Xiong *et al.*, 2006). La inhibición del crecimiento al disminuir el estado hídrico de la planta se debe a la pérdida de turgencia celular por falta de agua para el crecimiento de las células (Taiz and Zeiger, 2006b). El descenso de la apertura estomática se acompaña de un ajuste en el área foliar a nivel de planta entera, que tiene lugar bien por inhibición del desarrollo de nuevas hojas o por senescencia más temprana de las hojas más viejas. El ajuste del área foliar a nivel de planta entera reduce las dimensiones del follaje y, junto al cierre de los estomas, disminuye el área de transpiración, preservando a la planta de la pérdida de agua. La limitación del desarrollo foliar reduce también la interceptación de la radiación solar a lo largo del periodo de crecimiento, lo que disminuye la producción de biomasa (Pereira and Chaves, 1993). El déficit hídrico puede también afectar a la disponibilidad y absorción de nutrientes en la raíz y al transporte a la parte aérea de la planta por reducción del flujo de transpiración (McWilliams, 2003). Estos cambios fisiológicos que ocurren en respuesta al déficit hídrico tienen lugar en paralelo con un descenso de fotosíntesis y se han correlacionado con la translocación rápida del ácido abscísico en la corriente de transpiración y la acumulación de dicha hormona en los tejidos de la planta (Barnabás *et al.*, 2008). Además, la limitación del crecimiento y la expansión foliar alteran la partición del carbono dentro de la planta y facilitan el uso de los metabolitos en el crecimiento selectivo de la raíz y en la síntesis de compuestos necesarios para el ajuste osmótico (Lei *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2008b; Bhargava and Sawant, 2013).

Aún a pesar del descenso de fotosíntesis que generalmente tiene lugar en condiciones de estrés hídrico, la concentración de carbohidratos en los diferentes órganos de la planta aumenta, lo que sugiere un desacoplamiento entre el suministro (fotosíntesis) y la demanda de carbono (crecimiento) que conduce a una mejora del estado de carbono de la planta (Chaves *et al.*, 2009; Hummel *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2011). Un aumento del contenido de carbohidratos en plantas sometidas a sequía se ha mostrado en varias especies vegetales, en distintas partes de la planta y para diferentes formas de carbono (solubles y estructurales) (Müller *et al.*, 2011). Las plantas acumulan carbohidratos solubles en las hojas (Kim *et al.*, 2000; Teulat *et al.*, 2001; Cramer *et al.*, 2007), en el tallo (Bogeat-Triboulot *et al.*, 2007; Méndez *et al.*, 2011; Del Pozo *et al.*, 2012), en flores y frutos (Liu *et al.*, 2004; Mercier *et al.*, 2009) y en las raíces (De Roover *et al.*, 2000; Jiang and Huang, 2001). Los carbohidratos a menudo se acumulan como hexosas (glucosa y fructosa) y sacarosa, y en cereales también como fructanos (Teulat *et al.*, 2001; Méndez *et al.*, 2011). Y se ha encontrado un aumento del contenido de otros carbohidratos en respuesta al déficit hídrico, entre los que se incluyen la trehalosa (Farías-Rodríguez *et al.*, 1998) y el manitol (Guicherd *et al.*, 1997), junto a otros solutos compatibles como los aminoácidos (Morgan, 1992), en particular prolina (Hare and Cress, 1997), los ácidos orgánicos como el malato y el fumarato (Hummel *et al.*, 2010), y los compuestos de amonio cuaternario como la glicina betaína (Ashraf and Foolad, 2007). La síntesis de solutos compatibles en respuesta al déficit hídrico evita la pérdida de agua celular y desempeña un papel importante en el mantenimiento de la turgencia celular (Blum, 2005), en el sostenimiento de la fotosíntesis y el

crecimiento (Cattivelli *et al.*, 2008), en la protección de la integridad de las membranas (Hincha, 2002) y en la prevención de la desnaturalización de las proteínas (Xue *et al.*, 2008b). En un estudio realizado con plantas de *Arabidopsis*, en el que el déficit hídrico se impuso progresivamente, se ha mostrado que el crecimiento disminuyó más que la fotosíntesis y condujo a una mejora del estado de carbono de la planta, que facilitó el ajuste osmótico, y no tuvo lugar una reprogramación del metabolismo central (Hummel *et al.*, 2010). Resultados que contrastan con otros estudios previos en los que se han mostrado evidencias de que el déficit hídrico indujo una importante reprogramación del metabolismo del carbono (Ozturk *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2009). Dichas diferencias podrían relacionarse con la severidad y velocidad de imposición de la sequía, puesto que en estos últimos estudios posiblemente se impuso un choque osmótico o una rápida desecación. Se ha encontrado también una acumulación de otros compuestos ricos en carbono como la lignina y la celulosa en condiciones de escasa disponibilidad hídrica. De hecho, el déficit hídrico acelera la lignificación (Vincent *et al.*, 2005), disminuye los espacios de aire entre las células y aumenta el grosor de las hojas (Hummel *et al.*, 2010), lo que contribuye a aumentar el área foliar específica (SLA) (Tardieu *et al.*, 1999).

En los últimos años son muchos los estudios de expresión génica global que han evaluado la respuesta de las plantas a la sequía tanto en plantas modelo como en cultivos agrícolas importantes (Gong *et al.*, 2010). Y se han identificado un amplio grupo de genes cuya expresión es alterada en respuesta al estrés hídrico, los cuales se han clasificado en dos grupos según su función. Un primer grupo que comprende aquellos genes que participan en la regulación de la transducción de la señal o genes que responden al estrés, e incluye proteínas señalizadoras como las calmodulinas, fitohormonas, proteínas quinasas, fosfatasa y factores de transcripción. Y un segundo grupo que engloba aquellos genes que codifican proteínas que muy posiblemente funcionan en la tolerancia a estreses abióticos. Estas proteínas incluyen a las chaperonas, proteínas de embriogénesis tardía (LEA), deshidratinas, enzimas claves para la biosíntesis de osmolitos, proteínas de canales de agua, proteínas por choque térmico, genes relacionados con la senescencia, osmoprotectores, protectores de membrana, transportadores de azúcares y prolina, antioxidantes y proteasas (Bray, 2002; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Saibo *et al.*, 2009). Para más detalles se aconseja la revisión de los siguientes trabajos (Bray, 2004; Rampino *et al.*, 2006; Hadiarto and Tran, 2011; Wang *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2013).

1.2.3.- Producción de grano y déficit hídrico.

En cereales de grano pequeño, como el trigo y la cebada, el rendimiento final de grano es determinado por la producción de biomasa total y la proporción de biomasa asignada al grano (Van den Boogaard *et al.*, 1996).

El llenado del grano y, por extensión, la producción de grano depende de la asimilación y distribución del carbono y nitrógeno. Los asimilados necesarios para el llenado del grano son proporcionados por la fotosíntesis de la hoja (Evans *et al.*, 1975) y de la espiga (Tambussi *et al.*, 2007; Maydup *et al.*, 2012), y la redistribución de reservas almacenadas en tejidos vegetativos durante la pre- y/o post-antesis que son translocadas a la espiga o a los granos en crecimiento (Schnyder, 1993; Yang and Zhang, 2006). Las reservas incluyen principalmente proteínas y carbohidratos solubles en agua (WSC) (Gebbing *et al.*, 1999) y proporcionan el sustrato necesario para mantener el transporte y

el suministro de asimilados al grano durante el periodo oscuro del ciclo diurno, y en las etapas tardías del llenado del grano cuando el aparato fotosintético comienza la senescencia y la velocidad de producción de fotoasimilados es inferior a las necesidades del grano (Schnyder, 1993). En cereales, como el trigo y la cebada, las reservas de carbohidratos se almacenan principalmente en el tallo como carbohidratos solubles en agua y están compuestos predominantemente de fructanos del tipo gramíneas (Chalmers *et al.*, 2005), que pueden llegar a representar más de un 80% de los WSC (Wardlaw and Willenbrink, 1994), seguidos de sacarosa y, en menor cantidad, de glucosa y fructosa (Virgona and Barlow, 1991). El trigo y la cebada, en contraste con otros cereales, acumulan muy poco almidón en los tallos. Los fructanos se almacenan en el tallo y su síntesis, a partir de sacarosa, se inicia cuando la provisión de carbohidratos excede a la demanda de la planta, y los entrenudos inferiores del tallo suelen contener mayores cantidades de fructanos (Pollock and Cairns, 1991). La acumulación de carbohidratos solubles en el tallo está influenciada por factores ambientales (Blum, 1998; Ehdai *et al.*, 2006b; Ruuska *et al.*, 2006). En ausencia de estrés, los fructanos se acumulan en el tallo hasta que alcanzan un contenido máximo a la mitad del llenado del grano, posteriormente son degradados y parcialmente removilizados al grano para la síntesis de almidón en etapas tardías del llenado del grano (Wardlaw and Willenbrink, 1994). Sin embargo, en condiciones ambientales desfavorables, los fructanos pueden ser degradados en estadios tempranos del llenado del grano para poder compensar eficazmente el descenso de fotosintatos y lograr mantener la velocidad de llenado del grano (Li *et al.*, 2013). Por consiguiente, los WSC del tallo pueden desempeñar un papel importante en el rendimiento de grano en condiciones de estrés (Schnyder, 1993) y contribuyen significativamente al peso final del grano (Gebbing *et al.*, 1999). La correlación positiva encontrada entre un elevado contenido de WSC alrededor de la anthesis y un mayor tamaño del grano en la madurez entre genotipos soporta esta visión (Foulkes *et al.*, 2002; Ruuska *et al.*, 2006). Por ello, las concentraciones elevadas de WSC se consideran una característica potencialmente útil para la mejora del peso del grano y la productividad en ambientes en los que la producción pueda estar limitada por la disponibilidad hídrica (Blum, 1998; Ruuska *et al.*, 2006; Foulkes *et al.*, 2007).

En ambientes naturales, la escasez de lluvias y el descenso en la disponibilidad hídrica tienen lugar frecuentemente durante la etapa de llenado del grano de los cereales. Y una limitación en la disponibilidad hídrica del suelo en las etapas tempranas del desarrollo del grano reduce el potencial colector del grano y disminuye el número de células del endospermo y la formación de amiloplastos, lo que se traduce en una reducción del peso del grano como consecuencia de la pérdida de capacidad del endospermo para acumular almidón (Saini and Westgate, 1999). El llenado del grano parece estar estrechamente unido al proceso de senescencia a nivel de planta entera (Yang and Zhang, 2006). Y se ha propuesto que el déficit hídrico durante el llenado del grano induce la senescencia temprana y acorta el periodo de llenado del grano, a la vez que aumenta la removilización de carbohidratos no estructurales desde los tejidos vegetativos al grano (Plaut *et al.*, 2004). Un lento llenado del grano se asocia frecuentemente con un retraso en la senescencia de las plantas a nivel de planta entera (Mi *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2005). El proceso de llenado del grano es regulado genéticamente (Saini and Westgate, 1999). En el arroz, el llenado del grano es generalmente más rápido en los cultivares indica que los japónica (Zhu *et al.*, 1997), mientras que los híbridos indica/japónica muestran una velocidad más lenta que las variedades híbridas indica/indica (Peng *et al.*, 2003).

La removilización de los WSC del tallo puede llegar a ser la fuente predominante de asimilados al grano en condiciones de estrés hídrico (Plaut *et al.*, 2004) y la contribución al rendimiento final de grano puede oscilar entre un 5-20% en ausencia de estrés hasta un 40-60% con déficit hídrico según

el genotipo (Blum, 1998). En cebada y trigo, se ha encontrado una considerable variabilidad genotípica en el contenido de carbohidratos solubles del tallo (Schnyder, 1993; Ehdaie *et al.*, 2006b; Ruuska *et al.*, 2006). Las diferencias en la acumulación de carbohidratos solubles en el tallo entre genotipos pueden derivar de factores como la capacidad fotosintética, la eficiencia en el uso del carbono y la partición del carbono entre la deposición de reservas en el tallo y otros procesos fisiológicos. Estos procesos incluyen genes del metabolismo del carbono involucrados en rutas metabólicas como el ciclo de Calvin, la gluconeogénesis, la glicólisis, la síntesis de sacarosa y fructanos. Los carbohidratos mayoritarios del tallo son los fructanos y la sacarosa (Ruuska *et al.*, 2006) y la velocidad de síntesis de fructanos depende de los niveles de sacarosa en los tejidos (Pollock and Cairns, 1991). Además, la acumulación y removilización de fructanos en plantas involucra la acción concertada de varias familias de enzimas, las fructosiltransferasas y las fructano exohidrolasas, que desempeñan un papel importante en la biosíntesis y degradación de fructanos, respectivamente. Y la sacarosa es no sólo el sustrato para la síntesis de fructanos sino que induce la expresión génica y la actividad de las fructosiltransferasas (Müller *et al.*, 2000; Ruuska *et al.*, 2008) (para más detalle, ver apartado síntesis de fructanos). En un estudio de análisis global de transcritos con diferentes líneas de trigo, se ha analizado la asociación entre la expresión génica y el contenido de WSC del tallo en la antesis. Y se ha encontrado una fuerte correlación positiva entre la concentración de WSC y de fructanos del tallo con los niveles de transcritos de los genes que codifican las fructosiltransferasas, 1-SST y 6-SFT, mientras que los niveles de transcritos de enzimas involucradas en la hidrólisis de sacarosa, la sacarosa sintasa y la invertasa ácida soluble, fueron inversamente correlacionados con las concentraciones de WSC del tallo (Xue *et al.*, 2008b). La represión génica de estas enzimas en líneas con un alto contenido de WSC se acompañó de un descenso en los niveles de transcritos de proteínas relacionadas con el catabolismo de los azúcares como la fructoquinasa y la piruvato deshidrogenasa, junto a aquellas involucradas en la desviación de la UDP-glucosa a la síntesis de carbohidratos de pared celular como la UDP-glucosa-6-deshidrogenasa, la UDP-glucuronato descarboxilasa y la celulosa sintasa. Estos resultados muestran que el elevado contenido de carbohidratos solubles del tallo se relacionó con la inducción de la síntesis de fructanos, la inhibición de la hidrólisis de sacarosa, una limitación de la síntesis de polisacáridos de pared celular y un descenso del flujo del carbono al ciclo de los ácidos tricarbónicos, lo que podría contribuir positivamente a la acumulación de WSC. En definitiva, la partición diferencial del carbono en el tallo es uno de los mecanismos que contribuye a la variabilidad genotípica en la acumulación de carbohidratos solubles (Xue *et al.*, 2008b). Se ha mostrado también que los niveles de expresión génica de las fructano exohidrolasas se corresponden con variaciones en el contenido de fructanos. Ya que la movilización de fructanos desde el tallo al grano se acompañó de un aumento de la actividad 1-FEH (Van den Ende *et al.*, 2003) y de los niveles de transcritos del enzima (Zhang *et al.*, 2009), con la consiguiente ganancia de peso del grano. Asimismo, dada la estrecha interrelación existente entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno en las plantas, McIntyre *et al.* (2011) investigaron los mecanismos moleculares que controlan los niveles de WSC y compuestos nitrogenados en el tallo. Y en líneas con un elevado contenido de carbohidratos solubles, se ha encontrado una disminución de la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la síntesis de algunos aminoácidos como la fenilalanina, metionina, serina y glicina, y la limitación de la síntesis de aminoácidos podría favorecer el almacenaje de más carbono en dichas líneas. Resultados que sugieren que la asimilación del nitrógeno hacia los aminoácidos es un factor importante que modula los niveles de WSC en los tallos (McIntyre *et al.*, 2011).

1.3.- Descripción de la especie de estudio: cebada.

La cebada es una monocotiledónea de carácter anual (Von Bothmer *et al.*, 2003b) que pertenece a la familia de las Poáceas (gramíneas). Se trata de una especie diploide con un genoma haploide de 5.1 Gb con siete cromosomas (Bengtsson, 1992; Von Bothmer and Komatsuda, 2010) y es considerada como modelo para la genética y la genómica en la tribu Triticeae (Klaus *et al.*, 2012). El consorcio internacional para la secuenciación de la cebada (*International Barley Sequencing Consortium*, IBSC, <http://barleygenome.org/>) ha permitido que su genoma haya sido completamente secuenciado (Schulte *et al.*, 2009), lo que facilita el uso de esta planta en estudios moleculares y genómicos.

La cebada se cultiva desde la antigüedad y fue uno de los primeros cultivos en ser domesticados en el Neolítico (Zohary *et al.*, 2012), aproximadamente 7000 años A de C (Harlan and Zohary, 1966), y ha formado parte del desarrollo económico y cultural del hombre (Von Bothmer *et al.*, 2003a; Ullrich, 2010). Durante siglos, la cebada fue considerada el alimento esencial de la población en muchos países del mundo hasta que el cambio en los hábitos alimenticios hizo que fuese gradualmente desplazada por el trigo. En la actualidad, la demanda de la cebada para alimentación humana ha disminuido, pero su uso a nivel industrial para la fabricación de cerveza y como forraje para alimentación animal está ampliamente extendido (Stanca *et al.*, 2003; Slewinski, 2012). Es uno de los cereales más ampliamente cultivados en todas las regiones templadas del mundo (Badr *et al.*, 2000).

1.3.1.- *Hordeum spontaneum*.

El ancestro de la cebada cultivada, *Hordeum spontaneum*, fue descubierto en Turquía por el botánico alemán Carl Koch, quien lo describió como una especie diferente a la cultivada (Von Bothmer *et al.*, 2003b), como un germoplasma exótico con limitado valor para los programas de mejora genética (Von Bothmer and Komatsuda, 2010). Sin embargo, estudios posteriores mostraron que la forma silvestre es una subespecie (subsp. *spontaneum* (C. Koch) Thell.) de la especie *Hordeum vulgare* L., al igual que la cebada cultivada (subsp. *vulgare*) (Von Bothmer *et al.*, 2003b). El origen se encuentra en Asia, en la región comprendida entre Israel y Jordania (Von Bothmer and Komatsuda, 2010) (Fig. 1.7), desde donde se distribuyó a áreas del mediterráneo oriental, al este de Grecia y Turquía, a la zona Cirenaica de Libia y Egipto, y se extendió también hacia el este de Afganistán, Turkmenistán y Pakistán occidental (Zohary and Hopf, 2000; Zohary *et al.*, 2012).

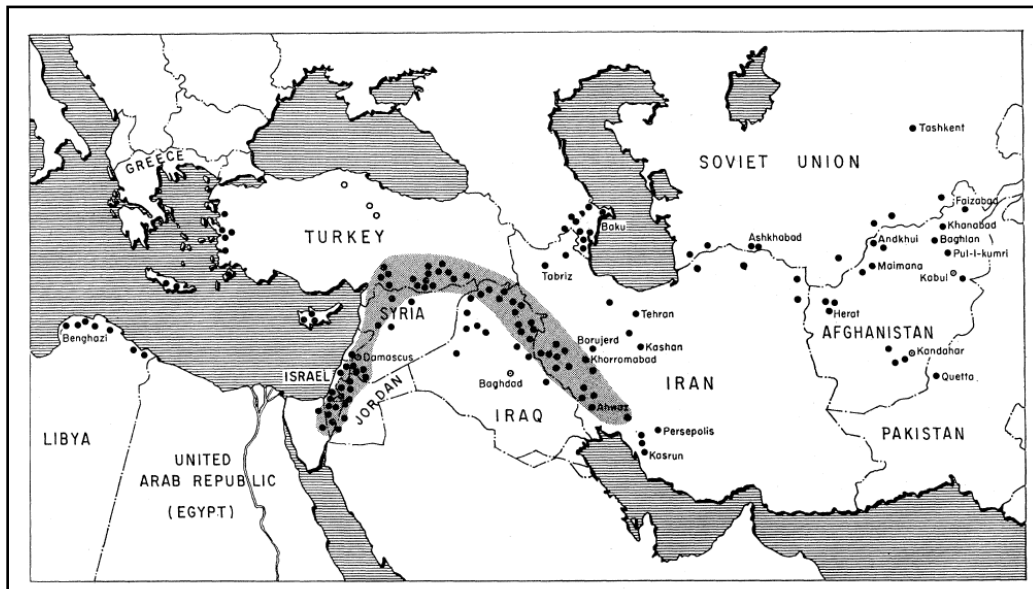


Figura 1.7. Región de origen y zonas de distribución de la cebada silvestre. (Adaptado de Harlan and Zohary, 1966).

La subsp. *spontaneum* goza de una amplia adaptabilidad ecológica, crece en hábitats naturales áridos o semiáridos, no tolera las temperaturas extremas, ocasionalmente se ha encontrado por encima de los 1500 metros (Harlan and Zohary, 1966) y, con frecuencia, resulta difícil distinguir entre el ancestro *spontaneum* y formas primitivas o variedades locales. Las dos especies taxonómicas (subsp. *spontaneum* y subsp. *vulgare*) son similares, tanto genéticamente, ya que poseen el mismo número de cromosomas, lo que facilita su cruzamiento y que puedan encontrarse híbridos de ambas especies en la naturaleza (Harlan and Zohary, 1966), como en su morfología, aunque pueden distinguirse por algunos caracteres, entre ellos que la subsp. *spontaneum* es siempre de dos carreras (Von Bothmer and Komatsuda, 2010). Entre las características agronómicas que no comparte con la cebada cultivada destacan las raíces seminales, la inflorescencia, la tolerancia a la salinidad y sequía, el tamaño de la planta y el grano, el contenido de proteínas y la producción de biomasa y de granos (Baum *et al.*, 2003) (Fig. 1.8a). La subsp. *spontaneum* es de floración abierta (Fig. 1.8b), lo que le confiere una mayor facilidad para la polinización cruzada en comparación con la especie cultivada, que tiene polinización cerrada (Von Bothmer *et al.*, 2003b). Conserva ciertos rasgos silvestres, entre los que se incluyen las aristas largas y duras, y la capacidad de dispersión de las semillas por animales (zoochory) (Fig. 1.8c), rasgo que en la subsp. *vulgare* ha sido modificado en virtud del proceso de domesticación, el raquis en segmentos y los granos son a menudo empequeñecidos, no inflados como en la cebada cultivada (Fig. 1.8de). Junto a estos rasgos fenotípicos, la subsp. *spontaneum* posee algunos caracteres específicos de adaptación como la latencia para la germinación y una elevada tolerancia a la sequía (Nevo and Shewry, 1992; Von Bothmer *et al.*, 2003b).

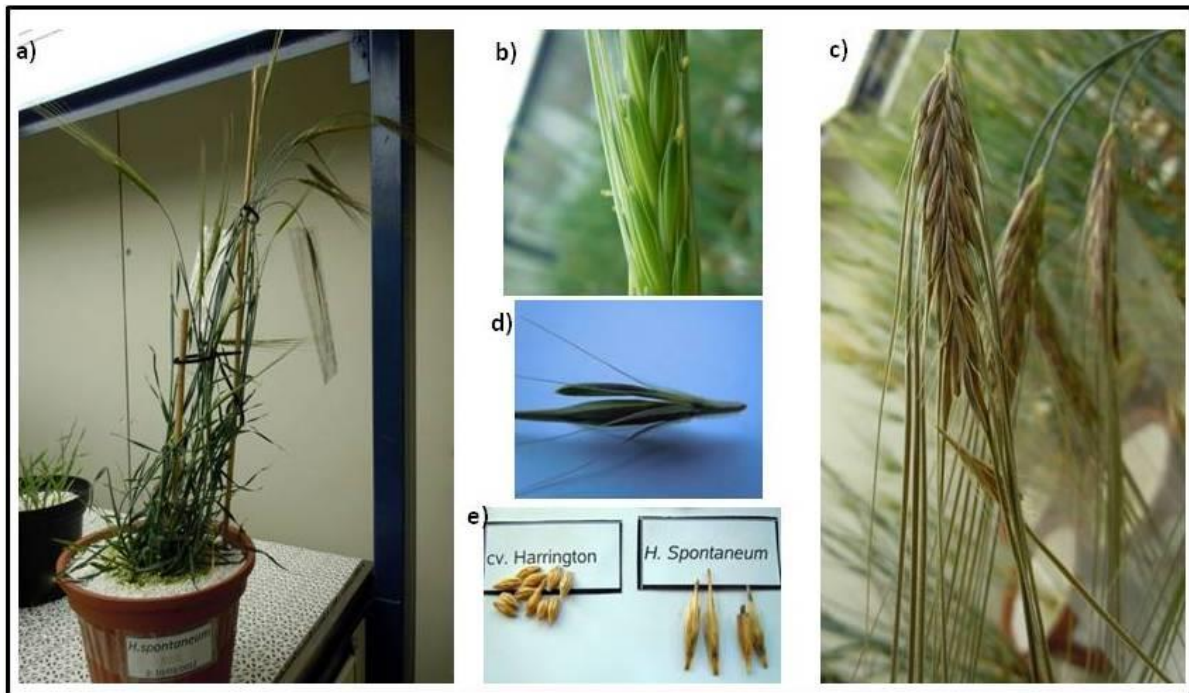


Figura 1.8. Se muestran algunas características de *H. spontaneum* (semilla OSU-11) germinada en cámaras con atmósfera controlada en el IRNASA: **a)** imagen de una planta sujeta a una estaca para poder mantenerse erecta con algunas de las espigas protegidas por bolsas para recoger los granos, **b)** espiga con floración abierta, **c)** imagen de las espigas con las aristas duras y el desprendimiento de las semillas, **d)** se muestra la espiguilla floral con las dos semillas laterales abortadas y sólo la central con grano, **e)** imagen comparativa del tamaño de los granos de *H. vulgare* cv. Harrington y del ancestro *H. spontaneum* (OSU-11).

La combinación de cruzamientos de la cebada cultivada con *H. spontaneum* ha mostrado una gran compatibilidad, incluidos los híbridos obtenidos de cruces artificiales (Von Bothmer *et al.*, 2003b; Hori *et al.*, 2005; Zohary *et al.*, 2012). Como progenitor donante, el ancestro confiere gran potencial genómico para caracteres de adaptación a condiciones ambientales extremas, por ser originario de zonas áridas de Asia Occidental (Grando *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010; Von Bothmer and Komatsuda, 2010). Se ha mostrado que frecuentemente estos alelos se encuentran presentes en especies silvestres que no poseen características agronómicas deseables (Sorrells and Wilson, 1997), pero contribuyen a aumentar la diversidad alélica (Reynolds *et al.*, 2006).

1.3.2.- Cebada cultivada (*Hordeum vulgare* L.).

La cebada es una especie que se cultiva a nivel mundial, preferentemente en zonas de secano y climas mediterráneos, por ser un cultivo con menores requerimientos que otros cereales. Es el cereal de grano más ampliamente adaptado, por su buena tolerancia al frío, sequía, salinidad y suelos alcalinos (Ullrich, 2010; Zohary *et al.*, 2012), y puede encontrarse en áreas marginales (Bengtsson, 1992) donde constituye el sustento diario (Ceccarelli and Grando, 1996). Se ha encontrado sobre los 4.400 metros en el Himalaya, en zonas inundadas en el sudeste de Asia y en regiones áridas del mediterráneo (Graner *et al.*, 2003; Von Bothmer *et al.*, 2003a). Los centros de diversidad de la especie *H. vulgare* L. se han definido como áreas de interés por el elevado número de especies nativas que albergan, entre ellas América del Sur con quince especies, el Oeste de América del norte con siete especies, el Mediterráneo con cuatro especies y Asia central con tres especies (Von Bothmer *et al.*, 2003b). Esta heterogeneidad ofrece una amplia fuente de diversidad genética para la

mejora del cultivo, y constituye las bases fundamentales para el estudio de los procesos de adaptación y la identificación de genes involucrados en la tolerancia al estrés (Marok *et al.*, 2013), a través del uso de los recursos fitogenéticos disponibles, ya que se han descrito 31 especies del género *Hordeum* (Von Bothmer and Komatsuda, 2010).

1.3.3.- Características de la cebada.

Las plantas de cebada cultivada tienen varios tallos cilíndricos. Dependiendo del cultivar presentan de seis a nueve entrenudos y pueden llegar a alcanzar una altura que fluctúa entre 0.6 y 1.5 m. Los tallos son poco vigorosos y huecos, lo que provoca que sea una especie muy susceptible al encamado (Faiguenbaum, 2003). Las hojas están conformadas por la vaina que se inserta en el nudo y envuelve al entrenudo situado sobre él y la lámina separada del tallo (Fig. 1.9). En el punto de unión entre la lámina y la vaina se encuentran dos estructuras muy características, la lígula, que es una fina membrana blanquecina de borde irregular que se encuentra en contacto íntimo con el tallo y, las aurículas, que son dos prominencias en forma de hoz que lo envuelven y se cruzan en la parte opuesta (Molina Cano *et al.*, 1989).

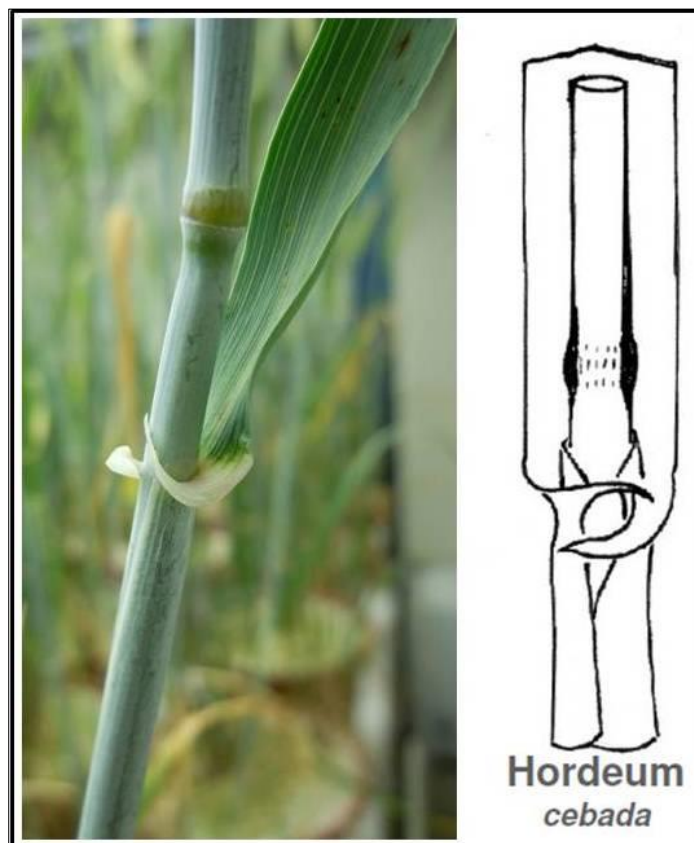


Figura 1.9. Imagen de la inserción de la hoja al tallo de cebada, junto a un esquema que muestra como las aurículas envuelven el tallo y se cruzan de forma opuesta.

Al final de cada tallo se desarrolla una inflorescencia en forma de espiga donde se forman los granos o semillas. La espiga presenta un eje principal o raquis y está formada por espiguillas, las cuales se disponen de a tres en forma alterna a ambos lados del raquis. Esta característica permite distinguir las especies *Hordeum* de las otras *Triticeae*. La espiga de cebada se distingue en dos tipos

morfológicos de dos y de seis carreras. En cebadas de dos carreras (*Hordeum distichum* L.) únicamente resultan fértiles las espiguillas centrales y abortan las laterales, mientras que en las cebadas de seis carreras (*Hordeum hexastichum* L.) las tres espiguillas son fértiles (Zohary *et al.*, 2012) (Fig. 1.10), las glumas son cetáceas o aplanadas en la parte adaxial de la espiguilla (Von Bothmer *et al.*, 2003a; Von Bothmer and Komatsuda, 2010). El tipo de carrera (dos o seis) es básicamente controlado por una mutación recesiva del gen V (Zohary *et al.*, 2012). El gen *vrs1*, en la cebada de seis carreras está activo y en la de dos carreras es recesivo. El gen *int-c* (*intermedium spike-c*) controla el desarrollo de los granos laterales y regula el tamaño de las espiguillas laterales. El doble recesivo de *vrs1* y *int-c*, con frecuencia conduce a un escaso desarrollo de las espiguillas laterales en espigas de seis carreras (Von Bothmer *et al.*, 2003b). Las cebadas también pueden diferenciarse según la duración de su ciclo en variedades de invierno, primavera o facultativas, y según las semillas estén o no protegidas, las variedades de cebada se clasifican en cebada con la semilla protegida y la semilla desnuda (Ullrich, 2010).



Figura 1.10. Imagen que muestra la cebada cultivada de seis y de dos carreras.

1.4.- Origen del material vegetal usado en este estudio.

El rendimiento de los cultivos es particularmente vulnerable a las alteraciones ambientales. La disminución de los recursos hídricos destinados a la agricultura y la necesidad de incrementar la producción de cereales como consecuencia del crecimiento de la población mundial requerirá cultivos mejor adaptados a la sequía. Una solución sostenible y económicamente viable para incrementar la estabilidad y productividad de los cultivos frente a las condiciones ambientales adversas es la mejora genética (Nevo and Chen, 2010) por introgresión de genes agrónomicamente importantes y QTL (*quantitative trait loci*) del genotipo silvestre (Xie and Nevo, 2008).

La mejora genética convencional de la cebada contempla el cruzamiento de dos progenitores con las características agrónomicas deseables, y la posterior selección de los mejores recombinantes dentro de la progenie (Thomas, 2002). Para ello los mejoradores utilizan colecciones de germoplasma como fuente de diversidad genética, aunque en muchos programas de mejora el nivel de diversidad es limitado (Matus and Hayes, 2002).

Estudios de diversidad genética en cebada silvestre (*Hordeum vulgare* L. subsp. *spontaneum*) y de los efectos del proceso de domesticación, muestran que la cebada cultivada representa solo una parte del rango de variación mostrado por su ancestro silvestre. Los estudios moleculares indican que la cebada cultivada contiene, como promedio, un 40% de los alelos encontrados en la cebada

silvestre (Ellis *et al.*, 2000). Además, la cebada cultivada y su ancestro silvestre difieren en algunas características de importancia agronómica, tales como la morfología de las raíces seminales, tamaño del grano, contenido de proteína, precocidad, altura de la planta y tolerancia a la sequía etc. (Baum *et al.*, 2003). Por lo tanto, el progenitor silvestre de cebada cultivada puede contribuir con alelos de utilidad para muchas características que se han perdido durante el proceso de domesticación (Ellis *et al.*, 2000).

En la búsqueda de variabilidad genética en cebada, Matus *et al.* (2003) desarrollaron una población de líneas recombinantes con sustitución de cromosomas (*Recombinant Chromosome Substitution Lines*, RCSLs) usando una accesión del ancestro silvestre *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* (accesión Caesarea 26-24, originario de Israel) como progenitor donador y *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* cv. Harrington (origen norteamericano, de aptitud maltera) como progenitor recurrente. La población se desarrolló haciendo uso de la estrategia avanzada de retro-cruzamientos establecida por Tanksley and Nelson (1996), de manera que las líneas RCSL son el resultado de dos retro-cruzamientos con el progenitor recurrente y seis generaciones de autofecundación (Fig. 1.11). Para la obtención de la generación F₁, el progenitor recurrente se usó como femenino y el donador como masculino. Para las generaciones BC₁ y BC₂, el progenitor recurrente se utilizó como masculino. Las 140 líneas RCSL desarrolladas representan una rica fuente de diversidad genética para estudios fisiológicos y genéticos. Además, la accesión Caesarea 26-24 se recogió en un ambiente árido y salino en Israel, lo que sugiere que la introgresión de segmentos del genoma de esta accesión del ancestro silvestre sobre el cultivar Harrington podría proporcionar a alguna de las líneas RCSL alelos útiles que confieran adaptabilidad o tolerancia al estrés abiótico, en particular a la sequía.

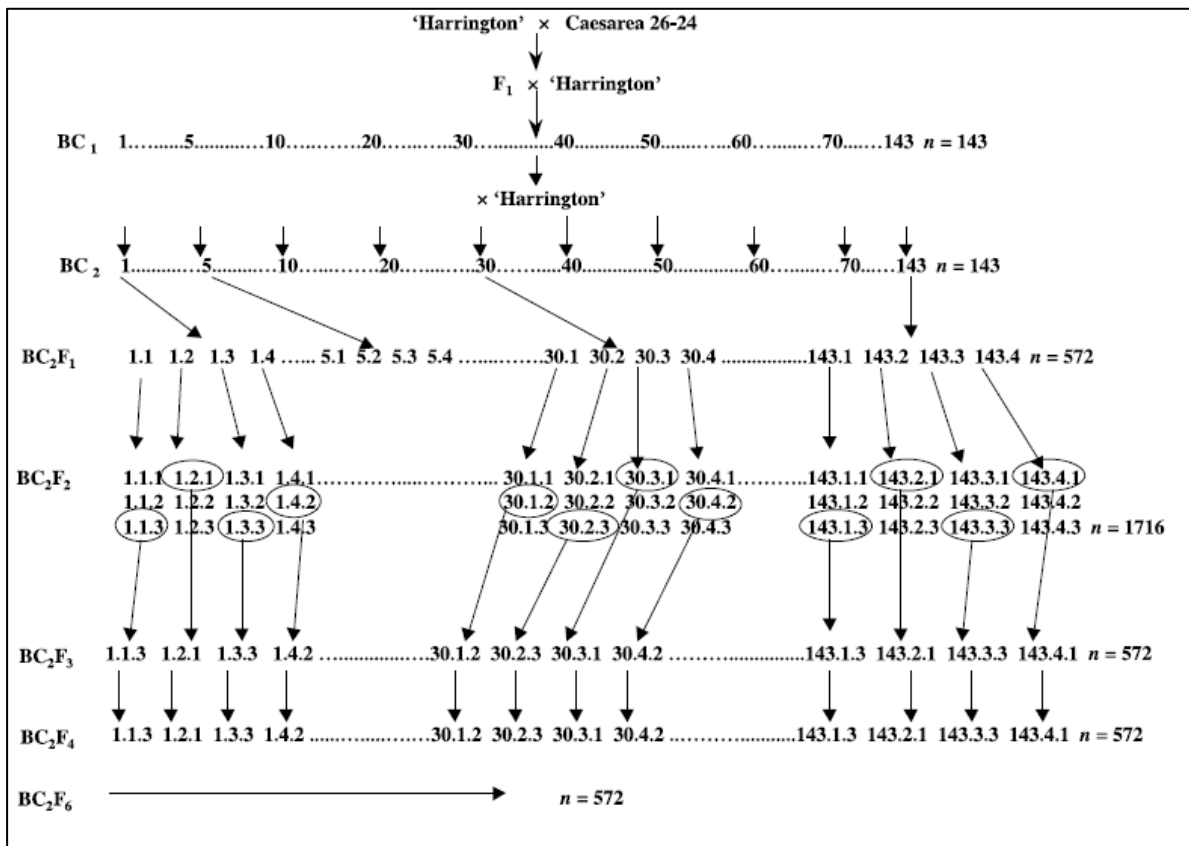


Figura 1.11. Desarrollo y descendencia de las Líneas Recombinantes con Sustitución de Cromosomas (RCSLs) producto de la introgresión de *H. vulgare* subsp. *spontaneum* (Caesarea 26-24) en *H. vulgare* subsp. *vulgare* cv. Harrington. Las generaciones se muestran en la izquierda de la figura y el tamaño de la población a la derecha. (Adaptado de Matus *et al.*, 2003).

Para la caracterización molecular, las 140 RCSLs de la F₆ y los progenitores donador y recurrente se cultivaron en el invernadero para la extracción de ADN y la recolección de semillas. Mientras que para las evaluaciones fenotípicas, las 140 líneas de la BC₂F₇ de RCSL y los progenitores se cultivaron en el campo (Matus *et al.*, 2003).

El estudio de las RCSLs ha mostrado que el porcentaje del genoma de *H. vulgare* subsp. *spontaneum* introgresado varió entre un 0% y un 36.7%, con un valor medio de 12.6%.

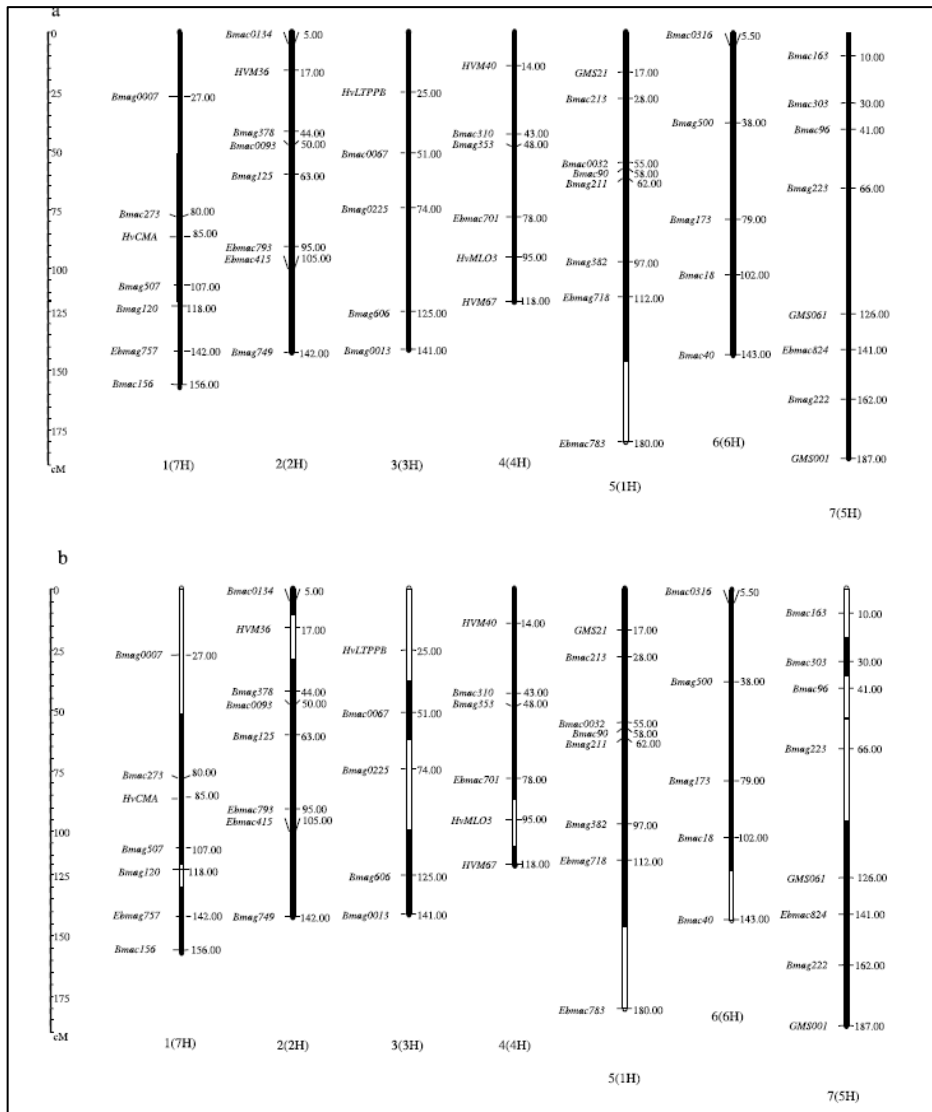


Figura 1.12. Gráfica de los genotipos RCSL 138 (a) y RCSL 16 (b), respectivamente. Pueden apreciarse el 3.2% y el 30% de segmentos de *H. vulgare* subsp. *spontaneum* (Caesarea 26-24) (segmento blanco) introgresados en *H. vulgare* subsp. *vulgare* cv. Harrington (segmento negro) por retrocruzamientos en cada una de las líneas RCSL. (Adaptado de Matus *et al.*, 2003).

La variabilidad en la introgresión puede apreciarse entre las líneas RCSL 138 y 16 (Fig. 1.12). Mientras que la línea RCSL 138 contiene solo un 3.2% de *H. vulgare* subsp. *spontaneum* en su genoma, y se corresponde con un único segmento introgresado localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (1H) (Fig. 1.12a), la línea RCSL 16 muestra un 30% de introgresión, y los segmentos introgresados se encuentran distribuidos entre los 7 cromosomas (Fig. 1.12b).

En una evaluación preliminar de las RCSLs se observó que la introgresión del genoma del ancestro en muchos casos produjo pérdidas del fenotipo deseado en el progenitor cultivado. Sin embargo, en algunos casos el genoma del ancestro fue una fuente de alelos favorables para algunos caracteres de importancia agronómica y de calidad maltera (Matus *et al.*, 2003).

En un estudio posterior, Inostroza *et al.* (2007) evaluaron el rendimiento de grano y la tolerancia a la sequía de las líneas RCSL bajo condiciones de clima mediterráneo en dos localidades chilenas, que difieren en términos de disponibilidad hídrica, durante tres temporadas de crecimiento: 2004-2005, 2005-2006 y 2006-2007. Las localidades fueron Santa Rosa (36°32' lat. Sur; 71°55' long. Oeste; 220 m.s.n.m) con una precipitación media anual de 1010 mm, que se corresponde con un ambiente óptimo sin restricción hídrica, y Cauquenes (35°58' lat. Sur; 72°17' long. Oeste; 177 m.s.n.m) con una precipitación media anual de 509 mm, que en las condiciones del experimento se consideró la localidad con escasez en la disponibilidad hídrica. Por tratarse de ambientes mediterráneos, el cultivo permanece bajo estrés hídrico durante el período de llenado del grano. En la primera temporada se estudiaron 80 de las 140 RCSLs y en las siguientes se evaluó una selección de 13 RCSLs. Durante la primera temporada, el rendimiento de grano varió como promedio de las 80 RCSLs entre 4.4 y 8 T ha⁻¹ en las localidades con y sin restricciones hídricas, respectivamente, reflejando las diferencias en la disponibilidad de agua. Con los datos del rendimiento de grano obtenidos en los ambientes de amplia y escasa disponibilidad hídrica se obtuvo el índice de sensibilidad a la sequía (ISS). El ISS varió ampliamente entre genotipos, desde 0.24 hasta 1.53, y se correlacionó negativa y significativamente con el rendimiento de grano en el ambiente con déficit hídrico, lo que permitió seleccionar un grupo de genotipos tolerantes (ISS < 1) y otro de sensibles (ISS > 1) a la sequía. Los genotipos tolerantes a la sequía mostraron en el ambiente con escasa disponibilidad hídrica un rendimiento de grano promedio de 18, 12 y 7% superior al de los no tolerantes, en las temporadas 2004-2005, 2005-2006 y 2006-2007, respectivamente (Inostroza *et al.*, 2007).

Con posterioridad, Inostroza *et al.* (2009) evaluaron el rendimiento de grano y la altura de la planta de las 80 líneas RCSL en seis ambientes diferentes que difieren en la humedad del suelo. De los datos de rendimiento obtenidos en los diferentes ambientes, se calculó la adaptabilidad (pendiente de la regresión entre el rendimiento de una RCSL individual, y la media del rendimiento de todas las RCSLs a través de los ambientes) (Finlay-Wilkinson slope) y estabilidad del rendimiento. En todos los ambientes, se encontraron diferencias en el rendimiento de grano entre las líneas RCSL, y una gran variación en la adaptabilidad del rendimiento, indicando una respuesta diferencial de las RCSLs a los factores ambientales entre los ambientes estudiados. El análisis de componentes principales permitió identificar genotipos con mejor comportamiento agronómico que el progenitor recurrente cv. Harrington. Las regiones introgresadas se asociaron con variaciones fenotípicas en la altura y el rendimiento de grano y con QTL para características relacionadas con el estado hídrico y la tolerancia a la sequía. Las regiones que correspondían con localizaciones de QTL descritas para otras combinaciones de germoplasma de cebada podrían representar variantes alélicas noveles respecto a los loci descritos previamente (Inostroza *et al.*, 2009).

Este estudio mostró que las líneas RCSL son útiles para la identificación de alelos favorables en germoplasma exótico, y también para la identificación de regiones del genoma del progenitor recurrente que deberían de mantenerse en otros intentos de desarrollo de germoplasma. En la línea RCSL 89, que mostró un menor rendimiento agronómico, la introgresión de *H. spontaneum* en el cromosoma 3H y 7H (Fig. 1.13) se asoció con reducciones en el rendimiento e incremento de la altura de la planta (Inostroza *et al.*, 2009).

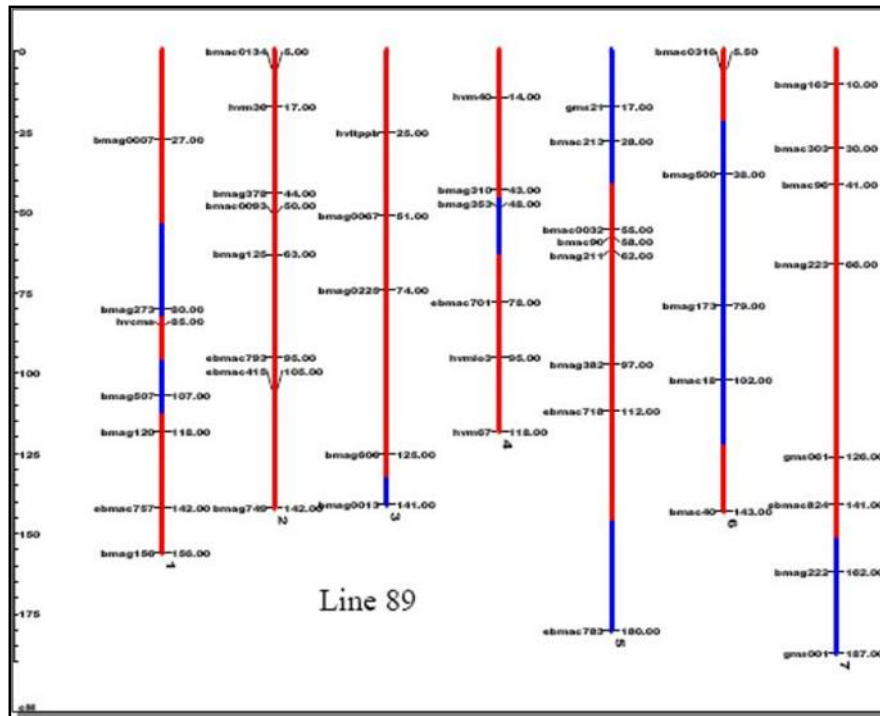


Figura 1.13. Gráfica del genotipo RCL 89, que muestra los fragmentos de *H. vulgare* subsp. *spontaneum* (color azul) introgresados en *H. vulgare* subsp. *vulgare* cv. Harrington (color rojo). Los números de los cromosomas según la nueva nomenclatura de cebada son: 1 (7H), 2 (2H), 3 (3H), 4 (4H), 5 (1H), 6 (6H) y 7 (5H). (Adaptado de Inostroza *et al.*, 2009).

Los estudios desarrollados por los investigadores chilenos sugieren que la introgresión de segmentos del cromosoma del progenitor silvestre puede mejorar el rendimiento en cultivares élite (Matus *et al.*, 2003; Inostroza *et al.*, 2007; 2009).

En los programas de mejora genética de cereales en ambientes mediterráneos, caracterizados por una escasa disponibilidad hídrica, la selección se ha basado fundamentalmente en la evaluación del rendimiento *per se*. Sin embargo, el rendimiento es un carácter de baja heredabilidad y alta dependencia del ambiente (interacción genotipo x ambiente) (Richards *et al.*, 2002). Por lo que el estudio exhaustivo de la respuesta de los cultivos a nivel bioquímico y molecular, podría ayudar a identificar características claves que limitan el rendimiento. Dicha aproximación podría complementar los programas de mejora genética convencional y podría ayudar a incrementar la estabilidad y productividad de los cultivos en ambientes con escasa disponibilidad hídrica (Richards *et al.*, 2002).

En base a ello, en el marco de un proyecto de cooperación CSIC-CONICYT, el grupo de investigación participante en este trabajo colaboró con los investigadores chilenos en la evaluación de la variabilidad en la respuesta a la sequía terminal en experimentos de campo en dos ambientes chilenos (Cauquenes y Santa Rosa, ver detalles más arriba) con 25 de las 140 RCLs. Se evaluó la conductancia de los estomas, la biomasa, el rendimiento en la producción de grano y el contenido de carbohidratos solubles en el tallo, ya que un elevado contenido de estos carbohidratos ha sido sugerido como criterio de selección en programas de mejora de cereales. El estudio mostró variabilidad genotípica en el contenido de carbohidratos solubles del tallo en función de la disponibilidad hídrica del suelo con incidencia en el rendimiento de grano (Méndez *et al.*, 2011; Del Pozo *et al.*, 2012).

Introducción

Estos resultados preliminares instan a investigar más en profundidad, en un grupo de líneas RCSLs con diferente capacidad de acumulación y removilización de carbohidratos con respecto al cultivar parental Harrington, la variabilidad genotípica en la respuesta a la sequía. El estudio, en ambientes controlados, se centró en la sequía de larga duración, a diferencia de la sequía terminal evaluada en las experimentaciones en campo (frecuente en ambientes mediterráneos). Además se evaluó el papel de los carbohidratos solubles del tallo, en particular los fructanos, en el llenado del grano en condiciones de escasa disponibilidad hídrica y, por tanto, en el rendimiento de grano.

2.- Objetivos

El objetivo general de ese trabajo de Tesis Doctoral fue evaluar la respuesta al déficit hídrico en líneas recombinantes con sustitución de cromosomas de cebada y profundizar en el papel desempeñado por los carbohidratos en este proceso y sus implicaciones en la productividad y el rendimiento de los cultivos.

Se estableció como hipótesis de trabajo que los efectos de una limitación en la disponibilidad de agua dependerán de la intensidad y duración de la sequía, de la densidad del cultivo y la potencial competencia por los recursos hídricos y nutricionales, y de la variación entre genotipos en el contenido de carbohidratos solubles en el tallo. Este último es uno de los factores genéticos que influyen en el peso del grano y la productividad y puede ser más relevante en ambientes con escasez de agua.

Con esta finalidad la investigación se enfocará a:

- Caracterizar la variabilidad genotípica de los efectos de la sequía prolongada de diferente intensidad en la asimilación fotosintética del carbono.
- Valorar la influencia del ambiente en la acumulación de carbohidratos y compuestos nitrogenados en las hojas y el tallo durante el desarrollo vegetativo y reproductivo del cultivo en los diferentes genotipos.
- Conocer las relaciones, primero, del contenido y grado de polimerización de los fructanos con el nivel de expresión de genes para enzimas de la biosíntesis y degradación de estos carbohidratos. Y segundo, del contenido de proteínas con la actividad de la nitrato reductasa y la expresión del gen que codifica dicha proteína.
- Relacionar la contribución de reservas en el tallo con el rendimiento final: repercusiones en el contenido de C y N en el grano.

3.- Materiales y métodos

3.1.- Material vegetal.

El material vegetal utilizado en los experimentos realizados en este trabajo de investigación fue la cebada. Se emplearon tres líneas recombinantes con sustitución de cromosomas, líneas RCSL 8, 76 y 89, las cuales mostraron diferente capacidad de acumulación de carbohidratos solubles en el tallo y distintos índices de sensibilidad a la sequía en experimentos de campo realizados en dos localidades chilenas que diferían en términos de disponibilidad hídrica (Inostroza *et al.*, 2007; Méndez *et al.*, 2011; Del Pozo *et al.*, 2012), junto al cultivar parental Harrington (para más detalles ver apartado, origen del material vegetal usado en este estudio del capítulo de introducción). En base al rendimiento de grano en condiciones de campo, las líneas RCSL 8 y 76 se clasificaron como tolerantes y la línea RCSL 89 como no tolerante (Inostroza *et al.*, 2007).

3.2.- Condiciones de cultivo.

3.2.1.- Lugar de cultivo.

Los experimentos se realizaron en una cámara de crecimiento con ambiente controlado (fitotrón, INKOA sistemas S.L) de dimensiones 3.58 m largo x 2.35 m alto x 3.4 m ancho. La cámara cuenta con flujo de aire para homogeneizar el ambiente y tiene en su interior dos mesas (2.5 x 1.4 m) sobre una de las cuales se colocaron las macetas (Fig. 3.1cd). Cada mesa posee un panel de luminarias compuesto de lámparas fluorescentes que es regulable en altura y permite ajustar la intensidad luminosa deseada. En nuestros experimentos, la densidad de flujo fotónico se ajustó manualmente a $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y los restantes parámetros ambientales - humedad, temperatura y fotoperiodo - se ajustaron a través de un ordenador que controla automáticamente el funcionamiento de la cámara. El fotoperiodo establecido en la cámara fue de 16 h, con una temperatura de 20 °C durante las horas de luz y de 15 °C durante la oscuridad y una humedad relativa del 60%.

La programación de los parámetros ambientales de la cámara se realizó con el programa Osaka Communicator, siguiendo las instrucciones indicadas en el “manual de programación de una cámara fitotrón de cultivo de plantas con control de temperatura, humedad, iluminación, fotoperiodo y abonado carbónico atmosférico” (IRNASA-CSIC, febrero de 2007). Los parámetros, una vez que se programan, pueden visualizarse en el panel de control de la cámara (Fig. 3.1a). El programa permite no sólo el control del funcionamiento de la cámara, ya que se establece un umbral de variabilidad al alza y a la baja del parámetro ajustado que en caso de ser superado activa la alarma en el sistema, sino que permite también el registro continuado de todos los parámetros. Los datos registrados pueden descargarse con la asiduidad que el manipulador estime oportuna y pueden transferirse a un fichero excel, lo que facilita la manipulación y visualización de los datos gráficamente y permite vislumbrar la posible variabilidad de alguno de los parámetros, en caso de que existiese.



Figura 3.1. Imágenes de la cámara de crecimiento con ambiente controlado (fitotrón, INKOA sistemas S.L): (a-b) panel de control exterior e interior de la cámara, (c-d) mesa sobre la que se colocan las macetas con plantas en diferentes etapas del desarrollo.

3.2.2.- Descripción de las macetas y el sustrato.

Para el cultivo de la cebada se emplearon macetas de plástico marrones (vaso asso) de 25 cm de diámetro y 5.8 litros de capacidad para minimizar la limitación del crecimiento de la raíz (Fig. 3.2). El sustrato utilizado fue la perlita. La perlita es una roca volcánica del grupo de las violitas, se trata de un material inerte y ligero, que carece de sustancias orgánicas. La perlita destaca por su gran capacidad de retención de humedad y elevada porosidad, lo que le confiere unas características físicas adecuadas para la actividad radicular, ya que proporciona una apropiada aireación para el crecimiento de las raíces. La capacidad de intercambio catiónico de la perlita es muy baja, alrededor de 3 meq/100 g, este factor hace que deba de realizarse un adecuado aporte de nutrientes, ya que apenas quedarán retenidos en el sustrato. La ventaja del cultivo en perlita es la facilidad que ofrece para mantener un perfil casi constante de humedad con respecto a otro tipo de soportes empleados para el cultivo de plantas (www.infoagro.com/).

A cada una de las macetas se añadió una cantidad exacta de perlita, en concreto 510 g (Fig. 3.2). A continuación, se estimó la capacidad de campo añadiendo agua lentamente a las macetas para facilitar que el soporte se humedeciera completamente hasta saturación y drenaje completo, lo que aseguraba que quedase sólo agua ligada en las partículas de la perlita y en los espacios libres, y después se determinó el peso de las macetas con una balanza Soehnle Professional compacta. La capacidad de campo se calculó como la cantidad máxima de agua que fue capaz de retener la maceta una vez que drenó completamente. Sánchez-Rodríguez (1998) comprobó que la capacidad de retención de agua máxima de la perlita fue aproximadamente $4 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$ y al aplicar sobre la perlita una

presión de 0.013 MPa, que elimina el agua no ligada, se perdió un 25% del agua retenida, lo que permitió establecer que las plantas en control tuvieran una cantidad de agua aproximada del 75% y las plantas en déficit tuvieran un 25% del agua máxima retenida por la perlita en su trabajo experimental. Las apreciaciones sugeridas por Sánchez-Rodríguez (1998) se tuvieron en consideración para la adopción del régimen de riego, en los tratamientos de control y déficit hídrico, en los experimentos que se han realizado en este trabajo de investigación. Este régimen de hidratación se mantuvo para las plantas control, y para las plantas en déficit, el aporte de agua varió en cada uno de los dos experimentos realizados respecto al establecido por Sánchez-Rodríguez (1998). En el primer experimento, las plantas en déficit hídrico tuvieron un 35% del agua máxima retenida por la perlita y se prepararon 24 macetas (3 macetas x 2 tratamientos de disponibilidad hídrica - control y sequía - x cuatro genotipos de cebada). En el segundo, las plantas en déficit tuvieron un 50% del agua máxima retenida por la perlita y se dispuso de 48 macetas (6 macetas x 2 tratamientos de disponibilidad hídrica - control y sequía - x cuatro genotipos de cebada) (ver apartado 3.3).

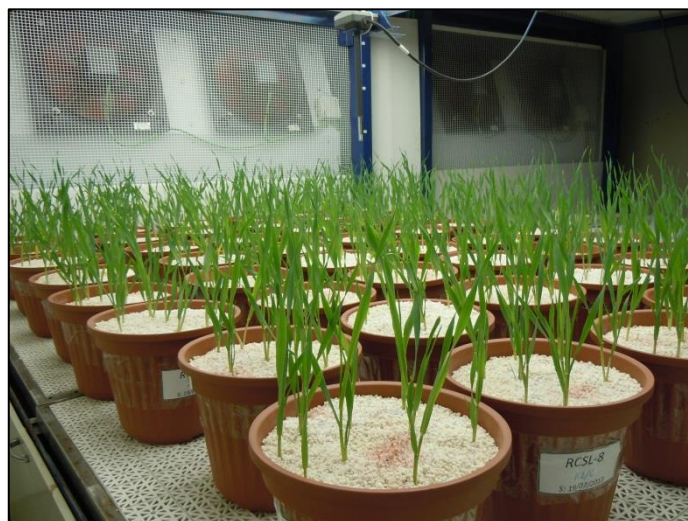


Figura 3.2. Macetas (vaso asso) dispuestas en una de las mesas de la cámara de crecimiento (fitotrón, INKOA sistemas S.L).

Durante el desarrollo de los experimentos, tanto en las plantas control como en aquellas en sequía, el agua perdida por evapotranspiración era calculada diariamente mediante el pesado de las macetas, y se reponía a diario con solución nutritiva, alternando con agua, para mantener constante el nivel deseado de disponibilidad hídrica.

3.2.3.- Siembra en macetas.

La siembra se realizó colocando 15 semillas por maceta distribuidas de forma radial sobre la perlita hidratada a una profundidad aproximada de 1.5 cm (Fig. 3.3). Las semillas, una vez que se depositaron en la perlita, se cubrieron con el sustrato. Posteriormente, los lugares en los que se colocaron las semillas se regaron con lentitud para mantener la hidratación, por si hubiese existido evaporación durante la manipulación, para lo que se emplearon unos 100 ml de agua. Tras la germinación de las semillas y posterior desarrollo, cuando las plántulas disponían de dos hojas completamente desarrolladas, se procedió al aclaramiento de las macetas. Para ello, se seleccionaron

ocho plántulas por maceta de tamaño similar en el primer experimento y nueve en el segundo, y las plántulas restantes se eliminaron cuidadosamente de la maceta (ver apartado 3.3). Las macetas se colocaron distribuidas al azar en una de las mesas de la cámara de crecimiento. No obstante, durante el control de riego diario, las macetas se redistribuían nuevamente para compensar posibles diferencias locales en la mesa, principalmente derivadas de la heterogeneidad de la luz (efecto borde).



Figura 3.3. Siembra de las 15 semillas distribuidas en forma radial en la maceta que contiene perlita hidratada.

3.2.4.- Composición de la solución nutritiva.

Las plantas fueron regadas periódicamente con solución nutritiva cuya composición, tanto de macronutrientes como micronutrientes, fue una combinación adaptada de las soluciones nutritivas propuestas por Israel *et al.* (1990) - macronutrientes - y Hewitt (1966) - micronutrientes - (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Composición de la solución nutritiva: macronutrientes y micronutrientes expresados en concentración (mM) final en la disolución.

Macronutrientes	Concentración	Micronutrientes	Concentración
KNO ₃	6 mM	MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.005 mM
Ca(NO ₃) ₂	4 mM	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.001 mM
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH 5.6	1 mM	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.001 mM
MgSO ₄	2 mM	H ₃ BO ₃	0.05 mM
CaCl ₂	0.5 mM	NaCl	0.1 mM
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0005 mM
		NaFe-EDTA, o,oEDDA	0.040 mM

El pH de la solución nutritiva se ajustó a 5.6 con HCl 3N. En la tabla se indican dos sales de hierro diferentes, ya que en el primer experimento se utilizó el NaFe-EDTA (Sigma, E6760), y en el segundo dicha sal fue sustituida por el quelato EDDHA con enlace orto-orto (ABAXO ferro), debido a que incrementa la biodisponibilidad del hierro a pH más básico.

Puesto que comprobamos que el pH de la perlita tiende a ser muy básico, en el segundo experimento, la perlita de las macetas se equilibró previamente con solución nutritiva de pH 5.6 que contenía el quelato EDDHA con enlace orto-orto como fuente de hierro (ver apartado 3.3). Para el equilibrado de las 48 macetas necesarias, se prepararon 125 litros de solución nutritiva, y se añadieron dos litros de solución nutritiva a cada una de ellas, se dejó drenar el exceso de solución, añadiéndose a continuación otros 500 ml de solución. Pudo comprobarse que el pH de la solución

drenada osciló entre 5.92–5.95, a diferencia de aquellas hidratadas con agua en las que el pH varió de 7.5–7.7.

3.3.- Diseño y descripción de los experimentos.

Se realizaron dos experimentos para conocer el comportamiento de cuatro genotipos de cebada bajo estrés hídrico de larga duración (Fig. 3.4). Puesto que la variabilidad en la concentración de los carbohidratos solubles en el tallo entre genotipos es uno de los factores genéticos que influyen en el peso del grano en ambientes con escasez de agua, y los fructanos constituyen la principal forma de almacenaje de carbohidratos solubles en el tallo, la finalidad de la experimentación realizada durante dos anualidades consecutivas fue:

a) Experimento 1: investigar los efectos de la sequía moderada de larga duración en la partición del C y N en las hojas y el último entrenudo del tallo, principalmente en el contenido y grado de polimerización de los fructanos, y sus repercusiones en el contenido de C y N en el grano, en genotipos de cebada con diferente capacidad de acumulación y removilización de carbohidratos.

b) Experimento 2: estudiar los efectos de la sequía de menor intensidad y duración en la variabilidad entre genotipos en el contenido de carbohidratos y proteínas en hojas y entrenudos del tallo y su relación con la actividad de los enzimas y/o el nivel de expresión de genes de su síntesis y/o degradación.

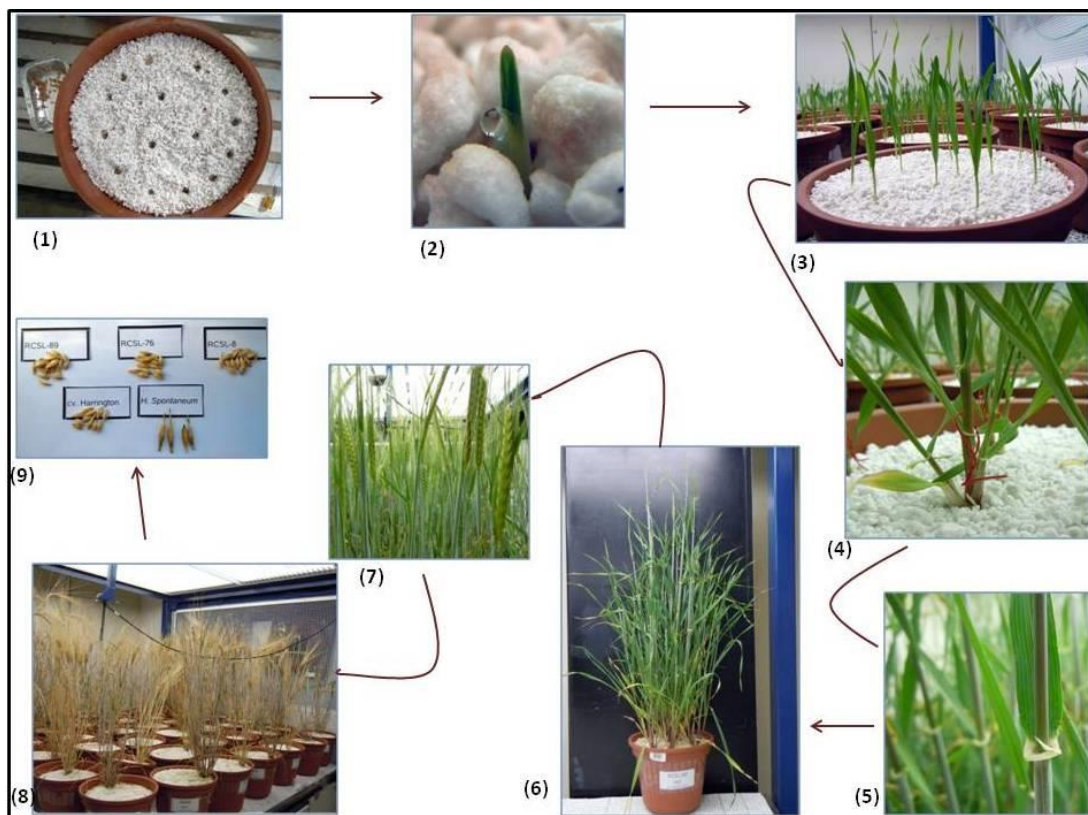


Figura 3.4. Los experimentos se realizaron durante el ciclo completo de desarrollo de la cebada, se muestran imágenes de: **1)** siembra, **2)** emergencia, **3)** estado de plántula (aclaramiento de macetas), **4)** ahijamiento (etiquetado del tallo principal), **5)** elongación de los tallos, **6)** etapa de antesis, **7)** llenado del grano, **8)** madurez y **9)** cosecha de grano.

3.3.1.- Experimento 1.

El día 10 de marzo de 2011 se sembraron semillas de tres líneas recombinantes con sustitución de cromosomas (RCSLs) de cebada, líneas 8, 76 y 89, y del cultivar Harrington en 24 macetas con perlita hidratada con agua a capacidad de campo. Para cada uno de los genotipos estudiados se prepararon seis macetas con 15 semillas cada una, las cuales fueron distribuidas al azar en una de las mesas de la cámara de crecimiento, manteniéndose en condiciones de 20/15 °C de temperatura día/noche, intensidad luminosa de 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y humedad relativa del aire de un 60%, con un fotoperiodo de 16 horas. El día 14 de marzo (4 días después de la siembra - d.d.s. -) pudo comprobarse que más del 50% de las semillas habían germinado, etapa que se completó un par de días después, iniciándose el riego de las macetas con solución nutritiva (ver apartado 3.2.4). El día 30 de marzo, 20 d.d.s., se procedió al aclarado de las macetas, dejando 8 plantas por maceta de tamaño similar. El día 4 de abril, 25 d.d.s., cuando las plantas tenían cuatro hojas y mostraban algún tallo hijo se impuso a la mitad de las macetas, tres para cada uno de los genotipos de cebada, el tratamiento de sequía y se dejaron las otras tres macetas como controles. Para llegar al 35% del agua máxima retenida por la perlita en el tratamiento de sequía, las plantas se dejaron sin riego y se controló la pérdida de peso diaria de las macetas (ver apartado 3.2.2). La disponibilidad hídrica deseada se alcanzó el día 13 de abril, 34 d.d.s., a los nueve días después de la imposición de la sequía. A partir de esa fecha, tanto en las plantas control como aquellas en sequía, el agua perdida por evapotranspiración era calculada diariamente mediante el pesado de las macetas y se reponía a diario para mantener constante el nivel deseado de disponibilidad hídrica. Además, para atenuar el efecto de la heterogeneidad de la luz en la mesa de la cámara climática se cambió la posición de las macetas en la mesa diariamente durante los controles de peso. El día 13 de abril, 34 d.d.s., se etiquetó el tallo principal de cada una de las plantas con un distintivo coloreado, con la finalidad de facilitar su rápida identificación durante la realización de las medidas de intercambio gaseoso y la recogida de muestras. El día 28 de abril, 49 d.d.s., durante el desarrollo vegetativo de las plantas de cebada se recogieron muestras foliares, correspondiente a la hoja más joven completamente extendida del tallo principal de la planta, la sexta hoja, para cada repetición, régimen hídrico y genotipo, por congelación inmediata en nitrógeno líquido en las mismas condiciones de crecimiento de las plantas.

El día 21 de mayo, 71 d.d.s., se realizaron medidas de la asimilación fotosintética del carbono en la penúltima hoja del tallo principal de una planta para cada una de las tres repeticiones de los tratamientos de control hídrico y sequía de los cuatro genotipos de cebada. Las medidas fueron realizadas con un IRGA entre las 2 y las 6 horas después del comienzo del fotoperiodo, coincidiendo con el momento de máxima fotosíntesis. Además, se recogieron muestras foliares, correspondientes a las hojas bandera y penúltima del tallo principal agrupadas conjuntamente, y del último entrenudo del tallo con nitrógeno líquido para los análisis de metabolitos (ver apartado 3.4.1). Estas medidas se realizaron inicialmente en las plantas de cebada de la línea 89, tanto en el tratamiento control como en sequía, ya que mostraron una pauta de desarrollo ligeramente más precoz que los restantes genotipos. Y para asegurar la misma ontogenia foliar en los genotipos estudiados, las medidas de intercambio gaseoso se realizaron escalonadamente. En las plantas de control hídrico, las medidas en el cultivar Harrington y las líneas 8 y 76 se demoraron un par de días respecto a las realizadas en la línea 89. En las plantas de déficit hídrico, las medidas de fotosíntesis y la recogida de muestras se realizaron un día después con respecto a las de control hídrico en dichos genotipos. Ambos muestreos coincidieron con los días 73 y 74 d.d.s., respectivamente. Las plantas utilizadas en las medidas de fotosíntesis se marcaron con un distintivo coloreado diferente al empleado para la identificación del tallo principal de las plantas, lo que facilitó que las medidas de fotosíntesis se

realizasen siempre en las mismas plantas en las etapas posteriores del desarrollo. Al finalizar la toma de muestras de hojas y del último entrenudo del tallo, el resto de la planta fue retirado de cada una de las macetas. En esas mismas fechas, se realizó una recolección adicional del tallo principal de la planta, para cada nivel hídrico estudiado, genotipo y repetición, para la estimación de su crecimiento y la determinación del contenido hídrico foliar de las hojas bandera y penúltima (ver apartados 3.4.2, 3.5). A tal fin, el tallo principal de la planta se fraccionó en espiga, hoja bandera y penúltima hoja, resto de hojas, último entrenudo del tallo y resto del tallo, determinándose en cada una de las partes el peso fresco y seco y la superficie verde (ver apartado 3.4.2).

Entre los días 6-9 y 21-23 de junio, 87-90 y 102-104 d.d.s., respectivamente, se realizaron nuevamente medidas de fotosíntesis y se recogieron muestras foliares y del último entrenudo del tallo con nitrógeno líquido, siguiendo la misma pauta indicada con anterioridad, para cada uno de los genotipos y tratamientos estudiados, exceptuando la cantidad de muestra recogida. Con el avance del desarrollo de las plantas, las hojas mostraron algunas partes secas o moteadas, y para tener cantidad de muestra suficiente y representativa se optó por tomar muestras foliares y del último entrenudo del tallo principal de dos plantas independientes por repetición. Por ello, la muestra foliar constaba de dos hojas banderas y dos penúltimas hojas desprovistas de las partes secas y/o moteadas agrupadas conjuntamente para cada una de las tres repeticiones. Y las muestras de tallo agrupaban los últimos entrenudos de los tallos principales de las dos plantas seleccionadas. El material vegetal fue congelado en nitrógeno líquido y transferido a sobres de aluminio convenientemente etiquetados, los cuales se almacenaron a -80 °C hasta su extracción y posterior análisis de metabolitos.

Al término de la experimentación descrita quedaba una planta por maceta o repetición para cada uno de los genotipos y tratamientos de control hídrico y sequía, que se correspondían con aquellas en la que se habían realizado las medidas de fotosíntesis a lo largo del desarrollo del cultivo. Dichas plantas se dejaron hasta la madurez, y el día 27 de julio, 138 d.d.s., se realizó la cosecha final, lo que permitió evaluar la producción del cultivo. En la madurez, se contabilizaron el número de tallos hijos y de espigas por planta, y se separó el tallo principal del resto de la planta. El tallo principal fue fraccionado en espiga, hojas bandera y penúltima, resto de hojas, último entrenudo del tallo y resto del tallo, y en la otra fracción de la planta se separaron las espigas del resto de la planta. De todas las partes en las que fue dividida la planta se obtuvo el peso después del secado a 60 °C durante 48 horas para eliminar los posibles restos de humedad. El peso conjunto de todas ellas permitió obtener la biomasa total. Y se determinó también el número de granos y el peso de los granos tanto de la espiga principal como del resto de las espigas de la planta (ver apartado 3.6).

La recogida de muestras para los análisis de metabolitos, según la escala Zadoks *et al.* (1974), se correspondió con las siguientes fases del desarrollo de las plantas de cebada (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Fases del desarrollo de las plantas en las que se realizaron la recogida de muestras para análisis de metabolitos.

d.d.s.	Zadoks	Descripción
49	16	6 Hojas extendidas (estadio vegetativo)
71 ± 2	70	Inicio del desarrollo del grano
88 ± 2	77	Grano lechoso tardío
103 ± 1	83	Grano pastoso temprano

d.d.s. días después de la siembra.

El trabajo descrito nos permitió investigar las combinaciones factoriales de dos niveles de disponibilidad hídrica - control y sequía (35% del agua máxima retenida por la perlita) - con cuatro

genotipos y tres repeticiones en los estadios de desarrollo vegetativo, inicio del desarrollo del grano, grano lechoso tardío y grano pastoso temprano, junto a la cosecha final en la madurez.

3.3.2.- Experimento 2.

En este experimento, a diferencia del anterior, varió la duración e intensidad del estrés hídrico impuesto a las plantas. La sequía, aun siendo de larga duración, se impuso algo más tarde por lo que las plantas estaban ligeramente más avanzadas en el desarrollo. Y la severidad de la sequía se atenuó, en comparación con el primer experimento, ya que las plantas en déficit hídrico tuvieron un 50% del agua máxima retenida por la perlita, siguiendo las indicaciones de Sánchez-Rodríguez (1998). El sustrato que se utilizó fue la perlita equilibrada con solución nutritiva de pH 5.6 de la misma composición que la empleada con anterioridad, exceptuando la fuente de hierro, el NaFe-EDTA fue sustituido por el quelato EDDHA con enlace orto-orto, debido a que incrementa la biodisponibilidad del hierro a pH más básico (ver apartado 3.2.4). Además, se duplicó el número de macetas disponibles para cada uno de los genotipos y nivel de disponibilidad hídrica estudiados, lo que nos permitió incrementar no sólo el número de réplicas para cada uno de los factores experimentales estudiados en los diferentes muestreos, que en este caso fueron cuatro, sino también la cantidad de material foliar y del tallo de cada una de las réplicas, como se detalla más adelante.

Este experimento se inició el día 19 de julio de 2012 con la siembra de semillas de las líneas recombinantes con sustitución de cromosomas 8, 76 y 89, y del cultivar Harrington en 48 macetas con perlita equilibrada e hidratada con solución nutritiva a capacidad de campo. Para cada uno de los genotipos estudiados se prepararon 12 macetas con 15 semillas cada una, las cuales se distribuyeron al azar en una de las mesas de la cámara de crecimiento, que se mantuvo en las mismas condiciones de iluminación, temperatura y humedad descritas en la experimentación anterior, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad (ver apartado 3.2.1). El día 23 de julio, 4 d.d.s., se comprobó el inicio de la germinación de las semillas y se completó unos cuatro días después, el día 27 de julio. El aclarado de las macetas se realizó el día 3 de agosto, 15 d.d.s., y consistió en retirar de cada una de las macetas aquellas plántulas más retrasadas en su desarrollo o que por proximidad pudieran limitar el desarrollo de alguna otra planta, dejándose un total de 9 plantas por maceta de tamaño similar. Entre los días 10 y 13 de agosto, 22-25 d.d.s., se procedió al marcaje del tallo principal de las plantas con un distintivo coloreado para facilitar su identificación posterior, en esas fechas las plantas mostraban cuatro hojas y algún tallo hijo. El día 23 de agosto, 35 d.d.s., cuando las plantas tenían cinco hojas completamente extendidas se impuso a la mitad de las macetas, seis para cada uno de los genotipos de cebada estudiados, el tratamiento de sequía y se dejaron las otras seis como controles. Para llegar al 50% del agua máxima retenida por la perlita en el tratamiento de sequía se dejaron sin riego las plantas y se controló la pérdida de peso diaria de las macetas. La disponibilidad hídrica deseada se logró cuatro días después, el día 27 de agosto, 39 d.d.s., y a partir de esta fecha, tanto en plantas control como en sequía, el agua perdida por evapotranspiración fue calculada diariamente, reponiéndose a continuación para mantener constante el nivel deseado de disponibilidad hídrica.

Entre los días 26-27 de septiembre, 69-70 d.d.s., se hicieron las primeras medidas de la asimilación fotosintética del carbono en la penúltima hoja del tallo principal de cinco plantas para cada uno de los genotipos y tratamientos de disponibilidad hídrica, entre las 2 y 6 horas después del

comienzo del fotoperiodo en la cámara climática. El día 26 de septiembre se realizaron las medidas de fotosíntesis de las líneas 89 y 76, tanto de los tratamientos de control hídrico como de sequía, y se recogieron muestras foliares y del tallo, cuatro repeticiones para cada una de las partes separadas de la planta, de la línea 89 en ambos niveles de disponibilidad hídrica, debido a que mostró un desarrollo más acelerado. Cada una de las cuatro repeticiones de las muestras foliares constaban de seis hojas, 3 hojas banderas y 3 penúltimas hojas, cortadas a la altura de la lígula del tallo principal de tres plantas distintas seleccionadas cada una de ellas de macetas diferentes de las seis que integraban cada uno de los niveles de disponibilidad hídrica estudiados para cada uno de los genotipos de cebada. Las muestras del tallo se correspondieron con el último y penúltimo entrenudos del tallo principal agrupados separadamente. Cada una de las cuatro repeticiones de las muestras del último entrenudo englobaba los tres últimos entrenudos del tallo principal de cada una de las tres plantas independientes de las que previamente se habían separado las hojas. Del mismo modo, cada una de las cuatro muestras del penúltimo entrenudo constaba de los tres penúltimos entrenudos de los tallos principales de los que se habían tomado las muestras anteriores. El día 27 de septiembre se midió la fotosíntesis en la línea 8 y en el cultivar Harrington en los dos regímenes hídricos estudiados y se recogieron también muestras foliares y del último y penúltimo entrenudos del tallo, en cantidad y representatividad igual a la descrita previamente para la línea 89, de la línea 76 y el cv. Harrington. La toma de muestras con nitrógeno líquido de los dos tratamientos de la línea 8 se realizó el día 28 de septiembre, coincidiendo con la recogida de muestra adicional para estimar el crecimiento y el contenido hídrico relativo (ver apartados 3.4.2, 3.5), por ser el genotipo que mostró un desarrollo ligeramente más lento de entre todos los genotipos estudiados. Para crecimiento se cortaron cuatro tallos principales de cuatro plantas de macetas independientes para cada tratamiento y genotipo. El tallo principal fue fraccionado en espiga, hoja bandera y penúltima hoja, resto de hojas, último y penúltimo entrenudos del tallo y resto del tallo, y en cada una de las partes se determinó el peso fresco y seco y la superficie verde, al igual que en el anterior experimento (ver apartado 3.4.2). Conviene mencionar que en paralelo a las medidas de fotosíntesis y a la recogida de muestras con nitrógeno líquido en los restantes genotipos se tomaron también muestras para medidas de crecimiento, con el mismo número de réplicas y fraccionamiento de las plantas antes descrito.

En fases más avanzadas del desarrollo del grano, se realizaron dos nuevas rondas de medidas de intercambio gaseoso con el IRGA entre los días 3-4 y 17-18 de octubre, 76-77 y 90-91 d.d.s., respectivamente, siguiendo la misma pauta establecida en las medidas iniciales. El primer día se realizaron las medidas de los tratamientos de control y déficit hídrico de las líneas 89 y 76, coincidiendo con los días 3 y 17 de octubre en cada una de las rondas, mientras que el segundo día, se hicieron en la línea 8 y el cultivar Harrington, en concreto los días 4 y 18 de octubre, respectivamente. Paralelamente, hubo dos nuevas tomas de muestras con nitrógeno líquido en cantidad igual a la descrita en la primera toma, tanto de muestras foliares como del último y penúltimo entrenudos del tallo, junto a la recolección adicional de los tallos principales de las plantas para medidas de crecimiento. La recogida de muestras también fue escalonada, se mantuvo el desfase de hasta un día con respecto a las medidas de fotosíntesis, de modo similar al establecido en la etapa anterior, según los genotipos con sus respectivos tratamientos. Es decir, el primer día se recogieron muestras de la línea 89, el segundo día las tomas de muestra se realizaron en Harrington y la línea 76, y el tercer día en la línea 8.

Durante los muestreos descritos de las plantas de cebada, los restos de la planta no cosechados con nitrógeno líquido fueron retirados inmediatamente de la maceta, al igual que en la toma de

muestras para la estimación del crecimiento del tallo principal. Por ello, de las nueve plantas que inicialmente contenían cada una de las seis macetas disponibles, para cada genotipo y nivel de disponibilidad hídrica, quedó una única planta por maceta, las cuales se mantuvieron hasta la madurez. Durante algunos días permanecieron en la cámara climática con el régimen de riego establecido para los tratamientos control y sequía, pero el día 26 de octubre, 99 d.d.s., por avería en la cámara de crecimiento, las plantas tuvieron que ser trasladadas al invernadero. El cambio de condiciones ambientales, semicontroladas, influyó en que la madurez del cultivo tardase aún más tiempo en alcanzarse que si hubieran continuado en la cámara de crecimiento. Los días 26-28 de diciembre, 160-162 d.d.s., se realizó la cosecha final. De las seis plantas con las que se contaba, para cada nivel de disponibilidad hídrica y genotipo (ver apartado 3.6), fueron seleccionadas las cuatro más similares para la estimación de la biomasa total de la planta y el rendimiento de grano.

La recogida de muestras para los análisis de metabolitos, según la escala Zadoks *et al.* (1974), se correspondió con las siguientes fases del desarrollo de las plantas de cebada (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Fases del desarrollo de las plantas en las que se realizaron la recogida de muestras para análisis de metabolitos.

d.d.s.	Zadoks	Descripción
70 ± 1	70	Inicio del desarrollo del grano
80 ± 2	75	Grano lechoso medio
91 ± 3	79	Grano lechoso tardío

d.d.s. días después de la siembra.

El experimento descrito nos permitió investigar las combinaciones factoriales de dos niveles de disponibilidad hídrica - control y sequía (50% del agua máxima retenida por la perlita) - con cuatro genotipos y cuatro repeticiones durante la post-antesis de las plantas de cebada, en las fases de inicio del desarrollo del grano, grano lechoso medio y grano lechoso tardío, junto a la cosecha final en la madurez.

3.4.- Recogida de muestras.

En los experimentos realizados se recogieron dos tipos de muestras en función de las determinaciones a las que fueron destinadas. La recolección se efectuó en diferentes momentos durante la post-antesis de las plantas para cada uno de los genotipos de cebada y nivel de disponibilidad hídrica estudiado, con una excepción en el primero de los experimentos realizados, como se detallará a continuación, y que se ha mencionado en el apartado de descripción de los experimentos:

- a) Criogenización de material vegetal para estudios bioquímicos y/o moleculares.
- b) Toma de muestras para crecimiento.

3.4.1.- Criogenización de material vegetal para estudios bioquímicos y/o moleculares.

La recogida de muestras foliares y del tallo se realizó en el momento de máxima fotosíntesis, entre las 4-6 horas después del comienzo del periodo luminoso, en las mismas condiciones de

iluminación y temperatura de la cámara de crecimiento. Teniendo en cuenta el pequeño tamaño de la hoja bandera de la cebada y que las medidas de fotosíntesis se realizaron en la penúltima hoja del tallo principal de la planta, para disponer de una muestra foliar representativa, las hojas bandera y penúltima fueron agrupadas conjuntamente (Fig. 3.5a). Las muestras del tallo se correspondieron con el último entrenudo del tallo principal de la planta en el primero de los experimentos realizados, y con el último y penúltimo entrenudos del tallo principal en el segundo experimento (Fig. 3.5b). No obstante, conviene mencionar que en cada uno de los experimentos realizados varió el tamaño de las muestras foliares y del tallo recogidas. En el primer experimento, las muestras constaban de las partes indicadas del tallo principal de una única planta en la segunda toma de muestras y de dos plantas en las dos restantes, mientras que en el segundo de los experimentos, las muestras agrupaban las partes del tallo principal procedentes de tres plantas diferentes (ver apartado 3.3).

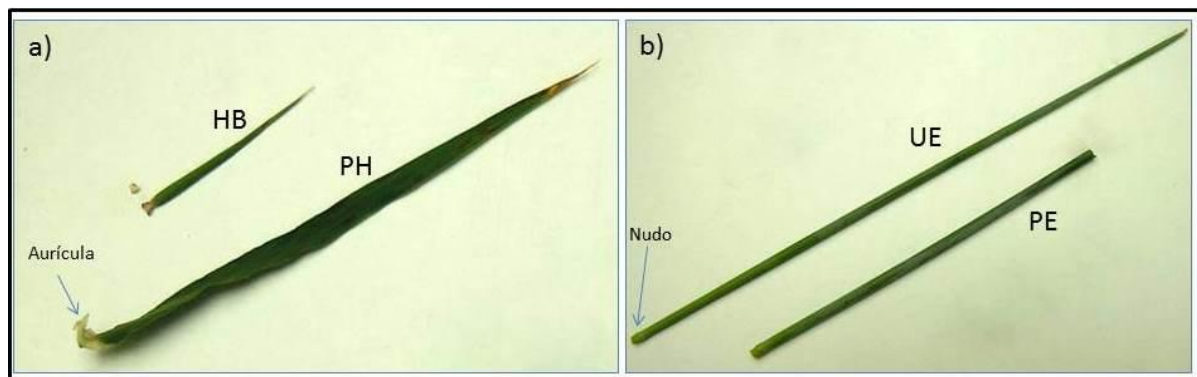


Figura 3.5. Composición de las muestras foliares y del tallo recogidas para criogenización: **a)** muestras foliares correspondientes a la hoja bandera (HB) y penúltima hoja (PH) recogidas conjuntamente, **b)** muestras de tallo correspondientes al último entrenudo del tallo (UE, recogido en los dos experimentos) y penúltimo entrenudo del tallo (PE, recogido en el segundo experimento).

Las hojas, bandera y penúltima, se cortaron a la altura de la lígula (Fig. 3.5a) y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para inmovilizar el metabolismo. Posteriormente, se transfirieron a sobres de aluminio convenientemente etiquetados para su identificación posterior con ayuda de una pinza congelada y se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su almacenaje. El último entrenudo del tallo se cortó en el punto de unión con la espiga y en el comienzo del nudo (Fig. 3.5b) y se fraccionó en porciones más pequeñas que se congelaron in situ en nitrógeno líquido. El penúltimo entrenudo del tallo se cortó en el inicio del siguiente nudo del tallo y se dividió en fragmentos que se congelaron con la mayor rapidez posible. Ambos entrenudos del tallo se guardaron separadamente y se manipularon de un modo similar al indicado para las hojas. Las diferentes partes de la planta se conservaron en cajas debidamente clasificadas en el ultracongelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se utilizaron en los diferentes análisis planteados en cada uno de los experimentos, bien para conocer el contenido de metabolitos del carbono y nitrógeno, alguna actividad enzimática y/o para el aislamiento de ácido ribonucleico para estudios de expresión génica como se describirá más adelante.

La excepción en la recogida de muestras tuvo lugar en el primer experimento, ya que en fases tempranas del desarrollo de las plantas se recogió la hoja más joven completamente extendida, la sexta hoja, para cada repetición, régimen hídrico y genotipo (ver apartado 3.3.1).

3.4.2.- Toma de muestras para estudiar el crecimiento del tallo principal de las plantas.

En paralelo a la recogida de muestras indicada anteriormente, con un desfase de uno o dos días, se tomaron muestras del tallo principal de otras plantas para estudiar su crecimiento. Con esa finalidad, se cortó el tallo principal de la planta y se fraccionó en espiga, hojas bandera y penúltima conjuntamente, resto de hojas, último entrenudo del tallo y resto del tallo (Fig. 3.6a). En cada una de las partes del tallo principal se determinó el peso fresco y seco, la superficie verde y el contenido porcentual de humedad (%H). El fraccionamiento fue similar en ambos experimentos, con la excepción de que la fracción tallo fue subdividida en último y penúltimo entrenudos del tallo y resto del tallo en el segundo experimento (Fig. 3.6b), y de cada una de esas partes, independientemente, se obtuvieron los parámetros mencionados.

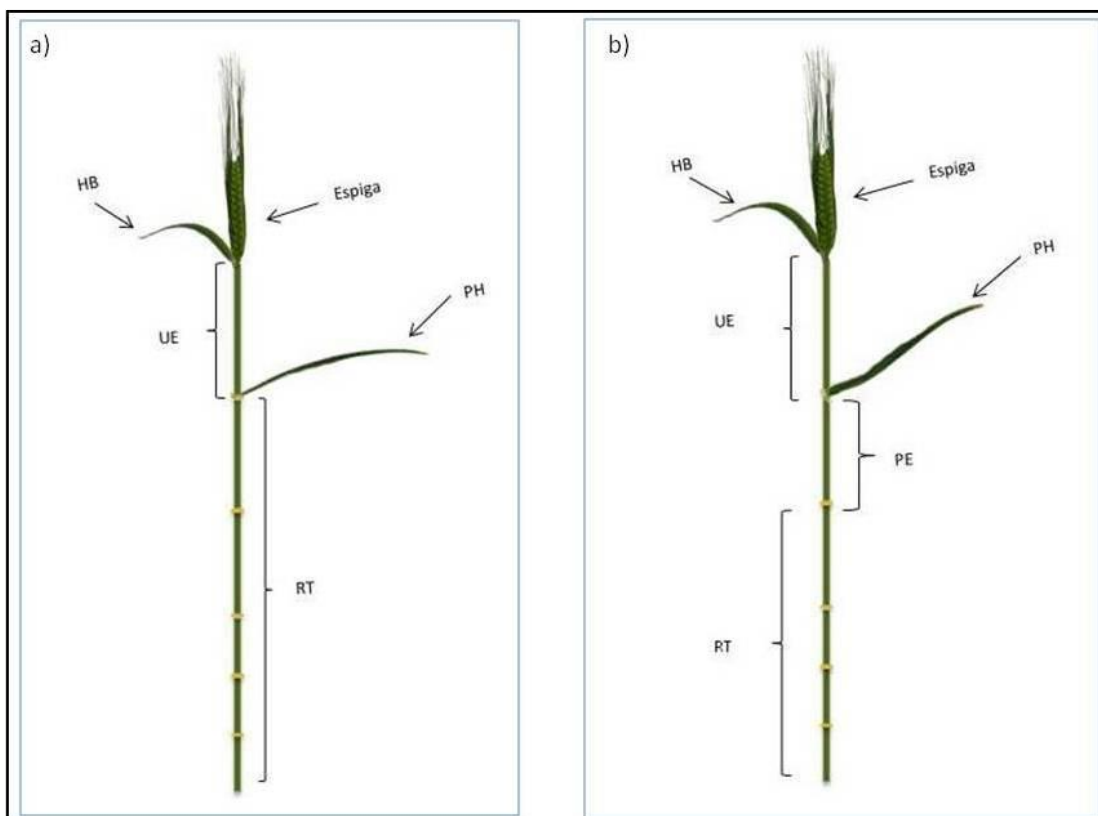


Figura 3.6. En el tallo principal, la fracción tallo se dividió en diferentes porciones en cada uno de los experimentos. **a)** En el primer experimento, las fracciones fueron: último entrenudo del tallo (UE) y resto del tallo (RT). **b)** En el segundo experimento, las fracciones fueron: último entrenudo del tallo (UE), penúltimo entrenudo del tallo (PE) y resto del tallo (RT). Se muestra también la espiga, la hoja bandera (HB) y la penúltima hoja (PH).

En cada una de las partes separadas del tallo principal, el peso fresco se obtuvo con una balanza electrónica (Precisa, modelo XT 220 A, Dietikon, Suiza). A continuación, después de quitar las porciones foliares secas, si las había, se midió la superficie proyectada con un planímetro electrónico (modelo Li-3000 A, LI-COR, Nebraska, USA) que entrega la medida en cm^2 . El peso seco se obtuvo después de secar las muestras en estufa (Vismara-Bretel) a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. La diferencia entre los pesos fresco y seco proporcionó el contenido porcentual de agua (%H) de cada parte de la planta ($(\text{peso fresco} - \text{peso seco}) \times 100 / \text{peso fresco}$). El área foliar específica (SLA, *Specific Leaf Area*) se calculó dividiendo la superficie verde de las hojas bandera y penúltima entre su peso seco (Poorter and Evans, 1998). El peso específico del último y penúltimo entrenudos del tallo y resto del tallo representa la relación entre el peso seco y su longitud (Borrell *et al.*, 1993).

3.5.- Determinación del estado hídrico de las hojas.

Para valorar el estado hídrico de las hojas se ha utilizado el contenido hídrico relativo (RWC, *relative water content*) que expresa la cantidad de agua en las hojas en función del peso turgente. El RWC se determinó en las hojas bandera y penúltima del tallo principal conjuntamente, ya que constituyen la muestra foliar representativa que se recogió para los análisis de intermediarios metabólicos con nitrógeno líquido en las condiciones de crecimiento en las cámaras climáticas. El RWC según Barrs and Weatherley (1962) se obtiene en base a la siguiente ecuación:

$$\text{RWC} = 100 * \left[\frac{\text{P}_f - \text{P}_s}{\text{P}_t - \text{P}_s} \right]$$

Donde: P_f : Peso fresco de las hojas inmediatamente después de separarlas del tallo principal de la planta. P_s : Peso seco de las hojas después de mantenerlas en estufa a 60 °C durante 48 horas. P_t : Peso turgente es el peso de las hojas cuando las células tienen hidratación máxima después de ser mantenidas a 4 °C en oscuridad durante 24 horas.

Para su determinación se ha utilizado la metodología propuesta por Teulat *et al.* (2003) con modificación de la temperatura de secado de las muestras. Las hojas del tallo principal se separaron del tallo principal e inmediatamente se obtuvo el peso fresco (P_f). A continuación, las hojas se colocaron en el interior de una bolsa Ziploc que contenía agua destilada que cubría sólo la base de las hojas, cuidadosamente se eliminó el aire contenido en su interior, y se cerró herméticamente. Para evitar la pérdida de peso por la respiración o su ganancia por fotosíntesis, las hojas se mantuvieron a 4 °C en oscuridad durante un periodo de 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, las hojas se sacaron del interior de las bolsas, se secaron cuidadosamente sobre papel para eliminar los restos de agua adheridos a la superficie y no forzar la salida del agua de los tejidos y se pesaron (P_t). Después de secar a 60 °C durante 48 horas se determinó el peso seco (P_s).

3.6.- Producción final.

Para conocer la producción final se recogieron muestras en la madurez del cultivo. Las muestras se correspondieron con una planta por repetición para cada genotipo y nivel de disponibilidad hídrica estudiado según los experimentos realizados, tres plantas para el primer experimento y cuatro para el segundo (ver detalles en el apartado 3.3).

En la madurez, se contabilizaron el número de tallos hijos y espigas por planta y se separó el tallo principal del resto de la planta. El tallo principal fue fraccionado en espiga, hojas bandera y penúltima, resto de hojas, último entrenudo del tallo y resto del tallo en el primer experimento. Del mismo modo, en el segundo experimento, las fracciones del tallo principal fueron similares, exceptuando la fracción tallo que se dividió en último y penúltimo entrenudos del tallo y resto del tallo (ver apartado 3.4.2). En el resto de la planta se separaron las espigas. Las partes en las que se dividió la planta se secaron en estufa a 60 °C durante 48 horas para eliminar la posible humedad que pudieran contener y se determinó su peso seco. La suma del peso de las partes en las que fue dividida la planta proporcionó el peso de la parte aérea de la planta o biomasa total, ya que la raíz no se recogió por la dificultad de separar las raíces de las plantas del entramado generado junto a la perlita. Las fracciones pequeñas del tallo principal se pesaron con una balanza electrónica (Precisa,

modelo XT 220 A, Dietikon, Suiza) y el resto de la parte aérea de la planta con una balanza granataria (Mettler P1210).

Se determinó el número de granos y el peso del grano por espiga y el peso por grano tanto de la espiga del tallo principal como del resto de las espigas de la planta, y la suma de ambos permitió la determinación de los parámetros indicados por planta.

3.7.- Medida de la asimilación fotosintética del carbono.

Para las medidas de fotosíntesis se utilizó un analizador de gases en el infrarrojo portátil IRGA (CIRAS-2, PP Systems, Amesbury, MA, USA) con operación diferencial y circuito de aire abierto (Fig. 3.7ab) que dispone de una cámara de asimilación en la que se coloca la hoja (Fig. 3.7c). Las medidas se realizaron en la penúltima hoja del tallo principal de las plantas de cebada, ya que la hoja bandera por su pequeño tamaño, más aún en alguno de los genotipos estudiados, no sólo no cubría las dimensiones de la cubeta de la cámara de asimilación sino que también dificultaba la colocación en su interior, con el consiguiente riesgo de que la hoja fuese separada del tallo de la planta. Por ello, la fotosíntesis se midió en 1.7 cm² de superficie de la zona central de las penúltimas hojas del tallo principal. No obstante, cuando en algún genotipo la porción de hoja no cubrió completamente el área de la cubeta de la cámara de asimilación se midió exactamente el área foliar con una regla y se anotó. Esto, permitió realizar la consiguiente corrección de la superficie en la que se realizó la medida en la hoja de cálculo CIRAS-1 Output Spreadsheet siguiendo las indicaciones de Parsons *et al.* (1998).



Figura 3.7. Imágenes del analizador de gases en el infrarrojo portátil (CIRAS-2, PP Systems, Amesbury, MA, USA) empleado en la presente investigación para realizar las medidas de la asimilación fotosintética del carbono. **a)** Imagen del equipo durante la realización de las medidas en la cámara de crecimiento, **b)** imagen del IRGA, **c)** cámara foliar que lleva adaptada el IRGA, donde se coloca la hoja para tomar las medidas.

Las medidas de intercambio gaseoso con el IRGA se llevaron a cabo en la cámara de crecimiento, entre las 2 y 6 horas después del comienzo del periodo luminoso, coincidiendo con las horas de máxima fotosíntesis. Las medidas se realizaron con dos niveles de CO₂ en la medida, 390 y 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO₂, con objeto de obtener una estimación de la fotosíntesis en las condiciones de crecimiento y de la fotosíntesis máxima potencial, respectivamente, y poder diferenciar los efectos estomáticos y no estomáticos de la sequía. Con concentraciones ambientales de CO₂ en la medida la fotosíntesis estará limitada probablemente por la Rubisco y con concentración muy elevada de CO₂ en la medida la fotosíntesis estará limitada por la utilización de las triosas fosfato o, mucho más frecuentemente, por la regeneración de la RuBP (Farquhar *et al.*, 1980; Sharkey, 1985). En las medidas se emplearon, condiciones lumínicas saturantes, con una densidad de flujo fotónico de 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, un flujo de aire de 300 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, una temperatura de 25 °C (controlada por el sistema Peltier del propio analizador) y un déficit de presión de vapor de 1.6 ± 0.23 kPa. Con este aparato se pueden obtener parámetros como la velocidad de asimilación fotosintética del CO₂ (A), la velocidad de transpiración (E), la concentración de CO₂ en los espacios intercelulares (C_i), la conductancia de los estomas (g_s) - para CO₂ y H₂O - y la temperatura de la hoja. En paralelo a las medidas de fotosíntesis se procedió a la recogida de muestras con nitrógeno líquido para los estudios bioquímicos y moleculares planteados en cada uno de los experimentos realizados (ver apartados 3.3 y 3.4).

En ambos experimentos se realizaron tres mediciones de la asimilación fotosintética del carbono en estadios avanzados del desarrollo de las plantas de cebada. En el primero de los experimentos, las medidas se realizaron en tres plantas para cada uno de los genotipos y nivel de disponibilidad hídrica estudiados, la primera el día 21 ± 2 de mayo de 2011 en el estadio correspondiente al inicio del desarrollo del grano, la segunda de las mediciones se hicieron el día 6 ± 2 de junio de 2011 en el estadio de grano lechoso tardío, y la tercera el día 21 ± 2 de junio de 2011 en el estadio de grano pastoso temprano (Tabla 3.2). En el segundo experimento, las medidas se realizaron en cinco plantas para cada uno de los genotipos y tratamientos control y déficit hídrico, la primera medida el día 26 ± 1 de septiembre de 2012 en el estadio correspondiente al inicio del desarrollo del grano, la segunda el día 3 ± 1 de octubre de 2012 en el estadio de grano lechoso medio, y la tercera el 17 ± 1 de octubre de 2012 en el estadio de grano lechoso tardío (Tabla 3.3).

3.8.- Análisis bioquímicos.

3.8.1.- Maceración y preparación del material vegetal.

Muestras foliares (hoja bandera y penúltima conjuntamente) y del tallo (último y/o penúltimo entrenudos del tallo según el experimento) se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido en las mismas condiciones de crecimiento existentes en la cámara climática (ver apartados 3.3 y 3.4), y se almacenaron en ultracongeladores a -80 °C hasta su uso en los diferentes análisis bioquímicos y moleculares asociados al desarrollo de este trabajo de investigación.

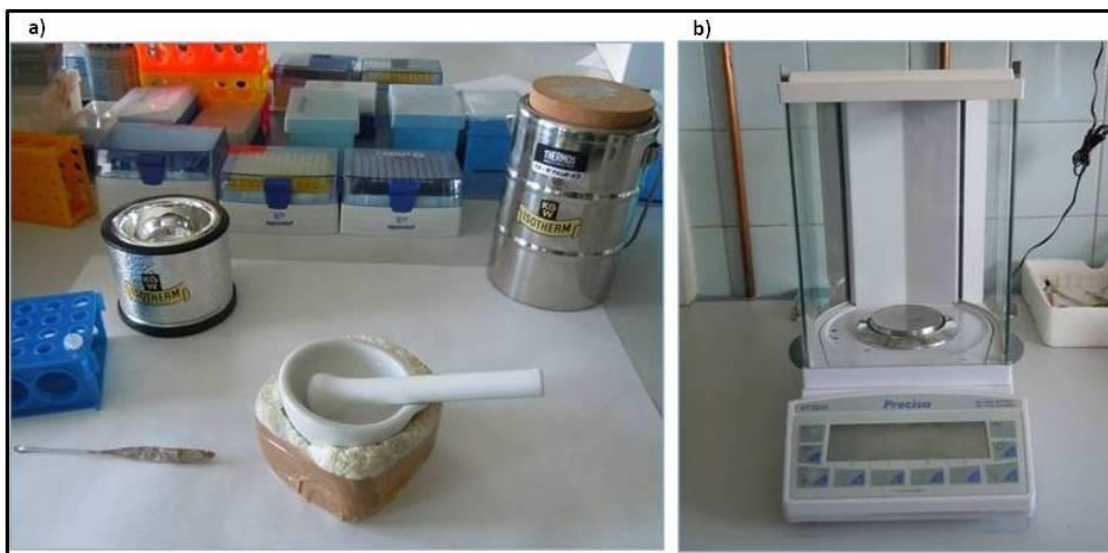


Figura 3.8. Imágenes del material utilizado para la maceración y pesada de muestras congeladas: **a)** mortero con mano y recipientes criogénicos para el almacenaje de nitrógeno líquido, **b)** balanza (Precisa, XT 220 A) para la determinación del peso del material vegetal congelado transferido a eppendorfs con espátula congelada.

Las muestras guardadas en sobres de aluminio convenientemente etiquetados se transfirieron desde el congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a recipientes criogénicos (Isotherm) que contenían nitrógeno líquido. Con ayuda de un par de pinzas congeladas se depositó el material vegetal en el interior de un mortero de porcelana, que previamente había sido congelado con nitrógeno líquido, para su maceración con una mano de mortero también congelada (Fig. 3.8a). La muestra se homogeneizó y trituró hasta conseguir un fino polvo más blanquecino que el color verdoso de la muestra inicial congelada e intacta, indicativo de una apropiada maceración del material. Alícuotas de pesos diferentes (como se detalla en la descripción de cada uno de los análisis realizados en este capítulo) se transfirieron con espátula congelada a eppendorfs de seguridad (Eppendorf Safe Lock Tubes 1.5 ml) mantenidos en nitrógeno líquido, los cuales habían sido previamente tarados en una balanza de precisión (Precisa, XT 220A) (Fig. 3.8b), y se pesaron a continuación. Esto permitió determinar exactamente el peso fresco del material vegetal que se destinó a cada uno de los análisis realizados. Los pesos obtenidos se anotaron, con la finalidad de emplearse posteriormente en la conversión de los resultados. Las alícuotas se mantuvieron en nitrógeno líquido durante su preparación, y después se colocaron y ordenaron en cajas para su conservación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

3.8.2.- Extracción de metabolitos.

La extracción etanólica de los carbohidratos solubles de las muestras foliares y del tallo se realizó según el método descrito por Morcuende *et al.* (2004). El procedimiento consistió en seis extracciones sucesivas, tres con etanol al 80% seguidas de otras tres con agua tamponada a pH 7.5, lo que facilita la extracción inicial de los azúcares de menor peso molecular y el arrastre posterior de aquellos de mayor peso molecular, particularmente los fructanos con un alto grado de polimerización.

A tal fin, alícuotas de unos 50 mg de material foliar congelado y de unos 75 mg de las muestras del último y/o penúltimo entrenudo del tallo se homogeneizaron con 700 μl de etanol al 80%

tamponado con Hepes-KOH 10 mM pH 7.5 por agitación con un vortex (Heidolph) y se incubaron en un bloque térmico (P Selecta) a 60 °C durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron a 13000 rpm en una centrifuga refrigerada (Eppendorf 5415R) a 4 °C durante 10 minutos. Los sobrenadantes se transfirieron a matraces de 5 ml, los cuales se mantuvieron en la oscuridad para evitar la degradación de las clorofilas por la luz durante las sucesivas extracciones y en refrigeración a 4 °C. Este mismo proceso se repitió otras dos veces más y los sobrenadantes de cada una de ellas se transfirieron al matraz que contenía el extracto inicial. Finalizadas las tres extracciones etanólicas, el precipitado se homogeneizó nuevamente con 700 µl de Hepes-KOH 10 mM pH 7.5 y se incubó a una temperatura superior, 80 °C, durante 30 minutos. Tras la incubación del extracto, se centrifugó en las condiciones anteriormente indicadas, se recogió el sobrenadante y se transfirió al matraz con los extractos etanólicos almacenados en la oscuridad y en frío. El proceso se repitió dos veces más y los extractos se unieron a los anteriores, enrasándose a un volumen final de 5 ml con etanol al 40% tamponado con Hepes-KOH 10 mM pH 7.5. Las muestras se homogeneizaron y se tomaron dos alícuotas en nuevos eppendorfs para las muestras foliares, una de 200 µl y otra de 800 µl. La primera para la valoración de las clorofilas (por lo que se continuó manteniendo en la oscuridad) y la segunda para su liofilización a 60 °C (Liofilizador TELSTAR, Lioalfa-6, con centrifuga Savant Speed Var® SPD 121P), mientras que el resto del extracto se transfirió a eppendorfs que fueron almacenados a -20 °C para su uso posterior en la valoración de aminoácidos. En las muestras tanto del último como del penúltimo entrenudo del tallo únicamente se tomó una alícuota de 800 µl para la liofilización del extracto y el resto del extracto se almacenó a -20 °C en eppendorfs. Por su parte, el residuo insoluble resultante de esta extracción, independientemente del tipo de material vegetal utilizado, se almacenó también a -20 °C para ser usado en la determinación de proteínas solubles y almidón como se describirá más adelante.

En el primer experimento, se realizó también la extracción de carbohidratos, según el protocolo descrito, en material vegetal cosechado en la madurez tanto de las hojas como del último entrenudo del tallo y de los granos del tallo principal. La cantidad de material vegetal utilizado fue menor al tratarse de materia seca, en el caso de los granos se emplearon unos 35 mg, y en el último entrenudo del tallo y las hojas unos 20 mg de material.

3.8.2.1.- Determinación de clorofilas.

El método empleado para la valoración de clorofilas en acetona al 80% fue el propuesto por Arnon (1949).

Se utilizó una alícuota de 200 µl del extracto etanólico-acuoso homogeneizado de las muestras foliares, que se había mantenido en oscuridad y frío durante el proceso de extracción de los carbohidratos, a la que se añadieron 800 µl de acetona al 100%. La mezcla se agitó y se mantuvo a 4 °C en oscuridad durante un periodo de 10 minutos, y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. La absorbancia del extracto se midió en un espectrofotómetro (Hewlett-Packard, 8452A Diode Array) a las longitudes de onda de 663 y 645 nm, empleándose como blanco acetona al 80%. Las clorofilas totales se obtuvieron a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Clorofila Total (mg/L)} = (8.02 * \text{Abs}_{663\text{nm}}) + (20.2 * \text{Abs}_{645\text{nm}})$$

El contenido foliar de clorofilas se expresó en miligramos de clorofila por gramo de peso fresco ($\text{mg}\cdot\text{g PF}^{-1}$). Para la obtención de los resultados se tuvieron en consideración las diluciones realizadas durante el proceso de valoración de las clorofilas, el volumen total del extracto etanólico-acuoso y el peso fresco de muestra foliar empleado en la extracción de carbohidratos.

3.8.2.2.- Determinación de carbohidratos solubles.

Los carbohidratos se midieron espectrofotométricamente por análisis enzimáticos acoplados a la oxidación-reducción de piridín nucleótidos (Stitt *et al.*, 1989).

Se ha optimizado el método enzimático de valoración de los carbohidratos con un lector de placas Synergy™ 2 (Multi-Mode Microplate Reader, BioTek) (Fig. 3.9). El nuevo método permite la lectura simultánea de hasta 96 muestras en placas de 96 pocillos transparente Microwell F96 PS (Thermo Scientific Nunc, 2310N) en un volumen final de 200 μl . Este nuevo sistema comporta un importante ahorro en consumibles, cantidad de extracto y tiempo con respecto al ensayo habitual que se venía realizando en el laboratorio con el espectrofotómetro UV visible (Hewlett-Packard, 8453). Dicho análisis se realizaba en un volumen final de 1 ml y permitía medir hasta un máximo de 8 muestras simultáneamente.

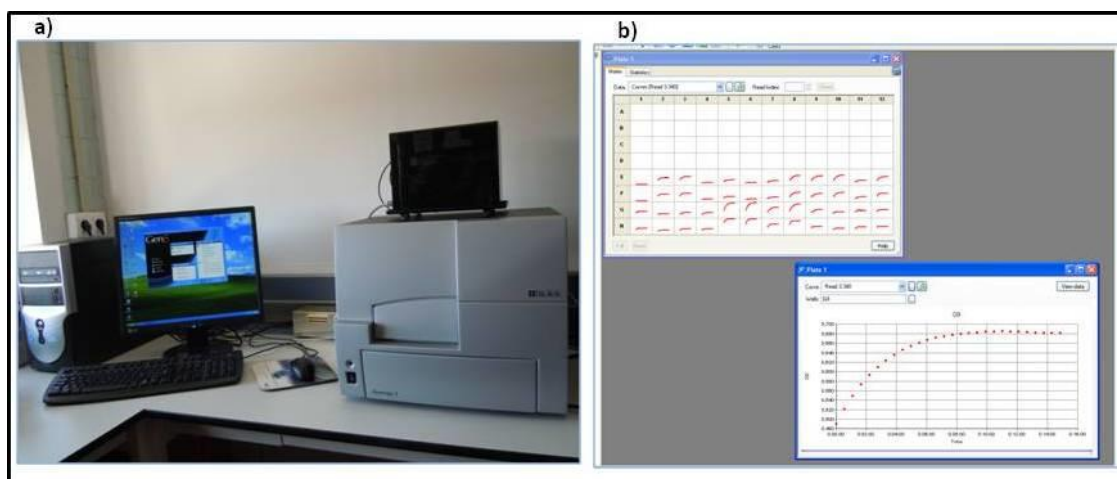


Figura 3.9. a) Lector de placas Synergy™ 2 (Multi-Mode Microplate Reader, BioTek) usado para la determinación de los carbohidratos solubles en agua y el almidón, b) monitorización de la cinética de las reacciones con el software Gen5™ Data Analysis Software (BioTek).

El Synergy™ 2 es un lector multi-detector de microplacas con un elevado nivel de sensibilidad. Dispone de un software, Gen5™ Data Analysis Software (BioTek), para el control y la recogida de datos, que permite también la programación del equipo (Fig. 3.9b). Consta de un sistema de detección en absorbancia UV visible basado en un monocromador con lámpara de Xenon Flash SQ que opera en un rango de longitudes de ondas de 200–999 nm. El equipo permite el control de temperatura y la agitación de las placas. Su elevada sensibilidad posibilita la detección de bajas concentraciones de metabolitos de manera fiable en comparación con los espectrofotómetros convencionales, lo que supone una gran ventaja para la cuantificación de metabolitos. La posibilidad de trabajar con microplacas facilita no sólo el ahorro de consumibles y de tiempo, como se ha mencionado con anterioridad, sino que permite estudiar la reproducibilidad de los datos por inclusión de réplicas técnicas, lo que incorpora un valor añadido a los análisis convencionales que se venían desarrollando en el laboratorio.

Para la validación del método de análisis de carbohidratos con el lector de placas se diseñó un protocolo que permite la monitorización de la cinética de las reacciones, es decir, la observación de los incrementos de absorbancia generados por reducción del NAD(P) a NAD(P)H a una longitud de onda en la medida de 340 nm, utilizando como referencia la longitud de onda de 400 nm. El programa Gen5™ permite seleccionar las longitudes de onda de medida y de referencia que se indican, proporciona la posibilidad de establecer el orden de colocación de muestras en los pocillos del plato (blancos, estándares y/o muestras) y el tiempo de medida, ofrece la opción de ajustar la temperatura de trabajo y de incorporar agitación del bloque para facilitar la integración de los enzimas con la muestra. En el protocolo diseñado se diferenciaron tres fases. Una primera fase que generaba la lectura de la absorbancia de los componentes de la mezcla sin enzimas. En una segunda fase, tras la adición del primero de los enzimas a cada una de las muestras analizadas, se pudo monitorizar los incrementos de absorbancia asociados a la reacción enzimática que tenía lugar. Para en una tercera etapa repetir esa misma operación después de incorporar el segundo de los enzimas necesarios para completar el análisis (ver apartado valoración de glucosa y fructosa). Para la optimización del método se empleó un kit específico de análisis de glucosa comercial (D-Glucose, Boehringer Mannheim, r-biopharm, 10716521035) con patrones de glucosa, sacarosa y kestotetraosa. A tal fin, se prepararon rectas de calibración con diferentes cantidades de glucosa, comprendidas entre 0.015–0.150 mM en el volumen final de reacción de 200 µl, desde soluciones estándares 1 mM y 0.5 mM generadas a partir de la glucosa incluida en el kit comercial de concentración 0.5 g/L. Las soluciones de glucosa 1 mM y 0.5 mM se prepararon por dilución sucesiva, y con ellas se pretendía abarcar el rango de concentraciones mencionado para la recta de calibración sin tener que incorporar más de 44 µl de estándar en el análisis (necesario por las particularidades de la valoración de algunos de los carbohidratos con el kit de glucosa). Del mismo modo, para el disacárido, la sacarosa, se prepararon rectas de calibración con cantidades de sacarosa comprendidas entre 7.5–75 µM a partir de soluciones estándares de sacarosa 0.5 y 0.25 mM (Sigma, S-2395). Y para el tetrasacárido, la 1,1-kestotetraosa, se prepararon rectas de calibración con cantidades de kestotetraosa 3.75–37.5 µM desde soluciones estándares de concentraciones 0.25 y 0.125 mM (1,1-Kestotetraose, Megazyme O-KTE). En las rectas de calibrado realizadas con los diferentes patrones, la medida de absorbancia obtenida fue proporcional a la concentración de cada uno de los carbohidratos. Las regresiones lineales fueron semejantes en los tres patrones de carbohidratos, obteniéndose un coeficiente de 3.2254. Dicho coeficiente se utilizó para la transformación de los datos de absorbancia a concentración en las muestras como se detalla a continuación.

3.8.2.2.1.- Valoración de glucosa y fructosa.

Para la valoración de los carbohidratos solubles, una alícuota de 800 µl del extracto etanólico-acuoso homogeneizado se llevó a sequedad a 60 °C con un liofilizador (TELSTAR, Lioalfa-6, con centrífuga Savant Speed Var® SPD 121P), y la muestra concentrada se resuspendió en un volumen similar de agua, se homogeneizó y centrifugó brevemente a 13000 rpm a 4 °C. En el extracto acuoso generado se pudo valorar la glucosa, fructosa, sacarosa y fructanos de la muestra. Este paso permitió eliminar el etanol de la muestra, debido a que podría interferir en la actividad de los enzimas responsables de la hidrólisis de la sacarosa y los fructanos.

La determinación de la glucosa y fructosa libres de la muestra se realizó con el kit específico de análisis de glucosa comercial antes indicado. Una alícuota del extracto acuoso, que varió en función

del genotipo, el nivel de disponibilidad hídrica y el estadio de desarrollo de la planta en cada uno de los experimentos realizados, se colocó en cada uno de los pocillos de la placa por duplicado, junto a 100 μ l del tampón suministrado en el kit comercial compuesto por NADP 3 mM, ATP 10 mM, tampón TEA 86 mM pH 7.6 y cantidades adecuadas de una sal divalente Mg_2SO_4 , completándose con agua hasta el volumen final de reacción 200 μ l. En dos de los pocillos de la placa se dispuso un blanco, en el que la cantidad de extracto fue sustituida por agua. Los componentes de la mezcla se homogeneizaron por una breve centrifugación en centrífuga de placas refrigerada (Thermo Scientific, Sorvall ST16R) a 2000 g durante 15 segundos. A continuación, la placa se colocó en el plato del Synergy™ 2, se seleccionó el protocolo de medida de carbohidratos y automáticamente comenzó la lectura de las absorbancias iniciales de las muestras. A los 5 minutos, el equipo liberó la placa y se añadieron 5 μ l de la mezcla de enzimas HK/G6PDH proporcionada en el kit comercial con ayuda de una pipeta automática Eppendorf Research Pro, que permite una rápida dispensación del enzima en los pocillos del plato. La mezcla de enzimas contenía 1 U de hexoquinasa (HK, cataliza la fosforilación de las hexosas (glucosa y fructosa) en sus correspondientes hexosas fosfato (G6P y F6P) con consumo de ATP) y 0.5 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, cataliza la oxidación de la G6P a gluconato-6-fosfato, 6Pgluconato). En esta segunda fase, se realizó la monitorización de los incrementos de absorbancia inherentes a la formación de NADPH por reducción del NADP en la reacción catalizada por la G6PDH (Fig. 3.10). El seguimiento se realizó durante 12 minutos, para asegurar que se alcanzase la linealidad de la reacción, y el incremento de absorbancia asociado al NADPH fue proporcional a la cantidad de glucosa libre de la muestra. En una tercera fase, se añadieron 5 μ l de fosfoglucoisomerasa (PGI), los cuales contenían 2.5 U de la enzima (Roche, 10127396001) que cataliza la conversión de la F6P en su isómero G6P, que a su vez se transforma en 6-Pgluconato por acción de la G6PDH presente en el medio de reacción (Fig. 3.10). En este último paso, los cambios de absorbancia asociados a la reducción del NADP a NADPH fueron proporcionales a la cantidad de fructosa libre de la muestra.

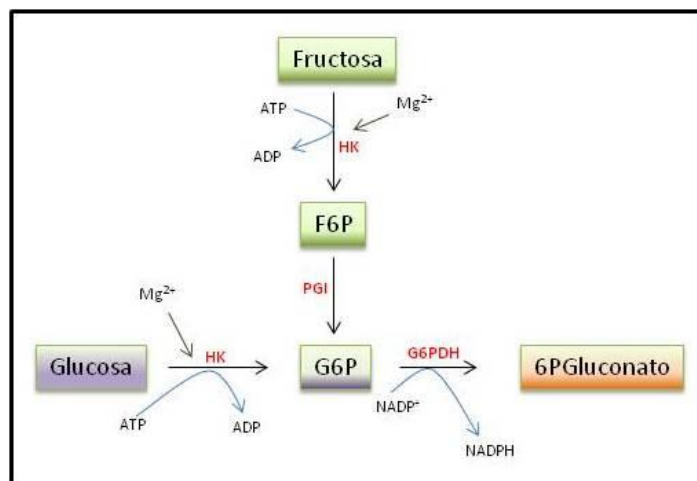


Figura 3.10. Secuencia de reacciones que tienen lugar en la valoración enzimática de la glucosa y fructosa. La hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación de la glucosa y la fructosa de la muestra, y su adición junto con la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) facilita la conversión de la G6P en 6Pgluconato, valorándose así la glucosa de la muestra. La incorporación posterior de la enzima fosfoglucoisomerasa (PGI) convierte la F6P en G6P y continúa transformándose en 6Pgluconato por la G6PDH, lo que permite valorar la fructosa de la muestra.

Puesto que se incorporaron réplicas técnicas de las muestras, para la comprobación de la reproducibilidad de datos, los resultados de ambas medidas fueron promediados, tanto de la absorbancia inicial de la muestra como de la absorbancia final de la reacción catalizada por la

HK/G6PDH y aquella mediada por la PGI. La diferencia de absorbancia del final de la reacción con la HK/G6PDH y la absorbancia inicial de la muestra se correspondió con el incremento de absorbancia de la glucosa libre de la muestra. La diferencia de absorbancia del final de la reacción con la PGI y el final de la reacción con la HK/G6PDH se asoció con el de la fructosa libre de la muestra. En el análisis se introdujo un blanco con agua, lo que permitió conocer los cambios de absorbancia asociados a la simple adición de los enzimas durante el ensayo, éstos incrementos de absorbancia fueron convenientemente sustraídos a los correspondientes a la glucosa y la fructosa de la muestra. Finalmente, los datos de absorbancia fueron transformados a concentración, para lo que se tuvo en consideración el resultado de la recta de calibrado antes indicado, la cantidad de extracto en el análisis, el volumen total de extracción y la cantidad de material vegetal de partida, lo que permitió expresar los resultados en micromoles de hexosa por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$).

Conviene mencionar que los enzimas comerciales, por razones de estabilidad, se encuentran en suspensión en sulfato amónico 3.5 M, solución que debe ser eliminada inmediatamente antes de la realización de los ensayos enzimáticos. Con este objeto, una alícuota de los enzimas en suspensión se transfirió a un eppendorf y se centrifugó a 13000 rpm durante al menos dos minutos, descartándose el sobrenadante, mientras que el precipitado fue resuspendido en el tampón proporcionado por el kit comercial de análisis de glucosa.

3.8.2.2.2.- Valoración de sacarosa.

La determinación de la sacarosa se realizó por hidrólisis previa del disacárido en sus correspondientes monosacáridos, glucosa y fructosa, en la reacción catalizada por el enzima sacarasa (Sucrase (Maltase from yeast), Megazyme E-SUCR), que hidroliza de manera rápida y específica la sacarosa (McCleary and Blakeney, 1999).

Para la realización de los análisis por duplicado, una alícuota del extracto acuoso generado para la valoración de carbohidratos (ver apartado 3.8.2.2.1) se colocó en cada uno de los pocillos de la placa junto a 10 μl de una mezcla de enzima, que contenía 4 μl de tampón maleato sódico 100 mM pH 6.5 y 6 μl de sacarasa, que se correspondían con 8 U del enzima. A continuación, se añadió agua hasta alcanzar un volumen final de 54 μl (en cantidad variable dependiendo de la cantidad de extracto usado en el análisis). Paralelamente, en dos de los pocillos de la placa se prepararon blancos, para el control de la adición de los enzimas, que contenían 44 μl de agua y 10 μl de la mezcla de enzima. La placa se centrifugó en una centrífuga para placas a 2000 g durante 15 segundos, lo que permitió la homogeneización de los componentes de la mezcla, y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para evitar la evaporación y concentración de los componentes de la mezcla durante la hidrólisis de la sacarosa, la placa se cubrió con papel de aluminio adhesivo (Scotch® Brand Tape, Core series 591). Al término de la incubación, se quitó cuidadosamente el papel adhesivo y se añadieron 100 μl del tampón suministrado en el kit comercial de valoración de glucosa y la cantidad de agua necesaria para ajustar el volumen de reacción final en el análisis a 200 μl . Finalmente, se procedió a la lectura de la absorbancia inicial de las muestras y se continuó con la valoración enzimática de la glucosa y la fructosa generadas por la hidrólisis de sacarosa después de la adición secuencial de la HK/G6PDH y PGI, siguiendo el protocolo descrito para la determinación de la glucosa y fructosa libres de la muestra.

A las concentraciones de glucosa y fructosa obtenidas en éste análisis se restó las correspondientes a la glucosa y fructosa libres de la muestra, para conseguir los datos reales de glucosa y fructosa procedentes de la hidrólisis de sacarosa. Los resultados del contenido de sacarosa se refirieron a la glucosa de este modo obtenida y se expresaron en micromoles por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$).

3.8.2.2.3.- Valoración de fructanos.

Los fructanos de las muestras se determinaron por hidrólisis previa en glucosa y fructosa mediada por fructanasas altamente purificadas (Fructanase Mixture Purified-Liquid, Megazyme E-FRMXLQ) y posterior valoración de las hexosas generadas por el método habitual.

Para la realización del análisis, una alícuota del extracto acuoso generado para la valoración de carbohidratos se colocó en cada uno de los pocillos de la placa por duplicado junto a 4 μl de una mezcla de enzima, que contenía 2 μl de tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5 y 2 μl de fructanasa, que se correspondían con 2 U de dicho enzima. Después se añadió la cantidad de agua necesaria para alcanzar un volumen final de 54 μl . Paralelamente, en dos de los pocillos de la placa se prepararon blancos para el control de la adición de los enzimas, los cuales contenían 50 μl de agua y 4 μl de la mezcla de enzima. La placa se centrifugó a 2000 g en una centrífuga para placas durante 15 segundos, para facilitar la homogeneización de los componentes de la mezcla, se cubrió con papel de aluminio adhesivo (Scotch® Brand Tape, Core series 591) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Al término de la incubación, se añadieron 100 μl del tampón suministrado en el kit comercial de valoración de glucosa y la cantidad de agua necesaria para ajustar el volumen de reacción final en el análisis a 200 μl . Finalmente, la glucosa y fructosa generadas por hidrólisis de los fructanos fueron valoradas enzimáticamente según el protocolo descrito.

A las concentraciones de glucosa y fructosa obtenidas en éste análisis se restó la glucosa y fructosa reales de la valoración de la sacarosa (ya que previamente se había sustraído la glucosa y fructosa libres de la muestra). De este modo, se obtuvieron las concentraciones exactas de glucosa y fructosa generadas por hidrólisis de los fructanos presentes en la muestra. Los datos de concentración de fructanos se refirieron a la suma de la glucosa y fructosa así obtenida y se expresaron en micromoles de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$).

Los carbohidratos solubles totales de las muestras foliares o de los tallos se obtuvieron sumando los contenidos de la glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos.

3.8.2.3.- Extracción de proteínas.

En el residuo insoluble procedente de las extracciones etanólico-acuosas, que fueron almacenados a -20 °C hasta su uso, se determinaron las proteínas solubles y el almidón según el método propuesto por Hendriks *et al.* (2003).

El precipitado de dicha extracción se resuspendió con 900 μl de NaOH 100 mM por agitación vigorosa con un vortex y se calentó en un bloque térmico a 95 °C durante 30 minutos. Transcurrido el

tiempo de incubación, se dejó enfriar a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos y, una vez atemperado, se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos. Las proteínas se valoraron en el sobrenadante según el método de Bradford.

3.8.2.3.1.- Valoración de proteínas solubles.

El método de Bradford para la valoración de proteínas es un método colorimétrico que emplea un colorante hidrofóbico, cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo, que al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína origina un color azul intenso que puede medirse fácilmente a 595 nm (Bradford, 1976). Está basado en el cambio de color de rojo a azul del azul brillante de Coomassie G-250 cuando se encuentra en presencia de una proteína.

Las proteínas solubles de las muestras se valoraron en una alícuota de entre 5–30 μ l del sobrenadante obtenido según el protocolo indicado en el apartado anterior con el reactivo Bradford comercial (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad 500-0006). La cantidad de extracto empleado varió según el material vegetal, el genotipo, el régimen hídrico y/o la fase de desarrollo de la planta.

Para la determinación del contenido proteico de las muestras se realizó una curva de calibrado con seroalbúmina bovina (Sigma, A7030) a partir de una solución estándar de concentración 1 mg/ml diluida en NaOH 100 mM. Tanto para la preparación de la recta patrón como para la valoración de las muestras, se colocaron en tubos de vidrio las diferentes cantidades de seroalbúmina bovina y/o alícuotas de las muestras, a las que se añadió 3.240 ml del reactivo Bradford diluido cinco veces. Siguiendo las indicaciones del fabricante, la mezcla se homogeneizó con un vortex y se dejó desarrollar el color durante al menos 5 minutos. Las lecturas de absorbancia se midieron a una longitud de onda de 595 nm con un espectrofotómetro UV Visible (Hewlett-Packard, 8452A Diode Array) con cubetas desechables UV macro 4.5 ml (PS) (BRAND, 9406110). Las absorbancias según la concentración de albúmina se ajustaron a una curva de regresión de segundo grado, a partir de la cual fácilmente pudieron referirse los datos de absorbancia de las muestras, expresándose en miligramos de proteína por gramo de peso fresco ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

3.8.2.4.- Extracción y valoración de almidón.

El almidón se analizó en el residuo insoluble de la extracción etanólica-acuosa del material vegetal según el método propuesto por Hendriks *et al.* (2003). Para ello, el precipitado se volvió a resuspender en la solución que contiene NaOH 100 mM (ver apartado 3.8.2.3) por agitación con un vortex y se acidificó con 180 μ l de una mezcla que contenía HCl 0.5 M y CH_3COONa 100 mM pH 4.9. Posteriormente, una alícuota de 120 μ l de la suspensión generada se transfirió a un nuevo eppendorf, al que se incorporaron 180 μ l de una mezcla para la digestión del almidón que contenía 75 U de amiloglucosidasa (Roche, 1202332) y 100 U de α -amilasa (Roche, 102814) en 25 ml de NaCH_3CO_2 76 mM pH 4.9 (Ap Rees *et al.*, 1977). La mezcla se homogeneizó y se incubó a 37 $^\circ\text{C}$ en un bloque térmico (P Selecta) durante la noche (al menos 16 horas). Transcurrido el periodo de

incubación, las muestras se centrifugaron y en el sobrenadante se valoró la glucosa generada por hidrólisis del almidón.

Para el análisis de la glucosa se transfirió una alícuota del sobrenadante a una placa de 96 pocillos por duplicado, y se añadieron 100 μl del tampón suministrado en el kit comercial de valoración de glucosa y la cantidad de agua necesaria para ajustar el volumen de reacción final en el análisis. Paralelamente, en dos de los pocillos de la placa, se prepararon blancos, en los que la cantidad de extracto utilizado en el análisis se sustituyó por agua. Una vez dispensados todos los componentes de la reacción en los pocillos de la placa, se homogeneizaron por centrifugación a 2000 g en una centrífuga para placas durante 15 segundos. A continuación, se procedió a la valoración de la glucosa por adición de los enzimas HK/G6PDH en el lector de placas. De manera que el incremento de absorbancia asociado a la glucosa fue proporcional a la cantidad de almidón presente en las muestras.

En la conversión de los resultados de absorbancia a concentración, para la estimación del volumen total de extracción del almidón, se sustrajo a los 900 μl de NaOH 100 mM en los que se resuspendió el precipitado de la extracción etanólica-acuosa la cantidad utilizada en la valoración de las proteínas de la muestra, se tuvo en consideración el volumen de extracto utilizado para la hidrólisis del almidón en medio ácido y el que se empleó en la valoración de la glucosa, lo que permitió expresar los resultados en micromoles por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$).

3.8.2.5.- Determinación de aminoácidos.

Para la determinación de los aminoácidos totales se utilizó el método de la ninhidrina (Hare, 1977). Se fundamenta en la reacción de la ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) con los aminoácidos a temperaturas elevadas, en la que se forman amoniaco y anhídrido carbónico por reducción de la ninhidrina a hidrindantina. Compuesto que reacciona nuevamente con el amoniaco y otra molécula de ninhidrina y genera un compuesto de coloración azul-púrpura, denominado púrpura de Rutherford. Este cromóforo tiene su máxima absorción a 570 nm. El reactivo de ninhidrina debe prepararse en fresco, mezclando las siguientes soluciones: 50 mg de Cd (CH_3CO_2)₂ en 1 ml de acético glacial y 5 ml de agua, junto a la ninhidrina 0.1% (p/v) en acético glacial (50 ml).

La valoración del contenido de aminoácidos en las muestras foliares y del último entrenado del tallo del primer experimento se realizó en una alícuota del extracto etanólico-acuoso almacenado a -20 °C (ver apartado 3.8.2). Para ello, uno de los eppendorfs de los extractos etanólico-acuosos almacenados a -20 °C se puso en hielo unos 5 minutos y se homogeneizó vigorosamente con el vortex, centrifugándose con posterioridad a 13000 rpm en una centrífuga refrigerada (Eppendorf 5415R) a 4 °C durante 2 minutos. A continuación, una alícuota del extracto se transfirió a un eppendorf de seguridad (Eppendorf Safe Lock Tubes 1.5 ml) junto a 500 μl de reactivo de ninhidrina y se añadió agua hasta completar un volumen final de 1 ml. La mezcla se homogeneizó por agitación e incubó en un bloque térmico a 70 °C durante 10 minutos. Después de dejar enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos, se procedió a la lectura de absorbancias a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro (Hewlett-Packard, 8452A Diode Array), frente a un blanco con ninhidrina y agua. En paralelo a la medida de las muestras se preparó una recta de calibración con diferentes cantidades de glutamina (Sigma, G3126) a partir de una solución estándar de glutamina 1 mM, siguiendo el mismo protocolo descrito. La medida de absorbancia obtenida fue proporcional a

la concentración de dicho aminoácido, lo que permitió la transformación de los resultados como $\mu\text{mol}\cdot\text{g PF}^{-1}$.

3.8.2.6.- Análisis del grado de polimerización de los fructanos.

La detección amperométrica de pulsos combinada con la cromatografía de intercambio aniónico de alta presión proporciona un método sensible y selectivo para la determinación de azúcares simples y carbohidratos más complejos (Corradini *et al.*, 2012). Los fructanos son polímeros lineales o ramificados de fructosa con diferente grado de polimerización (DP, *degree of polimerization*) derivados de la sacarosa. En cereales predominan los fructanos complejos del tipo gramíneas que contienen unidades de fructosa con uniones $\beta(2-6)$ y ramificaciones $\beta(2-1)$, la estimación del grado de polimerización de este tipo de fructanos no está exenta de dificultad por la carencia de patrones comerciales disponibles que puedan ser utilizados para la cuantificación como se detalla más adelante.

En nuestro laboratorio no se dispone del equipo de cromatografía de intercambio aniónico de alta presión (High Performance Anion Exchange Chromatography, HPAEC) (Fig. 3.11), por lo que estos análisis se realizaron en el laboratorio del Dr. Arnd Heyer (Departamento de Biotecnología de Plantas de la Universidad de Stuttgart, Alemania) durante una estancia investigadora de corta duración financiada por el programa de ayudas para estancias de investigación en Instituciones Extranjeras JAE predoctoral del CSIC.



Figura 3.11. Equipo Dionex DX-500 de cromatografía de intercambio aniónico acoplado con un detector amperométrico de pulsos (HPAEC-PAD) del departamento de Biotecnología de Plantas de la Universidad de Stuttgart (Alemania) en el que se realizaron los análisis.

Los análisis se realizaron en alícuotas de 1 ml del extracto etanólico-acuoso procedente de las muestras foliares y del último entrenudo del tallo del primer experimento, las cuales se llevaron a sequedad en frío con un concentrador Speed Vac y se resuspendieron nuevamente en 500 μl de agua ultrapura. Las muestras resuspendidas se agitaron durante 30 minutos en un agitador automático y se calentaron en un bloque térmico a 80 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos, centrifugándose con posterioridad a

máxima velocidad unos 10 minutos. Una alícuota del extracto se utilizó para la separación de los carbohidratos a través de una columna CarboPac PA 100 para cromatografía de intercambio aniónico de alta presión (HPAEC) usando un sistema de cromatografía de gradiente Dionex DX-500 acoplado con un detector amperométrico de pulsos (PAD) equipado con un electrodo de oro (Zuther *et al.*, 2011) como se detalla a continuación.

El protocolo consistió en transferir alícuotas de 55 μl de los extractos a viales que contenían 55 μl de agua ultrapura, las cuales se homogeneizaron y depositaron en el autosampler del equipo. Inicialmente se colocaron estándares de concentraciones 5 μM , 50 μM y 100 μM (ver detalles más abajo) y a continuación 24 muestras, intercalándose nuevamente patrones de las concentraciones indicadas. El proceso de separación cromatográfica de los azúcares se inició con la inyección automática de un volumen de muestra de 25 μl a través de una columna de intercambio aniónico fuerte (CarboPac PA 100) que permite la separación de oligosacáridos y polisacáridos con un alto grado de polimerización al usar fases móviles alcalinas. La separación de los azúcares se realizó con un gradiente de acetato sódico con una concentración constante de hidróxido sódico (Tabla 3.4) a una velocidad de flujo de 1 ml por minuto durante un periodo de 40 minutos, puesto que se requiere un ambiente fuertemente básico para su detección.

Para la cuantificación de los carbohidratos se emplearon estándares que incluían los fructanos comerciales disponibles - la 1-kestosa (Megazyme, O-KTR), la 1,1-Kestotetraosa (Megazyme, O-KTE) y la 1,1,1-Kestopentaosa (Megazyme, O-KPE) - además de la glucosa, fructosa, sacarosa y rafinosa en un rango de concentraciones de 5 μM , 50 μM y 100 μM .

Tabla 3.4. Gradiente de soluciones programado en el HPAEC-PAD para el análisis del grado de polimerización de los fructanos a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

Tiempo (min)	% Sol. A 1M NaOH	% Sol. B H ₂ O	% Sol. C 1M NaAC
0	15	85	0.0
5	15	85	0.0
25	15	35	50
30	15	0.0	85
35	15	0.0	85
36	15	85	0.0
40	15	85	0.0

El principal factor limitante de esta técnica se relaciona con la carencia de estándares comerciales de elevado peso molecular, lo que dificulta la identificación de los picos de los cromatogramas (Fig. 3.12a). Por ello, la asignación de picos se basa a menudo en la suposición de que el tiempo de retención de las series homólogas de carbohidratos aumenta cuando lo hace el grado de polimerización, lo que significa que cada pico separado representa una cadena con una unidad más que el pico anterior. Esto, sin lugar a dudas, supone una limitación en la cuantificación de los fructanos en sus diferentes grados de polimerización. Para solventarlo, se realizaron agrupaciones o *clusters* que permitieron la integración de las áreas de cada uno de los picos que componen esa agrupación. Para la cuantificación se sumaron las áreas de los picos, y cada pico correspondía a nanoculombios por minuto (Area nC·min) (Fig. 3.12b). Se crearon tres agrupaciones, una primera, que incluía los fructanos de bajo grado de polimerización y comprendía los picos desde la kestose, DP4, DP5 y sus isoformas (Kestose+14+15+18+DP4+20+22+23+DP5+25+26+27). Una segunda, que aglutinaba a los fructanos de grado de polimerización medio (28+DP6+DP7+DP8+DP9+DP10). Y la tercera agrupación integraba a los fructanos de alto grado de polimerización

(DP11+DP12+DP13+DP14+DP15+DP16). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias, ya que el coulombio se define como la cantidad de carga transportada en un segundo por una corriente de un amperio de intensidad de corriente eléctrica y corresponde a una cantidad de electricidad (carga eléctrica).

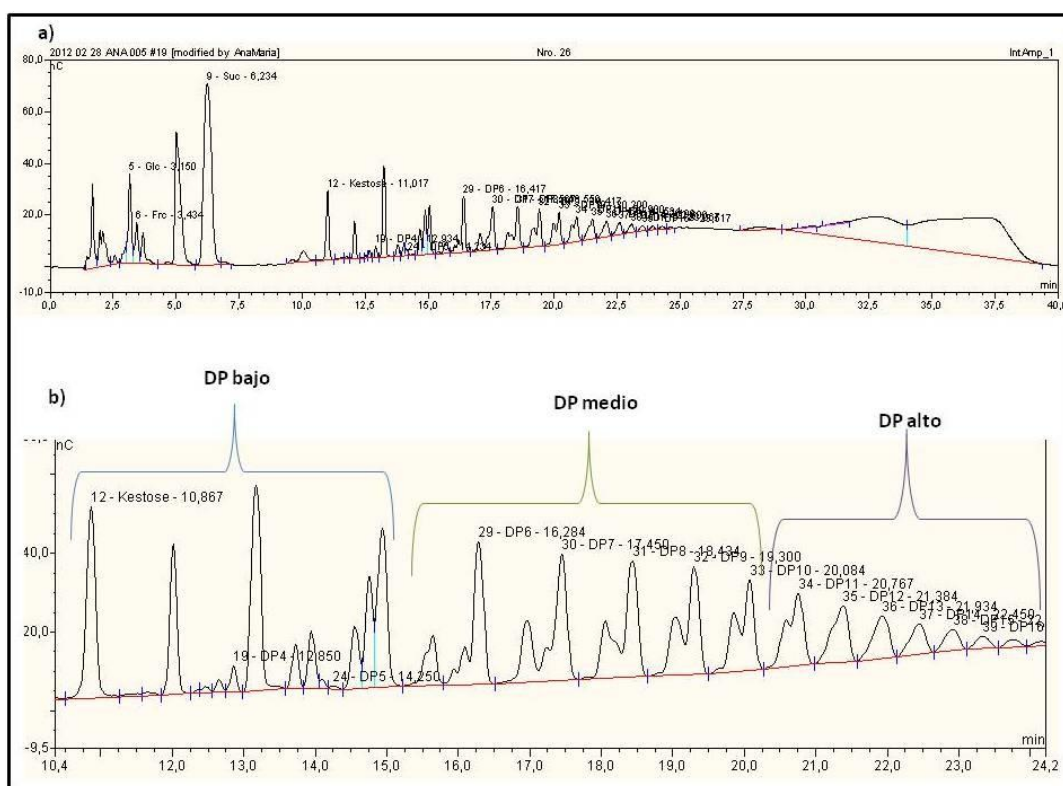


Figura 3.12. a) Perfil cromatográfico obtenido en una de las muestras, columna CarboPac PA 100, b) agrupaciones realizadas para la determinación del grado de polimerización (DP) de los fructanos, que permite su clasificación en un grado de polimerización bajo (DP bajo), medio (DP medio) y alto (DP alto).

3.8.3.- Ensayo in vitro de la actividad nitrato reductasa.

La valoración de la actividad nitrato reductasa se realizó según el método propuesto por Mackintosh (1992) y las adaptaciones introducidas por Scheible *et al.* (1997b). El método se fundamenta en la valoración del nitrito generado por reducción del nitrato en la reacción catalizada por el enzima. Las actividades máxima (enzima desfosforilada) y selectiva (enzima fosforilada) de la NR se midieron, respectivamente, en ausencia y en presencia de cationes divalentes Mg^{2+} (Scheible *et al.*, 1997b), con EDTA 5 mM o $(CH_3COO)_2Mg$ 10 mM en el tampón de ensayo (Huber and Huber, 1992; Scheible *et al.*, 1997b). El estado de activación de la nitrato reductasa se expresó como porcentaje de la actividad en presencia de Mg^{+2} 10 mM dividido por la actividad en presencia de EDTA 5 mM (Mackintosh *et al.*, 1995).

La determinación de la actividad NR se realizó en muestras foliares congeladas y almacenadas a -80 °C del segundo de los experimentos realizados. Una alícuota de unos 120 mg del material vegetal congelado y pulverizado se transfirió a un eppendorf y se homogeneizó con cuatro volúmenes (p/v) de tampón de extracción enfriado en hielo compuesto por HEPES-KOH 100 mM pH 7.5, $(CH_3COO)_2Mg$ 5 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v), DTT 5 mM, BSA 1% (p/v), Triton X-100 0.1% (v/v), PMSF 0.5 mM, FAD 20 μ M, leupeptina 25 μ M, Na_2MoO_4 5 μ M, PVPP 1% (p/v). En el extracto homogeneizado las actividades máxima y selectiva de la nitrato reductasa se valoraron inmediatamente, mezclando

un volumen de dicho extracto con cinco volúmenes de un tampón de ensayo precalentado a 30 °C en un bloque térmico (Eppendorf Thermomixer Compact), constituido por Hepes-KOH 100 mM pH 7.5, KNO₃ 5 mM, EDTA 5 mM, leupeptina 15 μM, FAD 10 μM, NADH 0.5 mM, DTT 0.25 mM y Na₂MoO₄ 5 μM para la valoración de la actividad nitrato reductasa máxima; o bien en el tampón de ensayo Hepes-KOH 100 mM pH=7.5, KNO₃ 5 mM, (CH₃COO)₂Mg 10 mM, leupeptina 15 μM, FAD 10 μM, NADH 0.5 mM, DTT 0.25 mM y Na₂MoO₄ 5 μM para la valoración de la actividad nitrato reductasa selectiva. Ambas reacciones se realizaron en paralelo, con desfases de 30 segundos para computar exactamente los tiempos, de manera que una vez que el extracto se incorporó al tampón de ensayo, se homogeneizó rápidamente con el vortex y se colocó de nuevo en el bloque térmico para su incubación a 30 °C. A diferentes tiempos, con intervalos de 2 minutos cada uno, se recogió una alícuota de 300 μl de la mezcla de ensayo y se transfirió a un nuevo eppendorf con 25 μl de (CH₃COO)₂Zn 0.6 M para paralizar la reacción. Este paso permitió la formación de complejos del Zn⁺² con los grupos SH de las cisteínas de las proteínas, generando un cambio en la conformación de las proteínas, que facilitó su agregación y precipitación final. En paralelo a las valoraciones de actividad máxima y selectiva, se realizaron controles (en el momento de comenzar la reacción), en presencia o ausencia de 10 nmoles de nitrito, incorporándose también acetato de zinc con anterioridad al extracto.

A cada una de las alícuotas obtenidas a diferentes tiempos, tanto en los análisis de actividad máxima y selectiva como en los controles de tiempo cero, se añadieron 75 μl de metosulfato de fenazina (PMS) 250 μM, se homogeneizó la mezcla e incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 minutos. De este modo se facilitó la oxidación del NADH que pudiera quedar en exceso, lo que a su vez evitaría posibles interferencias en la determinación de nitrito (Scholl *et al.*, 1974). A continuación, se añadieron 300 μl de sulfanilamida 1% (p/v) en HCl 3N junto a idéntica cantidad de N-naftiletildiamina (NNEDA) 0.02% (p/v) en agua (Beevers and Hageman, 1980) y se agitó la mezcla, manteniéndose a temperatura ambiente durante 20 minutos para asegurar la interacción del diazo-compuesto, generado por reacción de la sulfanilamida con el nitrito, con una amina aromática del NNEDA que origina un compuesto coloreado cuyo máximo de absorción se presenta a 540 nm (Fig. 3.13). Finalmente, en el sobrenadante obtenido por centrifugación de la muestra a 13000 rpm durante 5 minutos se valoró dicho compuesto espectrofotométricamente (Hewlett-Packard, 8452A Diode Array) a la longitud de onda antes indicada. En ambos ensayos de actividad NR, el seguimiento de la reacción se realizó durante 6 minutos a intervalos de 2 minutos cada uno, generándose seis análisis, que junto a los dos controles de tiempo cero hicieron un total de ocho análisis por muestra.

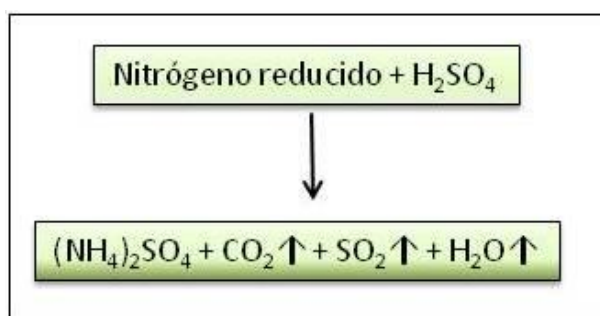
La diferencia en absorbancia entre los controles de tiempo cero, con o sin nitrito añadido, se estableció como el equivalente a 10 nmoles de nitrito para calcular la actividad nitrato reductasa de las muestras. Además, se tuvo en consideración el peso fresco de muestra empleado en el ensayo de actividad enzimática y el tiempo de reacción, lo que permitió expresar los resultados finales como micromoles de nitrito por gramo de peso fresco y por hora (μmol NO₂⁻·g PF⁻¹·h⁻¹). Es destacable mencionar que se realizaron seguimientos de linealidad del ensayo con el tiempo y de proporcionalidad de la actividad nitrato reductasa con la cantidad de extracto incluida en el análisis.



Figura 3.13. Compuesto coloreado generado por reacción del diazo-compuesto, resultante de la reacción de la sulfanilamida con el nitrito, con una amina aromática del NNEDA.

3.8.4.- Determinación de nitrógeno total.

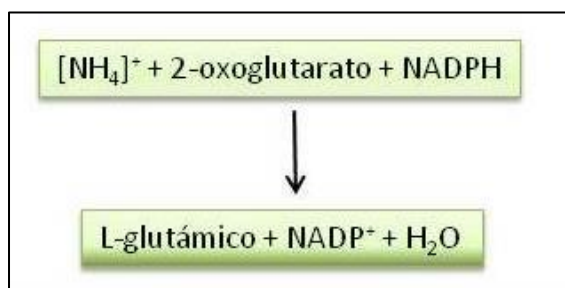
El nitrógeno total de los granos y del último entrenudo del tallo del primero de los experimentos realizados se determinó por el método Kjeldahl, que es ampliamente utilizado por su elevada reproducibilidad y precisión (Horneck and Miller, 1998). Este método fue desarrollado por Kjeldahl (1883) y consiste en calentar la muestra con ácido sulfúrico (H_2SO_4), lo que genera la oxidación del nitrógeno orgánico reducido, convirtiéndose en sulfato amónico ($(NH_4)_2SO_4$), que posteriormente se disocia en medio básico dando el ión amonio $[NH_4]^+$, el cual puede cuantificarse por diversos métodos (Horneck and Miller, 1998). El método Kjeldahl permite estimar todas las formas del nitrógeno presentes en la planta, excepto nitratos y nitritos (Horneck and Miller, 1998).



Para la determinación del nitrógeno total de los granos y del último entrenudo del tallo, éstos se secaron y pesaron, y después se molieron y homogeneizaron en un molinillo Moulinex (AR100G31). Justo antes de realizar el análisis de nitrógeno, las muestras pulverizadas se colocaron nuevamente en la estufa a 60 °C durante 3 horas, para retirar la humedad, se dejaron atemperar en un desecador a temperatura ambiente, y después se tomaron alícuotas de unos 100 mg de muestra para los granos y de unos 50 mg para el último entrenudo del tallo en tubos de vidrio para ataque Kjeldahl de 200 mm de longitud y 20 mm de diámetro (Afora, 613/20). El protocolo utilizado fue el mismo en los dos tipos de muestras vegetales analizadas, la única diferencia fue que en el caso del último entrenudo del tallo las cantidades se redujeron a la mitad, ya que el material de partida fue también la mitad del empleado para la valoración del nitrógeno en los granos.

Para la digestión de las muestras se emplearon 4 ml de H₂SO₄ al 96 % (Panreac, 131058.1611) y 0.3 g de una mezcla con selenio y sulfato de cobre (CuSO₄) como catalizadores, junto con sulfato potásico (K₂SO₄) para elevar el punto de fusión del H₂SO₄, productos que se añadieron a los tubos de ataque que contenían las muestras. A continuación, se colocaron en un bloque de ataque que permite el establecimiento de un gradiente de temperatura en unas 3.5 h, con una temperatura de 150 °C durante la primera hora, 250 °C la segunda y 350 °C la tercera hora para descender posteriormente hasta 200 °C, momento en el que los tubos se sacaron del bloque y se dejaron a temperatura ambiente. Después de añadir 20 ml de agua destilada para diluir el ácido, se llevaron hasta 50 ml en matraces aforados y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

La cuantificación del ión [NH₄]⁺ se realizó espectrofotométricamente por medio de un método enzimático específico (Ammonia Rapid Kit, Megazyme K-AMIAR) basado en la conversión de 2-oxoglutarato y amonio en ácido L-glutámico, catalizada por la enzima glutamato deshidrogenada con el gasto de un mol de NADPH por cada mol de [NH₄]⁺.



El análisis se realizó con un espectrofotómetro UV visible (Hewlett-Packard, 8453) tomando una alícuota de 500 µl. La alícuota tuvo que diluirse hasta tener de 0.2 a 7 µg de [NH₄]⁺ en la cubeta, para que el análisis se comportase de forma lineal según la Ley de Beer-Lambert (Bergmeyer and Beutler, 1990), y también hubo que elevar ligeramente su pH hasta 3–4, para que la reacción enzimática no fuese muy lenta. Para ello se empleó un tampón de trietanolamina 1M pH 7.2 y una solución de KOH 5 M, usando volúmenes variables de cada solución y ajustando el volumen final, debido a la diferente acidez de las muestras. Antes del ensayo en cubeta se centrifugaron a 12000 g durante 2 minutos. Con el espectrofotómetro se midió el descenso de la absorbancia del NADPH a 340 nm, ya que la forma oxidada NADP⁺ no absorbe en esa longitud de onda, que tiene un coeficiente de extinción molar de 6.22 mM⁻¹ cm⁻¹. Este descenso será equivalente a los moles de [NH₄]⁺, ya que la estequiometría entre oxidación de NADPH y aminación del 2-oxoglutarato es 1:1.

El contenido de nitrógeno del grano y del último entrenudo del tallo pudo estimarse con este análisis, y para la transformación de los resultados se tuvo en consideración el peso seco, lo que permitió expresar los resultados en mg·g PS⁻¹. El contenido en proteínas del grano se estimó empleando el factor de conversión del contenido en nitrógeno total (Nx5.7) como describen Martín Del Molino *et al.* (1988) y Beltrano *et al.* (2006).

3.9.- Análisis moleculares.

3.9.1.- Aislamiento del ácido ribonucleico.

El ácido ribonucleico (ARN) se aisló en material vegetal de las hojas y el último entrenudo del tallo de los cuatro genotipos de cebada para cada uno de los tratamientos de disponibilidad hídrica estudiados en el segundo de los experimentos realizados y en las fases de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano y estadio de grano lechoso tardío, respectivamente. El aislamiento de ARN se realizó según el método descrito por Morcuende *et al.* (1998), fundamentado en aquellos propuestos por Logemann *et al.* (1987) y Sambrook *et al.* (1989).

Unos 100 mg de material vegetal pulverizado y congelado se transfirieron a un eppendorf de seguridad estéril y se homogeneizaron con 450 μ l de tampón guanidina que contenía EDTA 20 mM, MES 20 mM y guanidina 6 M pH 7 al que justo antes de su uso se había añadido β -mercaptoetanol a una concentración final en la solución de 50 mM. Tras la homogenización inicial, se añadió un volumen similar de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (Sigma, P3803) en proporción (25:24:1). La mezcla se agitó vigorosamente y se mantuvo en hielo hasta su centrifugación a 4 $^{\circ}$ C en una centrífuga refrigerada para eppendorfs (Eppendorf 5415R) a 13000 rpm durante 15 minutos y, tras la separación de fases (Fig. 3.14), el sobrenadante se recogió y transfirió a un nuevo eppendorf estéril. A continuación, se precipitaron los ácidos nucleicos a temperatura ambiente durante unos 15 minutos por adición de 1/20, del volumen de guanidina empleado, de CH_3COOH 1 M y 0.7 volúmenes de etanol absoluto. Las muestras se centrifugaron nuevamente en las condiciones descritas y el sobrenadante se descartó, mientras que el precipitado se resuspendió en 450 μ l de CH_3COONa 3 M pH 5.5 con ayuda de un vortex. Se retiró nuevamente la solución por centrifugación a 4 $^{\circ}$ C durante 15 minutos y los ácidos nucleicos precipitados se lavaron con 450 μ l de etanol al 70% (v/v), descartándose el sobrenadante. Los restos de etanol se eliminaron por evaporación y el ARN precipitado se resuspendió en 50 μ l de agua DEPC (Dietileno Pirocarbonato) estéril que contenía inhibidor de ribonucleasas (ARNasas) en proporción 0.5% (v/v) (Promega, N2111). Para asegurar una completa disolución del ARN, las muestras se calentaron durante 5 minutos en un bloque térmico a 50 $^{\circ}$ C.

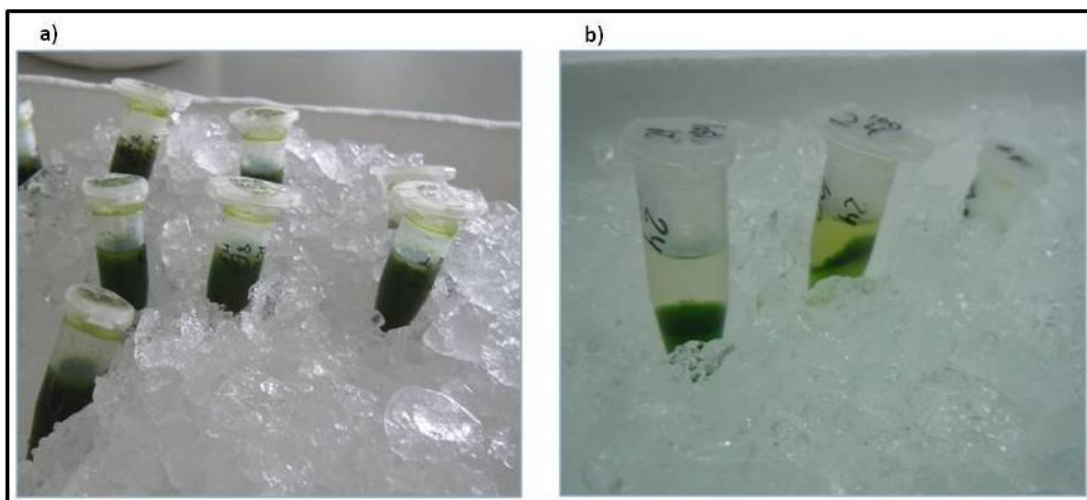


Figura 3.14. a) Muestras antes de la separación de fases, b) separación de fases durante la homogenización de muestras con tampón guanidina y fenol/cloroformo/isoamilalcohol.

Para evitar la degradación del ARN con las RNasas del propio manipulador durante el trabajo se extremaron las precauciones para mantener las condiciones de esterilidad, limpiando el área de trabajo e instrumentos de laboratorio con RNase away (Molecular Bioproducts, 7002) y todo el material utilizado, tanto eppendorfs como puntas de pipeta y soluciones se autoclavaron a 120 °C y 1,06 Kg·cm⁻² de presión durante 20 minutos (Autester 437-G, JP Selecta). El tampón guanidina no se esterilizó en autoclave pero se sometió a una filtración estéril, haciendo pasar la solución a través de una jeringa estéril acoplada a un filtro de acetato de celulosa de 30 mm con un tamaño de poro 0.2 μ (Fischerbrand, 17462752) y recogiendo la solución filtrada en un frasco de vidrio estéril.

3.9.2.- Cantidad y calidad del ácido ribonucleico.

La cuantificación del ARN aislado se realizó en un espectrofotómetro UV visible (Nanodrop ND-1000) (Fig. 3.15a) con el programa para la valoración de la concentración y calidad de los ácidos nucleicos, y en éste, el de cuantificación de ARN. La pureza se comprobó por la medida de absorbancia a 230, 260, 280 y 320 nm (Fig. 3.15b). El aparato permite realizar la medida con un volumen de 1 μl frente a un blanco con H₂O DEPC y emplea la absorción a 260 nm para la cuantificación del ARN (Logemann *et al.*, 1987). El equipo estima automáticamente la concentración del ARN en nanogramos por microlitro (ng·μl⁻¹). Se considera que la calidad del ARN obtenido es buena y apta para continuar con la síntesis de ADnc cuando las razones A_{260/280} (1.8–2.0) y A_{260/230} (≥2, próximas a 2 y nunca inferiores a 1.8) (Fig. 15b). Después de la cuantificación y separación electroforética en geles de agarosa, el ARN se almacenó a -20 °C.

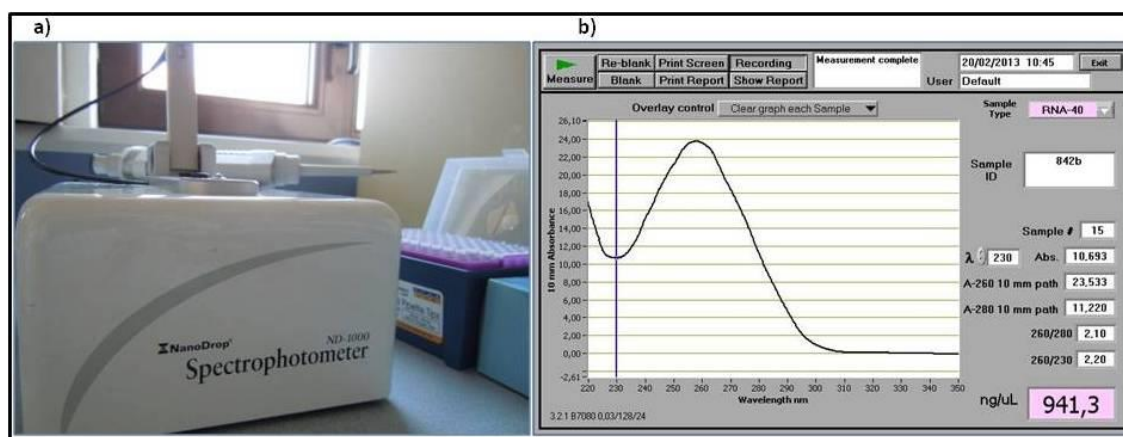


Figura 3.15. Cuantificación del ARN. **a)** Espectrofotómetro UV visible (Nanodrop ND-1000), **b)** espectro de absorción de una muestra de ARN en el rango de longitudes de onda comprendido entre los 230 y 320 nm.

3.9.3.- Electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes.

La comprobación de la integridad y la ausencia de degradación del ARN aislado se realizó por separación electroforética en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes, utilizando formaldehído como agente desnaturizante (Sambrook *et al.*, 1989).

Para la electroforesis, 2 μg de ARN por muestra se cargaron en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) con formaldehído al 7% (v/v) en una cubeta horizontal de tamaño pequeño (mini-sub®, Cell GT System

170-4467, Bio-Rad) provista de una bandeja de 7 x 10 cm UV transparente (Fig. 3.16a). Para la preparación del gel, 1.2 gramos de agarosa se disolvieron en 60 ml de agua estéril por ebullición en el microondas y se dejó enfriar a temperatura ambiente. En el momento previo al vertido sobre la bandeja de la cubeta de electroforesis con los delimitadores del gel y el peine para la colocación de muestras, a la agarosa disuelta en agua se añadieron 8 ml de tampón 10xMEN (CH_3OONa 50 mM (Merck, 1.06264), EDTA 10 mM (Sigma, E-5513) y MOPS 0.2 M pH 7 (Sigma, M-1254)) y 12.8 ml de formaldehído (Sigma, 8775). El gel se dejó solidificar a temperatura ambiente debajo de la campana extractora de gases durante aproximadamente 45 minutos, a fin de asegurar la consistencia adecuada.

Durante la fase de polimerización del gel, 2 μg de ARN se transfirieron a un eppendorf estéril y se mezclaron con un tampón de muestra formado por 1.8 μl de 10xMEN, 7.5 μl de formamida (Sigma, 7503), 2.1 μl de formaldehído 37% (Sigma, 8775) y 0.15 μl de bromuro de etidio (Sigma, E1510) y se homogeneizó la mezcla. A continuación, las muestras se desnaturalizaron, por incubación a 56 $^{\circ}\text{C}$ en un bloque térmico durante 15 minutos, y se dejaron enfriar en hielo durante al menos 5 minutos.

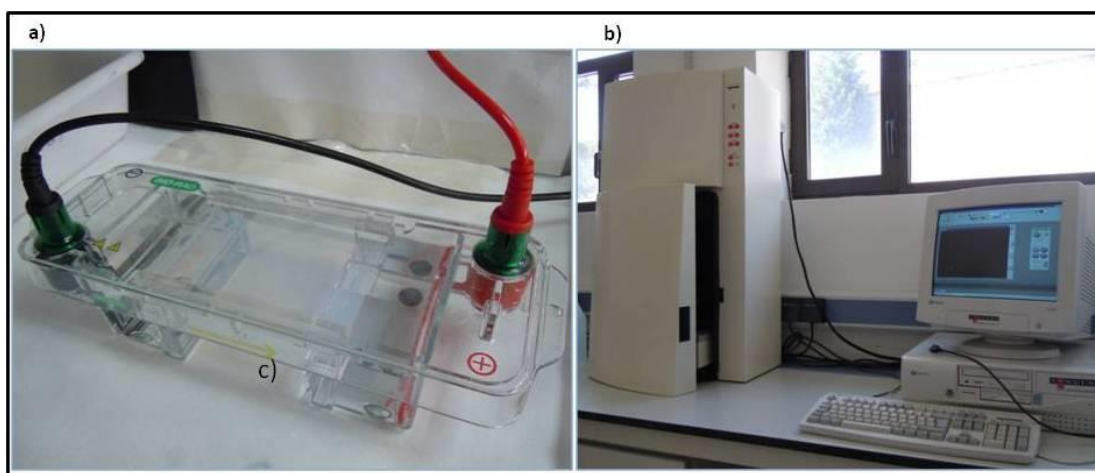


Figura 3.16. a) Cubeta de electroforesis mini-sub® (Cell GT System 170-4467, Bio-Rad) y b) transiluminador GeneGenius Imaging System from Syngene.

Una vez solidificado el gel de agarosa se colocó en la cubeta de electroforesis, tras ser retirados tanto el peine de colocación de muestras como los delimitadores y se cubrió con tampón 1xMEN. Después se cargaron las muestras de ARN desnaturalizadas en sus respectivos pocillos y se colocó la tapa de la cubeta para permitir la separación del ARN desde el polo negativo al positivo, al aplicar un voltaje de 70 voltios con una fuente de alimentación (EC 250-90, EC Apparatus Corporation) durante aproximadamente 1 hora. Una vez finalizada la electroforesis, se comprobó la uniformidad en el cargado de las muestras y la definición de las bandas bajo la luz UV (por la fluorescencia del bromuro de etidio al intercalarse en el ARN) con un transiluminador (GeneGenius Imaging System, Syngene, Reino Unido) (Fig. 3.16b). Este equipo utiliza el software GeneSnap (Syngene, Reino Unido) y permite obtener fotos de los geles de agarosa (Fig. 3.17). Este paso permitió comprobar la integridad del ARN total extraído.

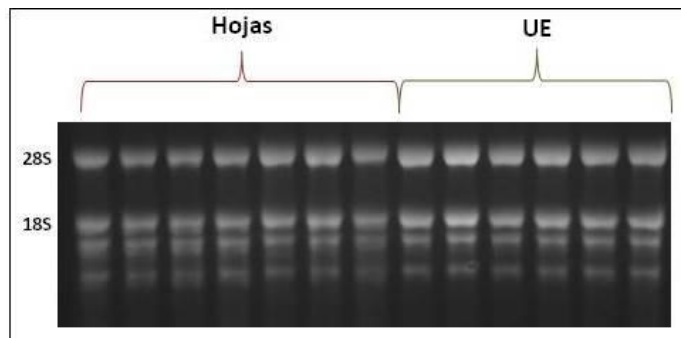


Figura 3.17. Muestras de ARN separadas electroforéticamente en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Se muestra ARN aislado de hojas (pocillos 1-7) y del último entrenudo del tallo (pocillos 8-13).

3.9.4.- Digestión con desoxirribonucleasa.

La posible contaminación de ADN genómico de las preparaciones de ARN puede eliminarse por tratamiento con desoxirribonucleasa (ADNasa). La digestión se realizó con ADNasa (Turbo DNA-free Kit™, Ambion AM1907), enzima que posee una eficiencia catalítica muy superior a la ADNasa I y permite digerir el ADN hasta un límite no detectable por PCR.

La digestión se realizó en un volumen final de 50 µl siguiendo las instrucciones del fabricante. A tal fin, se pusieron en un eppendorf estéril 10 µg de ARN, 5 µl de tampón 10xADNasa Turbo y 1 µl ADNasa-Free Turbo junto a la cantidad de agua Nuclease-Free Water necesaria para completar el volumen indicado. La mezcla se homogenizó suavemente y se incubó en un bloque térmico (Eppendorf Thermomixer® Comfort) a 37 °C durante una hora. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 5 µl de reactivo de inactivación de la ADNasa y se dejó actuar a temperatura ambiente unos 3 minutos. Una vez centrifugado a 10000 g en centrífuga refrigerada a 4 °C durante 90 segundos, el sobrenadante, libre de contaminación genómica, fue transferido a un nuevo eppendorf estéril. La integridad del ARN digerido se comprobó cargando una alícuota del ARN en un gel de agarosa al 1.5%. Además, se realizaron las comprobaciones oportunas para garantizar la ausencia de contaminación genómica en las muestras de ARN tratado con ADNasa Turbo por qRT-PCR. Para ello, se utilizó el par de primers específicos, 5'-AGGGAAAACAGCCCTTGGTG-3' y 5'-TTGCGACAATGGAACCGGAA-3', que fueron diseñados para amplificar una secuencia intrón del gen de la actina (AY663391, *T. turgidum*, que también amplifica específicamente en la cebada) a partir de ADN genómico, incorporándose también en el análisis, un control negativo con agua y un control positivo con ADN genómico (ver apartado 3.9.7). Al finalizar la qRT-PCR, los resultados fueron analizados con el software SDS versión 2.4, y la ausencia de amplificación de las muestras y de las curvas de disociación con los primers antes mencionados fue indicativo de que estaban libres de contaminación de ADN genómico (ver apartado 3.9.8). Del mismo modo, la carencia de amplicones, tras el cargado de las muestras en geles de agarosa del 3.5% después de la qRT-PCR, fue otro control positivo que advertía de la ausencia de contaminación genómica (ver apartado 3.9.8). Dichas pruebas, junto a la carencia de amplificación en el control negativo con agua y la presencia de amplificación con el control positivo con ADN genómico fueron otras evidencias favorables sobre la fiabilidad del análisis realizado, a la vez que garantizaba que las muestras de ARN total carecían de contaminación de ADN genómico.

3.9.5.- Síntesis de ADN complementario.

La síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN libre de contaminación genómica se realizó, siguiendo las instrucciones del fabricante, en un volumen final de 20 µl, con SuperScript® III RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen, 18080-044). Este kit comercial contiene el enzima M-MLV que se usa para sintetizar la primera cadena ADNc a temperaturas superiores a 55 °C, las cuales incrementan la especificidad y el rendimiento en la síntesis de ADNc en comparación con otras transcriptasas reversas, y puede generar ADNc desde 100 pb a >12 kb.

En un eppendorf estéril se mezclaron 11 µl de ARN libre de contaminación genómica junto a 1 µl de Oligo(dT)₂₀ (Invitrogen, 184418-020) y 1 µl de 10 mM dNTP Mix (10 mM cada dATP, dGTP, dCTP y dTTP, Bionline, BIO-39028) y se calentaron en un bloque térmico a 65 °C durante 5 minutos. A continuación, se dejó enfriar durante al menos 3 minutos en hielo y se añadieron 4 µl de tampón 5xFirst-Strand (Invitrogen), 1 µl de DDT 0.1 M (Invitrogen), 1 µl de inhibidor de ARNasas (Promega, N2111) y 1 µl de la transcriptasa reversa SuperScript® III (200 U/µl, Invitrogen). Los componentes de la mezcla se homogeneizaron suavemente y se dejaron en incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos y, con posterioridad, una hora a 50 °C en un bloque térmico. La reacción se inactivó por calentamiento a 70 °C durante 15 minutos. El ADNc sintetizado se usó como molde (*templete*) para la amplificación en la qRT-PCR y se conservó a -20 °C hasta su uso.

3.9.6.- Diseño de primers específicos.

Se ha estudiado el nivel de expresión de algunos de los genes que codifican proteínas involucradas en la biosíntesis y degradación de fructanos y el de la nitrato reductasa por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

Figura 3.18. a) Se realizó la búsqueda de las secuencias de los genes en bases de datos como el GenBank del NCBI, b) para el diseño de primers específicos se utilizó la aplicación Primer-BLAST.

Para la identificación de las secuencias de los genes de cebada que codifican las fructosiltransferasas, fructano exohidrolasas y nitrato reductasa se realizaron búsquedas en bases de datos, como el repositorio de secuencias GenBank del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), y revisiones bibliográficas. Para las secuencias identificadas (Fig. 3.18a) se diseñaron oligonucleótidos cebadores (*oligos o primers*) específicos mediante la aplicación Primer-BLAST (Fig. 3.18b) disponible en la página web del NCBI. El diseño de los cebadores específicos es uno de los parámetros más críticos para una amplificación por qRT-PCR exitosa. Por ello, para conseguir la máxima especificidad y eficiencia en la amplificación, en las condiciones de reacción estandarizadas, se han empleado criterios estrictos y rigurosos según las indicaciones de Udvardi *et al.* (2008). Entre ellas destacan, un tamaño de producto de PCR (amplicón) de 60 a 150 nucleótidos, una temperatura de fusión (T_m , *melting temperature*) aproximada de $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ambos cebadores, un tamaño de primer entre 18 y 25 nucleótidos y un contenido de guanidina y citosina (GC) entre 40-60%.

En la siguiente tabla (3.5) se muestran las secuencias de los pares de primers específicos diseñados para cada uno de los genes de estudio y el tamaño del amplicón generado, junto a la información adicional obtenida para cada uno de ellos.

Tabla 3.5. Secuencias de los primers diseñados para estudios de expresión génica por qRT-PCR en cebada.

Nº accesión	Descripción		Secuencia 5' → 3'	Producto (pb)	Referencia
AJ605333	Fructano 1-exohidrolasa, 1-FEH	<i>Forward</i>	GGATTACGGCACTTTCTACGC	69	(Nagaraj <i>et al.</i> , 2005)
		<i>Reverse</i>	CCCATACAATCCTCCTGCC		
AJ567377	Sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa, 1-SST	<i>Forward</i>	C GACTCTGCCTATCAGTCCA	156	(Nagaraj <i>et al.</i> , 2004)
		<i>Reverse</i>	CCATGCCATTTTGATTCCC		
X83233	Sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa, 6-SFT	<i>Forward</i>	CGTATCAGGAGGCAAGAGTC	98	(Sprenger <i>et al.</i> , 1995; 1997)
		<i>Reverse</i>	GTTGTGTGCCGAGTCCAT		
JQ411253	Fructano:fructano 1-fructosiltransferasa, 1-FFT	<i>Forward</i>	GACCGGCGAGACTATTACGC	110	(Huynh <i>et al.</i> , 2012)
		<i>Reverse</i>	CTGCCATAGTCGTAGCGCA		
AJ534444	Invertasa de pared celular, cwinv2	<i>Forward</i>	AGACGTTGAGGAGCAAACGA	140	(Weschke <i>et al.</i> , 2003)
		<i>Reverse</i>	GGTTTCTGCCTCTCCAGGG		
X57845	Nitrato reductasa, NR	<i>Forward</i>	ACCAACTGCGTCATCACCAC	135	(Schnorr <i>et al.</i> , 1991)
		<i>Reverse</i>	GGATGGATGGATGGAGGAGGA		

Una vez diseñados los oligonucleótidos cebadores específicos, su síntesis se encargó a una compañía de servicios externos (IDT, Integrate DNA Technologies) y antes de su uso se comprobó su especificidad como se detalla más adelante.

3.9.7.- Condiciones de la PCR cuantitativa en tiempo real.

La transcripción reversa (RT) seguida por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) representa una poderosa herramienta para la detección y cuantificación del ARN mensajero (Gutierrez *et al.*, 2008). La PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) es una técnica ampliamente utilizada por su elevada sensibilidad y buena reproducibilidad. La amplificación por PCR del mensajero (ARNm) presente en una muestra con un determinado número de copias rinde una cantidad final de producto que depende del número de ciclos de PCR realizados. De este modo, cuantificando la

cantidad final de producto y utilizando una curva de calibrado puede determinarse la cantidad inicial de ARNm de la muestra, siempre que el resto de componentes de la reacción se encuentren en exceso. En la qRT-PCR se recogen datos durante la fase exponencial de amplificación, cuando la cantidad de producto es directamente proporcional a la cantidad de ADN molde. En nuestros experimentos, las reacciones en cadena de la polimerasa se realizaron con un sistema de detección de secuencias ABI PRISM[®] 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) (Fig. 3.19), usando Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, 4367659) para realizar el seguimiento de la síntesis de las dobles cadenas de ADN (dsADN). El kit de Power SYBR[®] Green contiene todos los componentes necesarios para realizar la qRT-PCR, excepto los primers específicos y el ADNc. Incluye SYBR[®] Green I dye que es un fluoróforo que se une al ADN de doble cadena y emite fluorescencia que es proporcional a la cantidad detectada de producto amplificado en todos los ciclos y contiene también la polimerasa AmpliTaq Gold. La qRT-PCR se realizó siguiendo el perfil térmico recomendado por el fabricante, con una primera fase de 50 °C durante 2 minutos y una segunda fase en la que la temperatura se incrementó a 95 °C durante 10 minutos para que se activase la polimerasa AmpliTaq Gold. Seguida de 40 ciclos, con una etapa inicial de 95 °C durante 15 segundos para producir la desnaturalización del ADN, y una segunda etapa a 60 °C (T_m) durante 1 minuto para que se produzca el anillamiento y la extensión. Después de los 40 ciclos, incorpora un calentamiento desde 60 °C a 95 °C con un incremento de 1.9 °C por minuto que permite obtener la curva de disociación y analizar la especificidad de las amplificaciones. Se utilizó el programa SDS versión 2.4 (Applied Biosystems) con el protocolo Standard en un volumen de 10 μ l para la qRT-PCR.

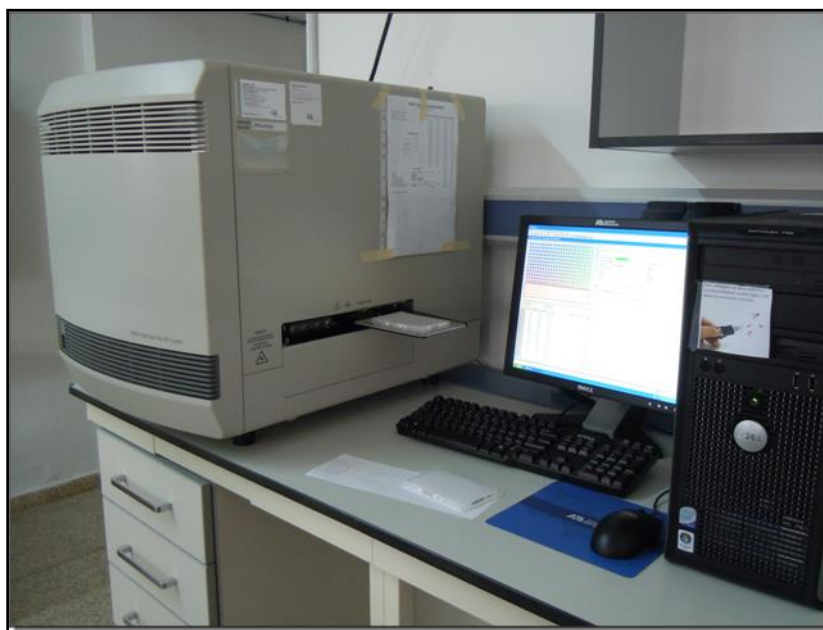


Figura 3.19. Sistema de PCR cuantitativa en tiempo real qRT-PCR: equipo ABI PRISM[®] 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Los estudios de expresión génica se realizaron en tres réplicas biológicas para cada uno de los genotipos, nivel de disponibilidad hídrica y muestreos analizados, junto con tres o dos réplicas técnicas para evaluar la reproducibilidad de datos y/o posibles errores de pipeteo. Se emplearon tres réplicas técnicas en el análisis de la especificidad de los primers diseñados para los genes diana, y también en el estudio de estabilidad de los genes de referencia (ver apartado 3.9.9). Dada la elevada reproducibilidad y fiabilidad que se obtuvo en estos análisis, se optó por utilizar dos réplicas técnicas en la evaluación de los niveles de transcritos de las fructosiltransferasas, fructano exohidrolasas y la

nitrito reductasa de las muestras foliares y del último entrenudo del tallo. Los análisis se realizaron en placas ópticas de 384 pocillos (Applied Biosystem, 4309849) en un volumen final de reacción de 10 μl , añadiendo 5 μl de Power SYBR[®] Green PCR Master Mix, 4 μl de la mezcla de primers forward y reverse en una concentración 0.5 μM (que genera una concentración final en la reacción de 0.2 μM) y 1 μl de ADNc diluido. Previamente se realizaron pruebas de diluciones con el ADNc para lograr un valor de C_T (*cycle threshold*) con el gen de referencia próximo a 20 ± 1 , comprobándose que tanto con el material foliar como del último entrenudo del tallo la dilución que proporcionó valores de C_T de ese orden fueron aquellas diluidas 30 veces (30x). Para limitar al máximo los posibles errores de pipeteo, la dispensación del Power SYBR[®] Green y del master mix correspondiente a la mezcla de primers y cDNA diluido en las cantidades antes indicadas se realizó con una pipeta automática Eppendorf Research Pro de 100 μl volumen máximo. Una vez que se dispensaron las muestras en la placa de 384 pocillos se cubrieron con un MicroAmp optical adhesive film (Applied Biosystems, 4311971) y, para eliminar las posibles burbujas que podrían haberse generado durante la adición de los componentes de la mezcla a los pocillos, la placa se centrifugó unos 15 segundos a 2000 g en una centrífuga refrigerada para placas (Thermo Scientific, Sorvall ST16R).

3.9.8.- Comprobación de la especificidad de los primers diseñados.

La especificidad de los pares de primers diseñados para los genes de estudio se evaluó de dos formas diferentes, tanto por el análisis de las curvas de disociación de los productos de reacción de la PCR como por la separación electroforética de dichos productos. Para este último método, la agarosa utilizada para la preparación de los geles fue una agarosa MS-8 específica para la separación de pequeños fragmentos de ADN y productos de PCR (Pronadisa Conda, 8066). Se sabe que la fluorescencia durante la PCR en tiempo real se determina fundamentalmente por la abundancia del ADNc de partida, y su aumento durante la PCR es fuertemente afectado por la eficiencia de la amplificación. Dado que la secuencia específica de los primers y la formación de dímeros de primers durante la PCR son factores que pueden afectar significativamente a la eficiencia de las reacciones de PCR individuales, conviene analizar estos aspectos (ver detalles en apartado 3.9.10).

Para cada uno de los genes de estudio se preparó una mezcla de los primers forward y reverse a una concentración 0.5 μM . El estudio se realizó con tres réplicas técnicas para cada una de las réplicas biológicas de las muestras analizadas con cada uno de los genes de estudio y se utilizó ADNc diluido procedente de muestras foliares y del último entrenudo del tallo de la cebada. Los primers junto al Power SYBR[®] Green PCR Master Mix y el ADNc se dispensaron en un plato, el cual se colocó en el sistema de PCR. Al finalizar la qRT-PCR, las curvas de amplificación se analizaron con un umbral de análisis de 0.2, lo que permitió obtener los valores de C_T para cada una de las muestras. Además, se analizaron las curvas de disociación de los productos amplificados en cada pocillo. Las curvas de disociación son una medida de la desnaturalización del ADN de doble cadena frente al tiempo. Dicha curva depende de la composición de nucleótidos de cada producto de amplificación, por lo que cada secuencia tiene una curva de disociación propia. Si la curva de disociación mostró un único pico, agudo y nítido se consideró una amplificación específica y fue indicativa de la amplificación de un único producto, lo que sugiere que los primers se unieron de forma específica a una única zona del ADN molde y se amplificó siempre la misma secuencia. Por el contrario, la aparición de un pico difuso o múltiples picos suele ser indicativo de una amplificación inespecífica.

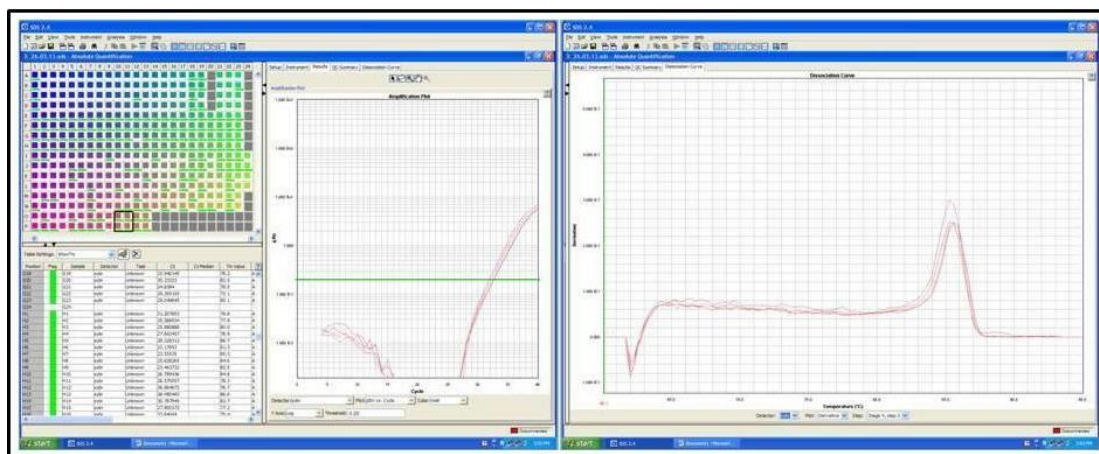


Figura 3.20. Gráfico de amplificación y curva de disociación de alguna de las muestras de la qRT-PCR obtenidos con el Software SDS versión 2.4 de Applied Biosystems.

No obstante, se comprobó también la especificidad de los primers examinando la presencia de un único amplicón del tamaño esperado por separación electroforética de los productos de la PCR en geles de agarosa de alta calidad al 3.5% (p/v). Para la preparación de los geles, los pasos seguidos y la cubeta utilizada fueron similares a aquellos descritos para la comprobación de la integridad del ARN. En este caso, 2.45 g de agarosa (Agarose MS-8, Pronadisa Conda, 8066) se disolvieron en 70 ml de tampón 0.5xTBE (EDTA 4 mM, Tris base 45 mM y H_3BO_3 45 mM) por ebullición en el microondas, se dejó enfriar, y en el momento previo al vertido sobre la bandeja de la cubeta se incorporaron 5 μ l de bromuro de etidio (Sigma, 1510). El gel se dejó solidificar y mientras tanto se prepararon los productos de la PCR para su cargado posterior en el gel. Lo que se hizo fue añadir 5 μ l de un tampón de muestra formado por glicerina 4.4% (v/v), orange G 1.4% (p/v), azul de bromofenol 3.5% (p/v), xilencianol 3.5% (p/v) y bromuro de etidio 0.006% (v/v) en cada uno de los pocillos de la placa que contiene los productos de la qRT-PCR. A continuación, el gel de agarosa se colocó en el interior de la cubeta y se cubrió con tampón 0.5xTBE. En cada uno de los pocillos se fueron cargando los productos de la PCR con el tampón de muestra y en una de las celdillas se colocó un marcador de pares de bases (HyperLadder V, Bionline) para fragmentos de ADN correspondiente a un tamaño de entre 25 y 500 pares de bases. Para la separación del ADN desde el polo negativo al positivo, se aplicó un voltaje de 70 voltios con una fuente de alimentación (EC 250-90, EC Apparatus Corporation) durante aproximadamente 1 hora. Después se procedió a visualizar las bandas en el transiluminador, por la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio con la luz ultravioleta pudo comprobarse si el tamaño de los amplicones generados se correspondía con los previstos, tomando como referencia las bandas del marcador en función de los pares de bases. Ambos controles permitieron comprobar la especificidad de los primers que fueron diseñados.

3.9.9.- Selección de genes de referencia para la normalización de los resultados de expresión génica.

Uno de los pasos más críticos para la normalización de los datos de expresión génica es la selección de genes de referencia con niveles estables de expresión en diferentes tejidos vegetales, estadios de desarrollo de la planta y condiciones ambientales (Czechowski *et al.*, 2005; Gutierrez *et al.*, 2008). Para la identificación de los genes de referencia más habitualmente empleados en estudios de expresión génica con cebada se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva, que puso de

manifiesto que los genes de la actina y la ubiquitina son los que se emplean de forma más habitual para la normalización de resultados obtenidos por qRT-PCR. Los pares de primers específicos para la amplificación del gen de la ubiquitina fueron (F, 5'-CACCTCGCCGACTACAA-3'; R, 5'-CTTGGGCTTGGTGTACGTCT-3') (M60175) (Gausing and Jensen, 1990) y para el de la actina (F, 5'-GGCACACTGGTGCATGG-3'; R, 5'-CTCCATGTCATCCCAGTT-3') (AY145451) (Rapacz *et al.*, 2008). La estabilidad en la expresión de ambos genes de referencia se evaluó con ADNc de material foliar y del último entrenudo del tallo de los cuatro genotipos de cebada estudiados, en los dos niveles de disponibilidad hídrica (control y sequía) y en dos de los muestreos realizados durante la post-antesis de la cebada. La estabilidad de expresión del gen de la actina y la reproducibilidad de su patrón de expresión nos permitió su selección como el gen de referencia más apropiado para la normalización de los resultados de expresión de los genes objeto de nuestro estudio. Conviene mencionar que sólo aquellas preparaciones de ADNc que generaron un valor de C_T similar para el gen control de la actina se emplearon para el análisis de transcritos de los genes anteriormente mencionados (Czechowski *et al.*, 2004).

3.9.10.- Análisis y cuantificación de los resultados de expresión génica.

El estudio de los niveles de transcritos de los genes que codifican las fructosiltransferasas, exohidrolasas y nitrato reductasa se realizó en material foliar y del último entrenudo del tallo del segundo experimento, y se empleó ADNc diluido 30 veces procedente de tres réplicas biológicas para cada uno de los genotipos estudiados, nivel de disponibilidad hídrica y estadios de desarrollo de la cebada correspondientes al inicio del desarrollo del grano y estadio de grano lechoso tardío, junto a dos réplicas técnicas para cada uno de ellos. Los análisis se realizaron en placas de 384 pocillos en un volumen final de 10 μ l. Como gen de referencia para la normalización de los resultados se utilizó la actina, por lo que también se estimó su expresión en las mismas condiciones que los genes de estudio para cada uno de los tipos de muestras, genotipos, tratamientos y muestreos indicados. Una vez que finalizó la qRT-PCR, todas las curvas de amplificación se analizaron con un umbral (*threshold*) de 0.2 para obtener los valores de C_T para cada una de las muestras. Los valores de C_T de cada una de las réplicas técnicas de las muestras fueron promediados.

La cuantificación de los transcritos por qRT-PCR se realizó por cuantificación relativa usando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Este método se basa en que la fluorescencia durante la qRT-PCR está determinada fundamentalmente por la concentración inicial del ADNc de estudio, aunque su incremento está fuertemente afectado por la eficiencia de la amplificación, como ya se mencionó antes:

$$X_n = X_0 * (1 + E_x)^n$$

Donde X_n es el número de copias del gen de estudio en el ciclo n , X_0 es el número de copias iniciales del gen de estudio, E_x es la eficiencia de la amplificación y n es el número de ciclos (valor de C_T). El valor de C_T se obtuvo como se ha indicado anteriormente, usando un valor de *threshold* de 0.2 en el programa SDS versión 2.4, que se mantuvo constante para todas las placas analizadas. En base a la ecuación de partida y teniendo en consideración que para amplicones menores a 150 pb con una concentración de primer y Mg^{2+} optimizada la eficiencia es próxima a 1, la cantidad de copias del gen

de estudio normalizado con un gen de referencia y relativo a un control se puede calcular del siguiente modo:

$$\Delta C_T = C_{TGE} - C_{TGR}$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_{TGE} - \bar{x} C_{TGR}$$

$$\text{Cantidad de copias (GE)} \ 2^{-\Delta \Delta C_T} = \frac{1}{\text{potencia (2; } \Delta \Delta C_T)}$$

$$\text{Fold Change} = \frac{GE}{\bar{x} 2^{-\Delta \Delta C_T_{GC}}}$$

Donde **GE** hace referencia al gen de estudio, **GR** al gen de referencia y **GC** al gen de estudio en el tratamiento control (\bar{x} media de las repeticiones). En nuestros estudios de expresión génica se considera como control, el tratamiento de amplia disponibilidad hídrica cuando se evalúan los tratamientos, el cv. Harrington cuando se evaluaron los genotipos y el cultivar Harrington en el tratamiento con amplia disponibilidad hídrica cuando se analizó la interacción del genotipo por el tratamiento. Por definición, $\Delta \Delta C_T$ en el control es 0, y 2^0 es igual a 1, de este modo el valor de $2^{-\Delta \Delta C_T}$ en el resto de tratamientos harán referencia a las veces que el nivel de expresión del gen de estudio cambia respecto al control.

Para realizar el análisis estadístico de los resultados de expresión génica, se utilizaron datos no logarítmicos según Schmittgen and Livak (2008), utilizando una transformación a la inversa negativa del $2^{-\Delta \Delta C_T}$, que fue calculada tomando como base el ΔC_T .

Para la visualización de las diferencias significativas en los datos de expresión, estos se expresan en base al \log_2 *fold change* para cada genotipo, y se ha optado por una representación gráfica coloreada usando un *heat map*. Que corresponde a una matriz de datos coloreados que muestra el nivel de expresión de los diferentes genes para los efectos principales (disponibilidad hídrica y genotipo) y la interacción (genotipo x disponibilidad hídrica). La escala coloreada establece un control, y los genes que no cambian más que el control aparecen en blanco y los genes que son inducidos o reprimidos varían en la intensidad de color azul y rojo, respectivamente (Fig. 3.21).

$$\text{Log}_2 = (\text{Fold Change}; 2)$$



Figura 3.21. Gradiente de color utilizado en el *heat map*. La intensidad del color variará si los genes son inducidos o reprimidos con respecto al control en el color azul y rojo, respectivamente.

3.10.- Análisis estadístico de los datos.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el programa GenStat versión 7 (Genstat® for windows, 2003), en un diseño completamente al azar, donde los efectos de la disponibilidad hídrica y el genotipo fueron incorporados dentro de un modelo lineal.

La comparación de los datos experimentales obtenidos para cada estadio de desarrollo se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA), analizando los efectos del nivel de disponibilidad hídrica y el genotipo y sus interacciones con la diferencia mínima significativa de las medias (Lsd), considerando significativa una probabilidad ($P \leq 0.05$).

En el capítulo de resultados, se presentan en tablas los resultados de los análisis de la varianza con los efectos principales (disponibilidad hídrica y genotipos) junto a su nivel de significación, y cuando las interacciones (genotipo x disponibilidad hídrica) alcanzaron significación estadística se muestran en gráficas. Para la descripción de los resultados se tuvo en consideración que cuando la interacción alcanza significación estadística prevalece sobre el efecto principal de los mismos, y se describen únicamente dichos resultados. En ausencia de interacción, el efecto de la disponibilidad hídrica y/o del genotipo es descrito si logra significación estadística o está muy próximo al umbral de significación establecido.

4.- Resultados

4.1.- EXPERIMENTO 1.

4.1.1.- Efecto del déficit hídrico en el intercambio gaseoso de los genotipos de cebada.

Como se ha indicado en el apartado de materiales y métodos, en las fases de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano, grano lechoso tardío y grano pastoso temprano se realizaron medidas de intercambio gaseoso con 390 y 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 en la medida y 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, con objeto de obtener una estimación de la asimilación fotosintética del CO_2 en las condiciones de crecimiento (390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2) y de la fotosíntesis máxima potencial (2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2) en la penúltima hoja de las plantas de cebada. En el estadio de grano pastoso temprano hubo algún contratiempo con la medida de alguna de las réplicas para cada nivel de disponibilidad hídrica estudiado y genotipo, que comprometía el análisis de la varianza de los datos. Por ello, sólo se describen los resultados correspondientes a los estadios de inicio del desarrollo del grano y grano lechoso tardío.

Tabla 4.1. Parámetros de intercambio gaseoso medidos con 390 y 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 y 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en el inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia.

	390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2				2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2			
	A	g_s	C_i	E	A	g_s	C_i	E
Tratamientos								
Control	17.80	285.0	264.2	5.207	34.86	240.3	1543.5	4.013
Sequía	7.97	96.3	242.1	2.009	25.69	71.3	1122.5	1.467
<i>P</i> _{.05}	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	0.415	4.830	2.920	0.085	0.840	6.150	17.70	0.092
Genotipos								
cv. HA	13.17	214.2	260.0	4.019	32.45	163.3	1280.0	2.752
RCSL-76	10.70	187.7	272.4	3.581	26.81	163.8	1452.2	2.944
RCSL-8	12.95	179.2	242.4	3.286	29.12	130.8	1181.8	2.277
RCSL-89	14.71	181.5	237.8	3.545	32.72	165.2	1417.9	2.986
<i>P</i> _{.05}	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	0.587	6.830	4.130	0.120	1.188	8.700	25.04	0.130
Interacción								
GxT (<i>P</i> _{.05})	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	0.830	9.650	5.850	0.170	1.681	12.31	35.41	0.183

(A) asimilación fotosintética del carbono ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), (g_s) conductancia de los estomas ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), (C_i) concentración de CO_2 en los espacios intercelulares ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y (E) transpiración ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

En el inicio del desarrollo del grano, los análisis de la varianza de los parámetros de intercambio gaseoso (A, g_s , E y C_i) medidos con 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 y 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa mostraron significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.1), indicativa de que, en comparación con las plantas de control hídrico, el déficit hídrico condujo en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente, a una notable reducción de la asimilación fotosintética del CO_2 (59%, 69.1%, 44.1% y 45.1%) (Fig. 4.1a), la conductancia de los estomas (73.1%, 76.3%, 61.9% y 49.2%) (Fig. 4.1b) y la transpiración (68.3%, 72.2%, 52.7% y 49.8%) (Fig. 4.1d) y a un ligero descenso de la concentración de CO_2 en los espacios intercelulares (11.6%, 8.3%, 12.9% y sin efecto en la línea 89) (Fig. 4.1c). En plantas de control hídrico, la fotosíntesis aumentó en el cv. Harrington y las líneas 8 y 89 con respecto a la línea 76 (Fig. 4.1a). La g_s y la E aumentaron en el cv.

Harrington en comparación con todas las líneas RCSL (Fig. 4.1bd), la g_s fue mayor en las otras RCSLs que en la línea 89 (Fig. 4.1b) y la E fue mayor en la línea 8 que en la 89 (Fig. 4.1d). La C_i fue también mayor en Harrington y las RCSLs restantes que en la línea 89, mayor en la línea 76 que en el cv. Harrington y la línea 8, y mayor a su vez en Harrington que en la línea 8 (Fig. 4.1c). En plantas de déficit hídrico, la A y la g_s aumentaron en la línea 89 en comparación con los demás genotipos, la A tendió a aumentar, sin alcanzar significación estadística, en la línea 76 y Harrington con respecto a la línea 8 (Fig. 4.1a), y la g_s aumentó en el resto de genotipos en comparación con la línea 8 (Fig. 4.1b). La C_i aumentó en la línea 76 con respecto a las otras líneas RCSL y en el cv. Harrington en comparación con la línea 8 (Fig. 4.1c). La E fue mayor en las líneas 76 y 89 que en el cv. Harrington, y mayor en todos ellos que en la línea 8 (Fig. 4.1d).

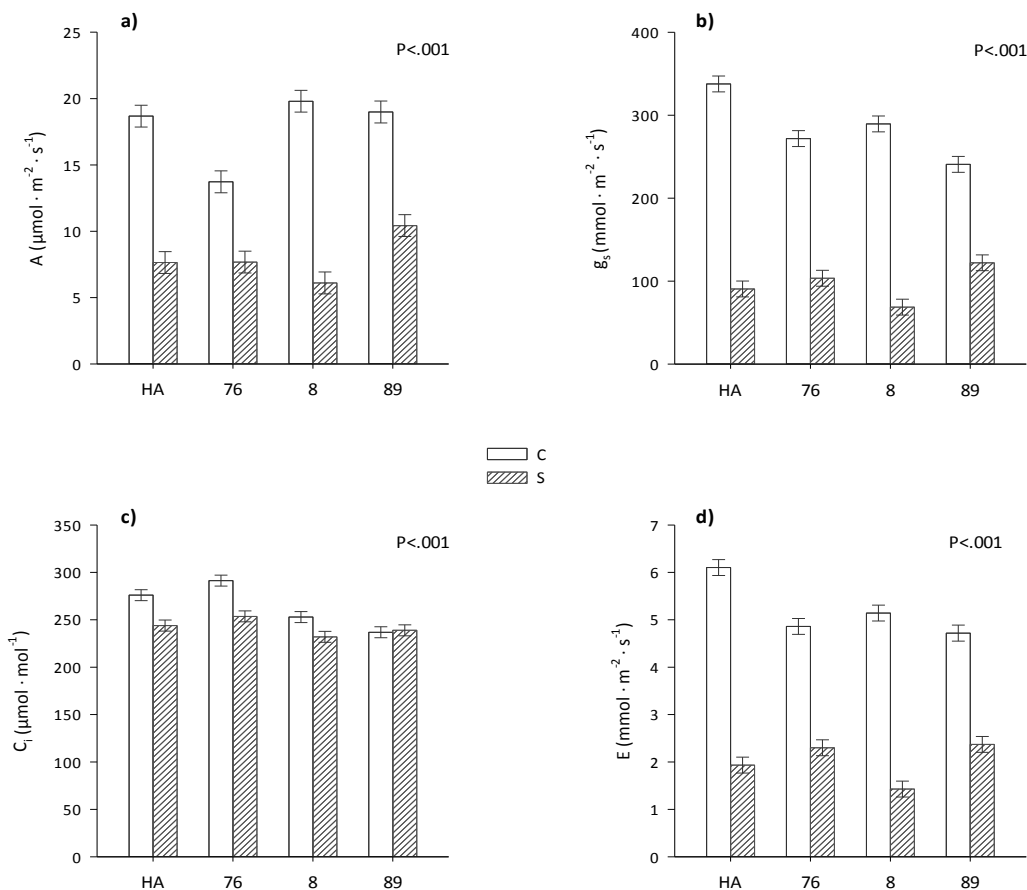


Figura 4.1. a) Asimilación fotosintética del carbono (A), b) conductancia de los estomas (g_s), c) concentración de CO_2 en los espacios intercelulares (C_i) y d) transpiración (E) medidos con $390 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 y $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en el inicio del desarrollo del grano de la cebada (71 ± 2 d.d.s.). Plantas de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

Quando las medidas de intercambio gaseoso se realizaron con $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 y $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, como era previsible, la fotosíntesis fue mayor que cuando la medida se realizó con $390 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 . Las interacciones significativas genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.1), mostraron que el déficit hídrico condujo, en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente, a un descenso de la fijación fotosintética del CO_2 más tenue que con $390 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 (20.2%, 47.5%, 13.8% y 20.1%) (Fig. 4.2a), la conductancia de los estomas ligeramente más acentuado que con $390 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 en la medida (77.9%, 83%, 64.8% y 54.8%) (Fig. 4.2b), al igual que la transpiración (70.9%, 77.7%, 58.3% y 47.4%) (Fig. 4.2d) y la concentración de CO_2 en los espacios intercelulares más intenso que en las condiciones de

crecimiento (35.9%, 42.9%, 18.2% y 12.4%) (Fig. 4.2c). En condiciones de control hídrico, la A aumentó en los otros genotipos con respecto a la línea 76 (Fig. 4.2a) y la g_s fue mayor en el cv. Harrington que en las líneas RCSL (Fig. 4.2b), como ya se observó en medidas con $390 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 (Fig. 4.1b). La C_i aumentó en la línea 76 en comparación con las otras líneas RCSL y fue similar a la del cv. Harrington (Fig. 4.2c). La E fue mayor en Harrington y la línea 76 que en la línea 8, y en Harrington tendió a aumentar, sin llegar a alcanzar significación estadística, con respecto a la línea 89 (Fig. 4.2d). En condiciones de déficit hídrico, la A, la C_i y la E aumentaron en los otros genotipos en comparación con la línea 8, la A fue mayor en Harrington y la línea 89 que en la línea 76 (Fig. 4.2a), y la C_i y la E aumentaron en las líneas 76 y 89 respecto al cv. Harrington (Fig. 4.2cd). La g_s fue mayor en las líneas 76 y 89 que en la línea 8 y el cv. Harrington (Fig. 4.2b).

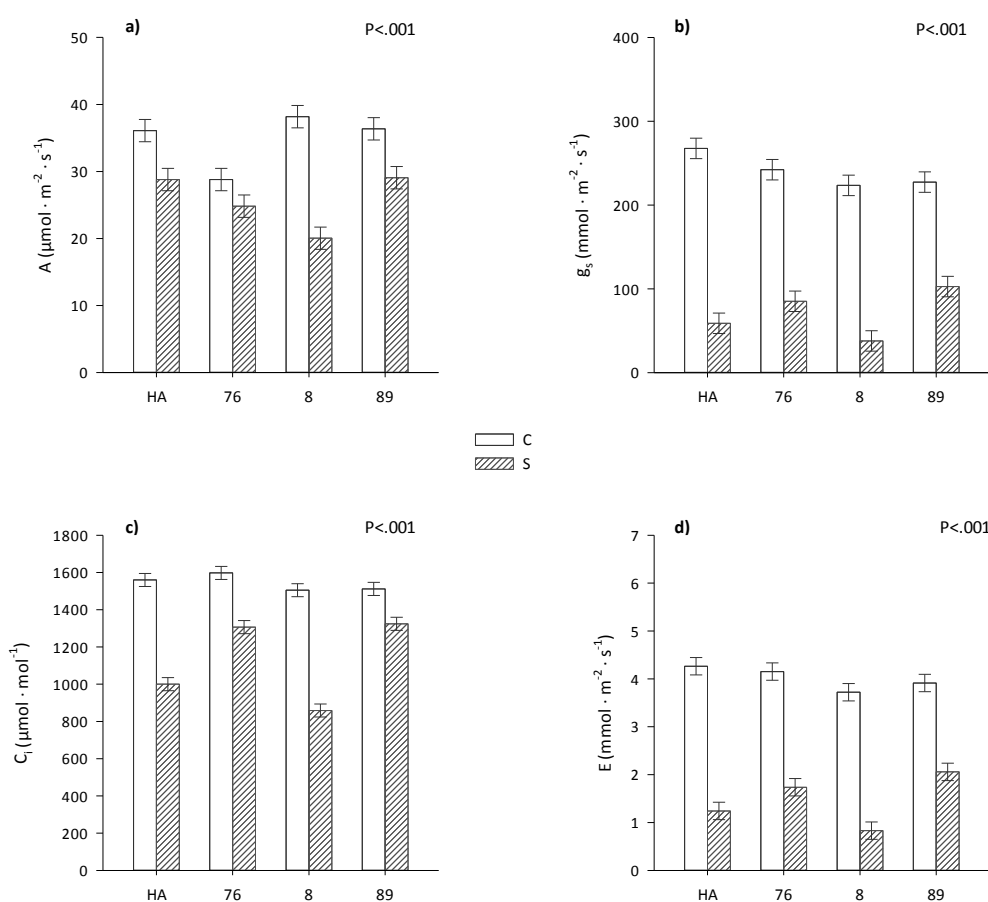


Figura 4.2. a) Asimilación fotosintética del carbono (A), b) conductancia de los estomas (g_s), c) concentración de CO_2 en los espacios intercelulares (C_i) y d) transpiración (E) medidos con $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 y $1500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en el inicio del desarrollo del grano de la cebada (71 ± 2 d.d.s.). Plantas de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Isd.

En el estadio de grano lechoso tardío, los análisis de la varianza de los parámetros de intercambio gaseoso (A, g_s , E y C_i) medidos con 390 y $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 y $1500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa alcanzaron significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Parámetros de intercambio gaseoso medidos con 390 y 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 y 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en el estadio de grano lechoso tardío (88 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia.

	390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2				2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2			
	A	g_s	C_i	E	A	g_s	C_i	E
Tratamientos								
Control	12.60	212.2	270.2	4.231	24.36	192.6	1564.0	3.479
Sequía	7.61	100.1	251.5	2.153	20.05	78.9	1348.3	1.596
$P_{.05}$	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	0.296	2.990	3.210	0.059	0.487	3.090	14.32	0.054
Genotipos								
cv. HA	12.57	188.7	253.0	3.718	26.63	161.1	1448.4	2.970
RCSL-76	8.05	150.3	279.6	3.179	19.25	127.2	1487.0	2.407
RCSL-8	9.82	149.9	261.7	3.039	22.34	140.0	1430.6	2.565
RCSL-89	9.97	135.8	249.3	2.832	20.59	114.7	1458.6	2.207
$P_{.05}$	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	0.048	<.001
SED	0.418	4.230	4.540	0.083	0.688	4.370	20.25	0.076
Interacción								
GxT ($P_{.05}$)	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	0.005	<.001
SED	0.591	5.990	6.430	0.118	0.974	6.170	28.64	0.108

(A) asimilación fotosintética del carbono ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), (g_s) conductancia de los estomas ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), (C_i) concentración de CO_2 en los espacios intercelulares ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y (E) transpiración ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Con 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 en la medida y 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, las interacciones genotipo x disponibilidad hídrica significativas (Tabla 4.2) indicaron que el déficit hídrico disminuyó la fotosíntesis, la conductancia de los estomas y la transpiración en todos los genotipos de cebada (Fig. 4.3abd), y la concentración de CO_2 en los espacios intercelulares, sólo en la línea 76 y el cv. Harrington y no tuvo efecto en las líneas 8 y 89 (Fig. 4.3c). El descenso de los parámetros de intercambio gaseoso, en comparación con las plantas de control hídrico, fue más atenuado que en el anterior estadio de desarrollo, estimándose en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente, en 19.1%, 59.4%, 40.7% y 39.3% para la A (Fig. 4.3a), 43.2%, 64.6%, 57.4% y 45.5% para la g_s (Fig. 4.3b), 41.1%, 61.1%, 51.9% y 41.6% para la E (Fig. 4.3d) y 14.1% y 9.3% para la C_i en Harrington y la línea 76, respectivamente (Fig. 4.3c). En plantas de control hídrico, la fijación de CO_2 aumentó en el cv. Harrington y las líneas 8 y 89 en comparación con la línea 76 (Fig. 4.3a), como ya se observó en el inicio del desarrollo del grano con ambos niveles de CO_2 en la medida (Fig. 4.1a, 4.2a) y en la línea 8 y Harrington con respecto a la línea 89 (Fig. 4.3a). En el cv. Harrington, la g_s y la E fueron mayores que en las líneas RCSL (Fig. 4.3bd), como ya se observó en el inicio del desarrollo del grano, y en los otros genotipos ambos parámetros aumentaron con respecto a la línea 89. La C_i aumentó en la línea 76 en comparación con Harrington y las líneas 8 y 89 y la C_i del cv. Harrington fue mayor que la de la línea 89 (Fig. 4.3c). En plantas de déficit hídrico, la A, la g_s y la E aumentaron en el cv. Harrington en comparación con las líneas RCSL y la A de la línea 89 fue mayor que la de las líneas 8 y 76 (Fig. 4.3a). La línea 8 mostró la menor g_s y E de todos los genotipos de cebada (Fig. 4.3bd). La C_i fue mayor en las líneas 8 y 76 que en la línea 89 y Harrington, y la línea 89 mostró un aumento próximo a la significación en comparación con el cv. Harrington (Fig. 4.3c).

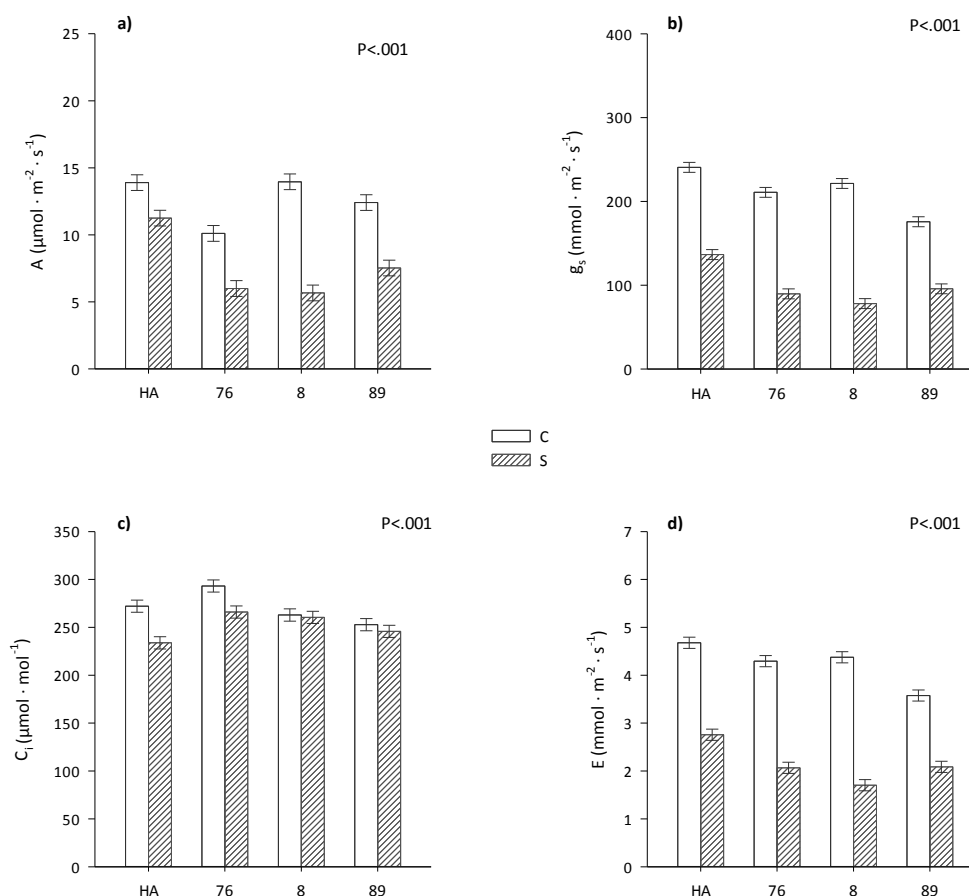


Figura 4.3. a) Asimilación fotosintética del carbono (A), b) conductancia de los estomas (g_s), c) concentración de CO_2 en los espacios intercelulares (C_i) y d) transpiración (E) medidos con $390 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 y $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en el estadio de grano lechoso tardío de la cebada (88 ± 1 d.d.s.). Plantas de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

Con $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 en la medida y $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, las interacciones genotipo x disponibilidad hídrica significativas (Tabla 4.2) mostraron que el estrés hídrico disminuyó la fotosíntesis, la conductancia de los estomas, la concentración de CO_2 en los espacios intercelulares y la transpiración en todos los genotipos de cebada (Fig. 4.4), con la única excepción, de la fotosíntesis del cv. Harrington que tendió a disminuir sin llegar a alcanzar significación estadística (Fig. 4.4a). El descenso de la fotosíntesis, en comparación con las plantas de control hídrico, fue menos acusado que cuando la medida se realizó con $390 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 (Fig. 4.3a, 4.4a), aunque el efecto en los demás parámetros de intercambio gaseoso fue ligeramente más acentuado, estimándose en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente, en 5.3%, 12.6%, 27.2% y 26.1% para la A (Fig. 4.4a), 52.6%, 69.3%, 59.2% y 53.6% para la g_s (Fig. 4.4b), 49.5%, 65.7%, 50.3% y 49.4% para la E (Fig. 4.4d) y 14.8%, 18.02%, 13.3% y 8.9% para la C_i (Fig. 4.4c). En plantas de control hídrico, la fotosíntesis aumentó en Harrington y las líneas 8 y 89 en comparación con la línea 76 y en el cv. Harrington y la línea 8 respecto a la línea 89 (Fig. 4.4a), como ya se observó con $390 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 (Fig. 4.3a). La C_i fue mayor en la línea 76 que en la línea 89 (Fig. 4.4d). La g_s y la E fueron mayores en las otras líneas RCSL y el cv. Harrington que en la línea 89 (Fig. 4.4bd), igual que cuando la medida se realizó con $390 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 (Fig. 4.3bd), y mayores en Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.4bd). En plantas de déficit hídrico, la A, la g_s y la E aumentaron en el cv. Harrington en comparación con las líneas RCSL (Fig. 4.4abd), igual que con $390 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2

(Fig. 4.3abd). La E fue mayor en la línea 76 que en la línea 8 (Fig. 4.4d). La C_i aumentó en las líneas 76 y 89 en comparación con la línea 8 y en la línea 89 comparada con Harrington (Fig. 4.4c).

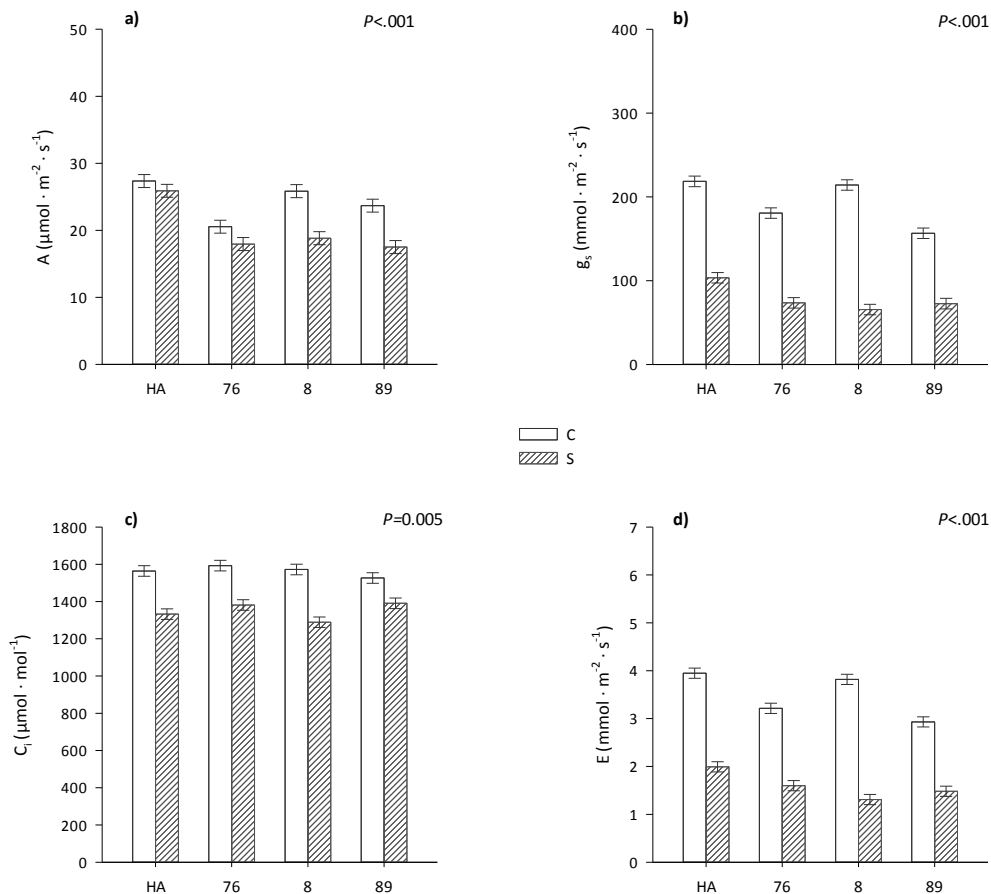


Figura 4.4. a) Asimilación fotosintética del carbono (A), b) conductancia de los estomas (g_s), c) concentración de CO_2 en los espacios intercelulares (C_i) y d) transpiración (E) medidos con $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 y $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en el estadio de grano lechoso tardío de la cebada (88 ± 1 d.d.s.). Plantas de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

4.1.2.- Efecto del déficit hídrico en el contenido de metabolitos de los genotipos de cebada.

Como se detalla en el apartado de descripción de los experimentos del capítulo de materiales y métodos, se recogieron muestras foliares, de las hojas bandera y penúltima conjuntamente, y del último entrenudo del tallo en los estadios de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano, grano lechoso tardío y grano pastoso temprano para la determinación de carbohidratos y compuestos nitrogenados. En etapas más tempranas del desarrollo foliar de las plantas de cebada, estadio vegetativo (49 d.d.s.), se recogieron también muestras foliares, correspondientes a la hoja más joven completamente extendida (sexta hoja), para cada repetición, genotipo y nivel de disponibilidad hídrica estudiado. Por ello, para el contenido de intermediarios metabólicos en las hojas de cebada se describirán cuatro estadios de desarrollo y para el último entrenudo del tallo únicamente tres etapas durante la post-antesis de las plantas.

4.1.2.1.- Contenido foliar de carbohidratos.

A los 49 d.d.s., el déficit hídrico condujo a un aumento muy próximo a la significación estadística ($P=0.053$) del contenido de almidón en la sexta hoja de las plantas de cebada (Tabla 4.3) y no tuvo efecto en los niveles foliares de glucosa, sacarosa, fructanos y carbohidratos solubles totales (Tabla 4.3). El contenido foliar de glucosa fue mayor en la línea 89 que en el cv. Harrington y las líneas RCSL 8 y 76 (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Contenido de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón a los 49 d.d.s. en la sexta hoja de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmol de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	214	127	40.0	4.97	2.28	66.5a
Sequía	238	156	38.3	3.38	2.23	94.6b
$P_{.05}$	ns	ns	ns	0.027	ns	0.053
SED				0.651		13.42
Genotipos						
cv. HA	239	152	40.4	3.61	2.32a	81.6
RCSL-76	177	108	32.8	2.08	1.44a	79.0
RCSL-8	221	138	39.4	2.11	1.68a	83.7
RCSL-89	268	168	43.9	8.88	3.58b	79.0
$P_{.05}$	ns	ns	ns	<.001	0.004	ns
SED				0.921	0.527	
Interacción						
GxT ($P_{.05}$)	ns	ns	ns	<.001	ns	ns
SED				1.302		

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

El análisis de la varianza del contenido foliar de fructosa alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.3), mostrando que el déficit hídrico redujo el contenido de fructosa en la línea 89 (Fig. 4.5). En plantas de control hídrico, el contenido de fructosa de la línea 89 fue mayor que en los demás genotipos de cebada. En plantas de déficit hídrico, los niveles foliares de fructosa en la línea 89 tendieron a aumentar, sin llegar a alcanzar significación estadística, con respecto a la línea 8 (Fig. 4.5).

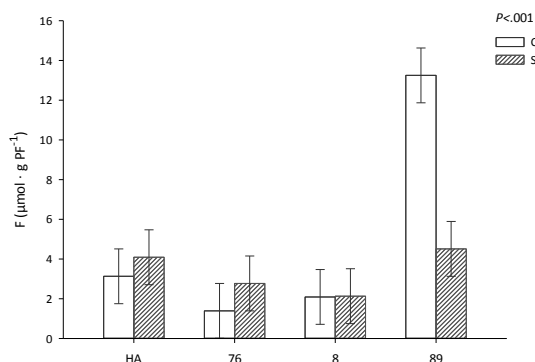


Figura 4.5. Contenido de fructosa a los 49 d.d.s. en la sexta hoja de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, L_{sd} .

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico condujo a una mayor acumulación foliar de carbohidratos solubles, como resultado del aumento del contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y fructanos, y no modificó el contenido foliar de almidón (Tabla 4.4). En la línea 89, el contenido foliar de fructanos y fructosa fue mayor que en los otros genotipos de cebada, y el de glucosa mayor que en el cv. Harrington y la línea 76. El contenido de fructosa aumentó en la línea 8 en comparación con el cv. Harrington (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Contenido foliar de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmoles de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas} \cdot \text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa} \cdot \text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	100.9a	17.6	40.4a	1.22a	1.25a	15.21
Sequía	135.5b	28.4	49.9b	3.84b	3.54b	17.45
$P_{.05}$	<.001	0.001	<.001	<.001	0.011	ns
SED	6.520	2.770	2.160	0.392	0.335	
Genotipos						
cv. HA	121.4	21.4	48.6	1.14a	1.62a	17.61
RCSL-76	114.7	16.4	47.1	2.09a	2.09a	14.55
RCSL-8	108.4	20.2	41.7	2.32b	2.44ab	17.85
RCSL-89	128.3	34.2	43.1	4.52c	3.43b	15.29
$P_{.05}$	ns	0.002	ns	<.001	<.001	ns
SED		3.91		0.555	0.474	
Interacción						
GxT ($P_{.05}$)	ns	0.053	ns	ns	ns	ns
SED		5.540				

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

La interacción genotipo x disponibilidad hídrica estuvo próxima a la significación ($P=0.053$) en el análisis de la varianza del contenido de fructanos (Tabla 4.4), observándose cómo el déficit hídrico aumentó el contenido de fructanos en la línea 89 (Fig. 4.6). En plantas de control hídrico, el contenido de fructanos no varió significativamente entre los distintos genotipos de cebada (Fig. 4.6). En plantas de déficit hídrico, la acumulación de fructanos fue notablemente mayor en la línea 89 que en el cv. Harrington y las líneas 8 y 76 (Fig. 4.6).

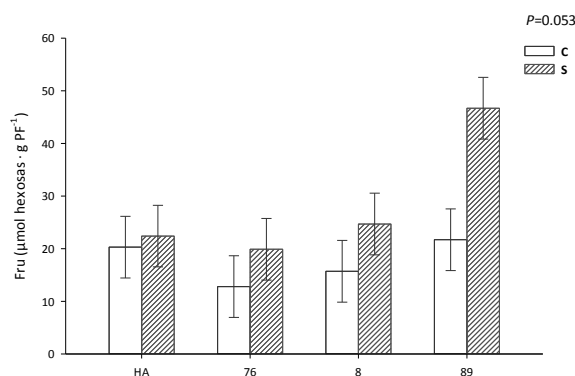


Figura 4.6. Contenido foliar de fructanos (Fru) en el inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

En el estadio de grano lechoso tardío, el déficit hídrico condujo a un incremento significativo del contenido foliar de fructosa, glucosa, sacarosa y almidón (Tabla 4.5). En la línea 89, el contenido foliar de almidón aumentó en comparación con la línea 76 y Harrington y tendió a aumentar, sin llegar a alcanzar significación estadística, en comparación con la línea 8. La acumulación de almidón fue también mayor en la línea 8 que en la línea 76 (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Contenido foliar de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el estadio de grano lechoso tardío (88 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmoles de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	159	70	43.9a	0.75a	0.99	12.3a
Sequía	235	111	58.2b	3.74b	3.90	23.5b
$P_{.05}$	0.004	ns	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	27.60		2.610	0.659	0.664	2.190
Genotipos						
cv. HA	288	173	55.8	1.71	2.39	16.1ab
RCSL-76	134	27	50.2	3.14	3.61	11.6b
RCSL-8	217	118	48.1	1.52	1.80	18.8ac
RCSL-89	150	45	50.1	2.61	1.98	25.1c
$P_{.05}$	0.014	0.003	ns	ns	ns	0.004
SED	39.00	36.00				3.100
Interacción						
GxT ($P_{.05}$)	0.016	0.009	ns	ns	0.054	ns
SED	55.10	50.90			1.329	

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

El análisis de la varianza del contenido foliar de fructanos y carbohidratos solubles totales alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica y estuvo próximo a la significación ($P=0.054$) el del contenido de glucosa (Tabla 4.5), indicando que el déficit hídrico incrementó significativamente los niveles de fructanos y carbohidratos solubles en la línea 8 (Fig. 4.7ba), y de glucosa en la línea 76 y Harrington (Fig. 4.7c). En condiciones de control hídrico, la acumulación de fructanos y carbohidratos solubles fue mayor en el cv. Harrington que en las líneas RCSL (Fig. 4.7ba), mientras que los niveles de glucosa no variaron entre genotipos (Fig. 4.7c). En condiciones de sequía, la línea 76 tuvo un mayor contenido foliar de glucosa que los restantes genotipos de cebada (Fig. 4.7c). En la línea 8, el contenido de carbohidratos solubles totales y fructanos fue mayor que en las otras líneas RCSL (Fig. 4.7ab).

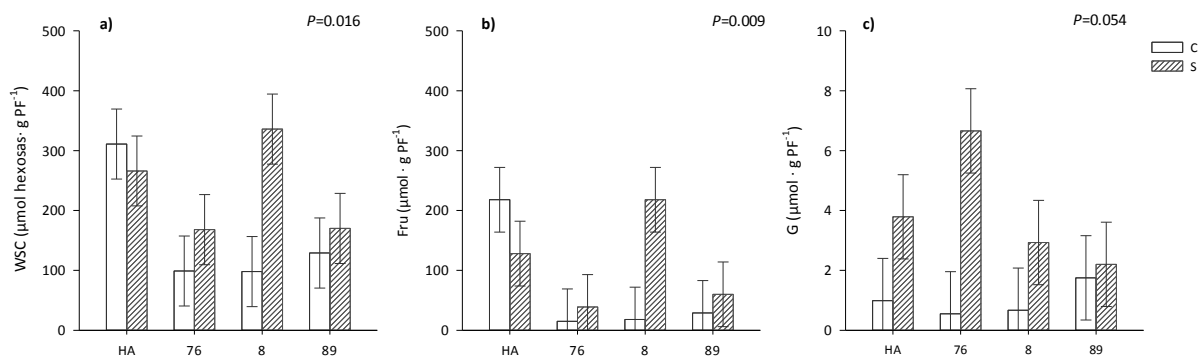


Figura 4.7. Contenido foliar de **a)** carbohidratos solubles en agua (WSC), **b)** fructanos (Fru) y **c)** glucosa (G) en el estadio de grano lechoso tardío (88 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

En el estadio de grano pastoso temprano, el déficit hídrico incrementó el contenido de fructanos y carbohidratos solubles de las hojas y no tuvo efecto en el contenido de sacarosa, glucosa, fructosa y almidón (Tabla 4.6). La acumulación de glucosa fue mayor en la línea 89 que en los otros genotipos de cebada, y la de fructosa mayor en las líneas 89 y 8 que en la línea 76 y Harrington (Tabla 4.6). El contenido de carbohidratos solubles, sacarosa y almidón aumentó en el cv. Harrington y las líneas 76 y 8 en comparación con la línea 89 (Tabla 4.6). En el cv. Harrington, el nivel foliar de sacarosa fue mayor que en la línea 8 y tendió a aumentar, sin llegar a alcanzar significación estadística, en comparación con la línea 76 (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Contenido foliar de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el estadio de grano pastoso temprano (103 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmoles de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas} \cdot \text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa} \cdot \text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en **negrita**. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	101.2a	26.0a	32.9	4.7	4.79	11.8
Sequía	137.7b	55.4b	35.1	6.8	5.14	14.8
<i>P</i> _{.05}	0.016	0.009	ns	ns	ns	ns
SED	13.54	9.830				
Genotipos						
cv. HA	155.8a	47.6	51.1a	3.23a	2.75a	18.1a
RCSL-76	132.2a	43.3	40.9ab	3.25a	3.91a	19.6a
RCSL-8	133.2a	53.5	33.9b	7.30b	4.55a	13.4a
RCSL-89	56.6b	18.5	10.1c	9.22b	8.64b	2.0b
<i>P</i> _{.0.5}	<.001	ns	<.001	0.004	0.010	0.011
SED	19.15		5.240	1.663	1.574	4.960
Interacción						
GxT (<i>P</i> _{.0.5})	ns	ns	ns	ns	ns	ns

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

4.1.2.1.1.- Grado de polimerización de los fructanos de las hojas.

En este experimento no sólo se estimó el contenido de fructanos por análisis enzimáticos sino también su grado de polimerización (DP, *Degree of Polymerization*) mediante HPAEC-PAD. La separación cromatográfica de los fructanos tanto de las hojas como del último entrenudo del tallo ha

permitido su agrupación en fructanos de bajo, medio y alto grado de polimerización (ver apartado correspondiente en el capítulo de materiales y métodos).

A los 49 d.d.s., el déficit hídrico no tuvo efecto en la fracción de fructanos de bajo, medio y alto grado de polimerización de la sexta hoja de las plantas de cebada y el grado de polimerización de los fructanos no varió significativamente entre genotipos (Tabla 4.7). Hubo un predominio de fructanos de grado de polimerización bajo y medio con respecto a aquellos de DP alto (Tabla 4.7). Además, independientemente del grado de polimerización, los fructanos de la sexta hoja de las plantas de cebada fueron superiores a aquellos mostrados por las hojas bandera y penúltima del tallo principal de la planta en fases más avanzadas del desarrollo (Tabla 4.7).

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico incrementó, en comparación con las plantas de control hídrico, la fracción de fructanos foliares de bajo y alto grado de polimerización en un 24.2% y 33.1%, respectivamente, y no modificó significativamente los fructanos de grado de polimerización medio (Tabla 4.7). La acumulación de fructanos de bajo y alto grado de polimerización fue notablemente mayor en la línea 89 que en las otras líneas RCSL y Harrington (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Grado de polimerización (DP) de los fructanos en los estadios de desarrollo vegetativo (49 d.d.s.), inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.), grano lechoso tardío (88 ± 1 d.d.s.) y grano pastoso temprano (103 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones (n=3); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

d.d.s.		Tratamientos				Genotipos				GxT			
		C	S	<i>P</i> _{0.05}	SED	HA	76	8	89	<i>P</i> _{0.05}	SED	<i>P</i> _{0.05}	SED
49	Bajo	26.4	21.6	ns		23.9	18.3	24.7	29.3	ns		ns	
	Medio	26.9	26.9	ns		29.3	19.9	26.2	32.3	ns		ns	
	Alto	10.1	11.0	ns		11.9	7.8	10.2	12.3	ns		ns	
71 ± 2	Bajo	4.82a	6.36b	0.024	0.662	4.84a	3.87a	5.58a	8.07b	0.001	0.880	ns	
	Medio	5.81	6.29	ns		5.52	5.75	5.21	7.71	ns		ns	
	Alto	1.72a	2.57b	0.021	0.335	1.54a	1.17a	1.89a	3.98b	<0.001	0.473	ns	
88 ± 1	Bajo	4.62a	8.21b	0.018	0.840	5.31a	5.91a	5.39a	9.05b	<0.001	1.188	ns	
	Medio	4.76	6.99	<0.001	0.438	5.22	5.48	4.10	8.70	<0.001	0.619	<0.001	0.875
	Alto	1.47	3.49	<0.001	0.338	1.53	1.60	2.31	4.49	<0.001	0.478	0.003	0.676
103 ± 1	Bajo	4.20a	6.70b	<0.001	0.599	5.23	5.29	6.19	5.09	ns		ns	
	Medio	3.57a	6.50b	0.003	0.846	6.21a	5.99a	5.56a	2.38b	0.018	1.196	ns	
	Alto	1.34a	4.27b	<0.001	0.673	3.59a	3.43a	3.30a	0.90b	0.037	0.951	ns	

Los datos se expresan en unidades arbitrarias. d.d.s. días después de la siembra. ns, sin significación estadística.

En el estadio de grano lechoso tardío, el déficit hídrico incrementó, en comparación con las plantas de control hídrico, la fracción de fructanos foliares de bajo peso molecular en un 43.73% (Tabla 4.7). La fracción de fructanos de bajo grado de polimerización fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos de cebada (Tabla 4.7).

En el análisis de la varianza de la fracción de fructanos de grado de polimerización medio y alto, la interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.7) mostró que el estrés hídrico

condujo a una mayor acumulación de fructanos de medio y alto grado de polimerización en las líneas 8 y 89 (Fig. 4.8). En plantas de control hídrico, los fructanos de DP medio fueron mayores en el cv. Harrington y las líneas 89 y 76 que en la línea 8 (Fig. 4.8a). En plantas de déficit hídrico, las fracciones de fructanos de DP medio y alto aumentaron en la línea 89 con respecto a los demás genotipos (Fig. 4.8).

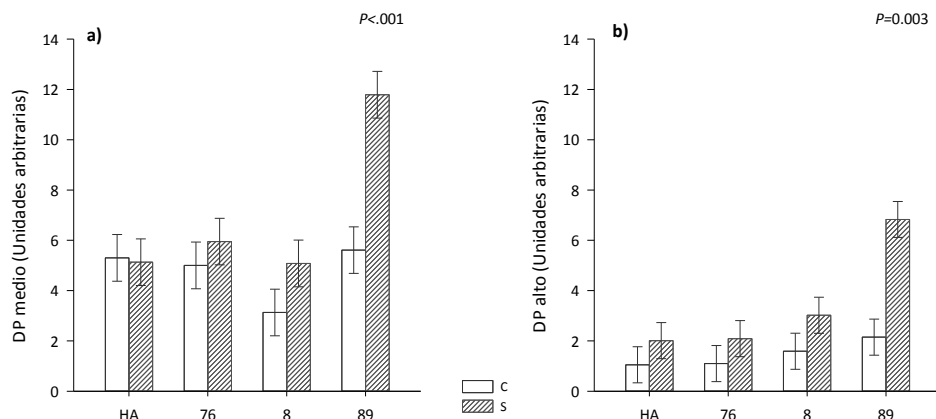


Figura 4.8. Fructanos foliares de **a)** grado de polimerización medio (DP medio) y **b)** grado de polimerización alto (DP alto) en el estadio de grano lechoso tardío (88 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

En el estadio de grano pastoso temprano, la sequía incrementó, en comparación con las plantas de control hídrico, la fracción de fructanos de grado de polimerización bajo, medio y alto en un 37.3%, 45.1% y 68.6%, respectivamente (Tabla 4.7). Los fructanos de DP bajo no variaron significativamente entre genotipos. Los fructanos de DP medio y alto aumentaron en Harrington y las líneas 76 y 8 en comparación con la línea RCL 89 (Tabla 4.7).

4.1.2.2.- Contenido de carbohidratos en el último entrenudo del tallo principal.

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico incrementó, en comparación con las plantas de control hídrico, el contenido de carbohidratos solubles en el último entrenudo del tallo principal, como resultado del aumento de glucosa, sacarosa y fructanos (Tabla 4.8), y no tuvo efecto en la acumulación de carbohidratos insolubles como el almidón (Tabla 4.8). En la línea 89, la acumulación de carbohidratos solubles y fructanos en el último entrenudo del tallo fue mayor que en el resto de genotipos, y mayor en Harrington y la línea 8 que en la línea 76, aunque los fructanos de la línea 8 no llegaron a la significación (Tabla 4.8). Los fructanos representaron el 52.7%, 24.2%, 12.3% y 30.7% del total de carbohidratos solubles del último entrenudo del tallo en las líneas 89, 8, 76 y el cv. Harrington, respectivamente, lo que sugiere una mayor partición del carbono hacia los fructanos en la línea 89 (Tabla 4.8). En las líneas 8 y 89 el contenido de glucosa fue mayor que en la línea 76 y Harrington (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Contenido de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el último entrenudo del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmol de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas} \cdot \text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa} \cdot \text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	126.2a	36.5a	21.76a	25.5	20.62a	4.61
Sequía	174.1b	71.5b	26.98b	24.5	24.17b	4.26
$P_{.05}$	<.001	<.001	0.003	ns	0.049	ns
SED	9.720	8.270	1.460		1.669	
Genotipos						
cv. HA	128.8a	39.5a	24.65	19.6	17.43a	4.26
RCSL-76	83.0b	10.2b	21.07	15.5	15.10a	5.18
RCSL-8	140.7a	34.0ab	24.80	28.9	28.16b	4.52
RCSL-89	251.2c	132.4c	26.97	36.0	28.89b	3.77
$P_{.05}$	<.001	<.001	ns	<.001	<.001	ns
SED	13.74	11.69		3.110	2.360	
Interacción						
GxT ($P_{.05}$)	ns	ns	ns	0.037	ns	ns
SED				4.400		

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

La interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.8) mostró que el déficit hídrico redujo significativamente el contenido de fructosa del último entrenudo del tallo de la línea 89 (Fig. 4.9). En plantas de control hídrico, el contenido de fructosa fue mayor en la línea 89 que en el resto de genotipos de cebada, y mayor en la línea 8 que en la línea 76. En plantas de déficit hídrico, la acumulación de fructosa fue mayor en las líneas 8 y 89 que en la línea 76 y el cv. Harrington (Fig. 4.9).

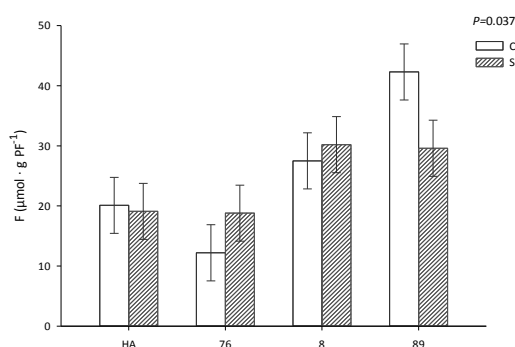


Figura 4.9. Contenido de fructosa (F) en el último entrenudo del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

En el estadio de grano lechoso tardío, el déficit hídrico condujo a un aumento del contenido de sacarosa y carbohidratos solubles en el último entrenudo del tallo principal (Tabla 4.9). El contenido de sacarosa aumentó en la línea 89 y Harrington en comparación con la línea 76 (Tabla 4.9). La acumulación de carbohidratos solubles y fructanos fue mayor en la línea 89 que en los otros genotipos de cebada, y mayor a su vez en el cv. Harrington y la línea 8 que en la línea 76. De los carbohidratos solubles totales en el último entrenudo del tallo, los fructanos representaron el 78.9%, 69.5%, 40.2% y 63.2% en las líneas 89, 8, 76 y Harrington, respectivamente.

Tabla 4.9. Contenido de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el último entrenado del tallo principal en el estadio de grano lechoso tardío (88 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmol de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	185a	125	25.75a	4.68	4.27	2.96
Sequía	264b	183	33.40b	7.53	6.48	5.06
$P_{.05}$	0.024	ns	<.001	<.001	0.006	<.001
SED	31.40		1.761	0.640	0.699	0.397
Genotipos						
cv. HA	209a	132a	32.03a	5.89	6.67	3.30
RCSL-76	102b	41b	25.86b	4.74	4.60	3.89
RCSL-8	220a	153a	28.01ab	5.59	5.39	3.44
RCSL-89	369c	291c	32.40a	8.19	4.86	5.42
$P_{.05}$	<.001	<.001	0.049	0.010	ns	0.006
SED	44.40	40.60	2.490	0.905		0.562
Interacción						
GxT ($P_{.05}$)	ns	ns	ns	0.011	0.019	0.010
SED				1.280	1.398	0.794

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

En el análisis de la varianza del contenido de glucosa, fructosa y almidón, la interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.9) mostró que el déficit hídrico aumentó el contenido de almidón, fructosa y glucosa en la línea 76, y de almidón y fructosa en la línea 8 (Fig. 4.10). En plantas de control hídrico, los niveles de almidón y fructosa fueron mayores en la línea 89 que en los otros genotipos (Fig. 4.10ca), y los de fructosa mayores en Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.10a). El contenido de glucosa fue mayor en la línea 89 y el cv. Harrington que en la línea 76 (Fig. 4.10b). En plantas de déficit hídrico, el contenido de almidón aumentó en la línea 76 en comparación con la línea 8 y Harrington, y en la línea 89 en comparación con el cv. Harrington (Fig. 4.10c). El contenido de glucosa en el último entrenado del tallo fue mayor en la línea 76 que en la línea 89 (Fig. 4.10b).

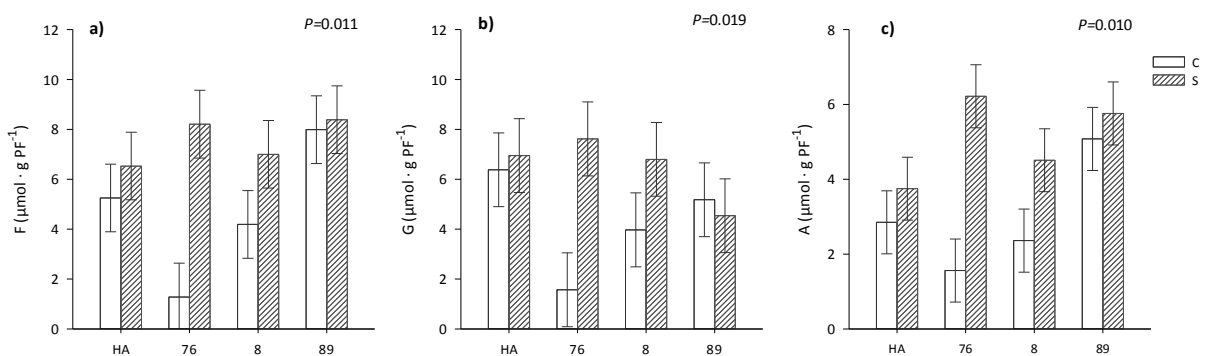


Figura 4.10. Contenido de **a)** fructosa (F), **b)** glucosa (G) y **c)** almidón (A) en el último entrenado del tallo principal en el estadio de grano lechoso tardío (88 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

En el estadio de grano pastoso temprano, el déficit hídrico incrementó los niveles de sacarosa y almidón en el último entrenudo del tallo principal y no tuvo efecto en el contenido de glucosa y fructosa (Tabla 4.10). El contenido de glucosa, sacarosa y almidón fue mayor en el cv. Harrington y las líneas 76 y 8 que en la línea 89, el de almidón mayor en la línea 76 que en la línea 8 y Harrington, y el de sacarosa mayor en el cv. Harrington y la línea 76 que en la línea 8 (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Contenido de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el último entrenudo del tallo principal en el estadio de grano pastoso temprano (103 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmol de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	156.6	97.5	22.61a	8.95	4.95	3.06a
Sequía	192.9	128.8	26.02b	8.19	3.89	4.52b
$P_{.05}$	0.054	ns	0.046	ns	ns	0.037
SED	17.49		1.578			0.638
Genotipos						
cv. HA	245.6	170.6	31.54a	7.03	4.88a	3.73a
RCSL-76	170.1	97.3	30.34a	6.56	5.56a	6.32b
RCSL-8	203.3	138.5	24.66b	10.84	4.68a	4.13a
RCSL-89	80.0	46.2	10.71c	9.85	2.57b	0.98c
$P_{.05}$	<.001	<.001	<.001	ns	0.042	<.001
SED	24.73	22.18	2.232		0.985	0.902
Interacción						
GxT ($P_{.05}$)	0.021	0.023	ns	ns	ns	ns
SED	34.97	31.37				

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

El análisis estadístico de los contenidos de carbohidratos solubles en agua y de fructanos alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.10), indicativa de que la sequía condujo a una mayor acumulación de carbohidratos solubles y fructanos en la línea 8 (Fig. 4.11ab). En condiciones de control hídrico, la acumulación de carbohidratos solubles y de fructanos fue mayor en Harrington que en las líneas RCSL (Fig. 4.11). En plantas de déficit hídrico, el contenido de carbohidratos solubles y fructanos aumentó en Harrington y las líneas 8 y 76 en comparación con la línea 89 (Fig. 4.11).

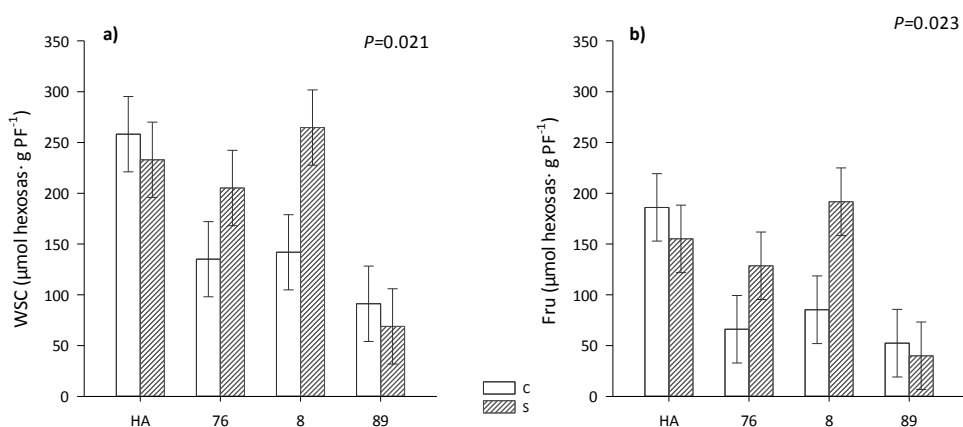


Figura 4.11. Contenido de **a)** carbohidratos solubles en agua (WSC) y **b)** fructanos (Fru) en el último entrenudo del tallo principal en el estadio de grano pastoso temprano (103 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

4.1.2.2.1.- Grado de polimerización de los fructanos en el último entrenudo del tallo.

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico incrementó, en comparación con las plantas de control hídrico, la fracción de fructanos de bajo, medio y alto grado de polimerización en un 41%, 54.2% y 33.3%, respectivamente (Tabla 4.11). La acumulación de fructanos cualquiera que fuese su grado de polimerización fue mayor en la línea 89 que en Harrington y las líneas 76 y 8 (Tabla 4.11). En Harrington, los fructanos de DP bajo aumentaron en comparación con las líneas 8 y 76, y los fructanos de DP alto con respecto a la línea 76 (Tabla 4.11).

En el estadio de grano lechoso tardío, el déficit hídrico aumentó, en comparación con las plantas de control hídrico, los fructanos de grado de polimerización medio en un 19.1% (Tabla 4.11). La fracción de fructanos de DP medio fue mayor en el cv. Harrington y las líneas 89 y 8 que en la línea 76, y mayor en la línea 89 que en el cv. Harrington (Tabla 4.11).

Tabla 4.11. Grado de polimerización (DP) de los fructanos del último entrenudo del tallo en los estadios de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.), grano lechoso tardío (88 ± 1 d.d.s.) y grano pastoso temprano (103 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

d.d.s.		Tratamientos				Genotipos				GxT			
		C	S	<i>P</i> _{.05}	SED	HA	76	8	89	<i>P</i> _{.05}	SED	<i>P</i> _{.05}	SED
71 ± 2	Bajo	4.31a	7.31b	0.003	0.872	5.73a	3.11b	3.14b	11.25c	<.001	1.233	ns	
	Medio	4.90a	10.70b	0.041	2.610	6.30a	6.10a	3.80a	15.10b	0.036	3.680	ns	
	Alto	2.28a	3.42b	0.011	0.395	2.27a	0.53b	1.61ab	6.98c	<.001	0.559	ns	
88 ± 1	Bajo	7.5	8.82	ns		7.76	4.65	9.35	10.87	<.001	1.034	0.009	1.462
	Medio	12.27a	15.17b	0.037	1.272	13.49a	5.94b	16.50ac	18.95c	<.001	1.798	ns	
	Alto	5.00	6.18	0.020	0.456	5.48	2.21	6.47	8.2	<.001	0.644	0.036	0.911
103 ± 1	Bajo	4.64	4.82	ns		5.07a	5.20a	5.35a	3.30b	0.025	0.673	ns	
	Medio	8.04	8.31	ns		10.96	8.28	9.2	4.25	<.001	1.184	0.030	1.675
	Alto	4.11	4.85	0.034	0.320	5.63	4.53	5.17	2.6	<.001	0.452	<.001	0.639

Los datos se expresan en unidades arbitrarias. d.d.s. días después de la siembra. ns, sin significación estadística.

En el análisis de la varianza de los fructanos de DP bajo y alto, la interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.11) mostró que el déficit hídrico incrementó los fructanos de ambos grado de polimerización en la línea 76 (Fig. 4.12). En condiciones de control hídrico, la fracción de fructanos de DP bajo y alto aumentó en Harrington y las líneas 89 y 8 en comparación con la línea 76 (Fig. 4.12). En condiciones de estrés hídrico, la acumulación de fructanos de DP bajo y alto fue mayor en la línea 89 que en la línea 76 y el cv. Harrington (Fig. 4.12). En la línea 8, los fructanos de DP bajo aumentaron con respecto al cv. Harrington, y los fructanos de DP alto en comparación con la línea 76 y Harrington (Fig. 4.12ab).

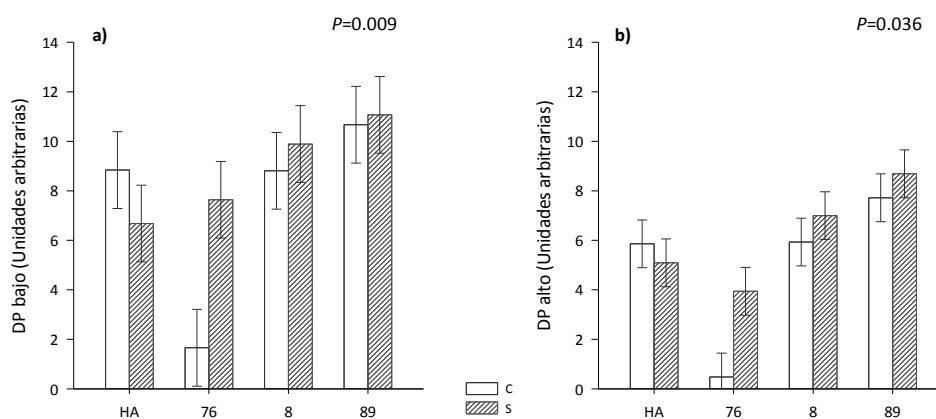


Figura 4.12. Fructanos de **a)** grado de polimerización bajo (DP bajo) y **b)** grado de polimerización alto (DP alto) del último entrenudo del tallo, en el estadio de grano lechoso tardío (88 ± 1 d.d.s.), de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Isd.

En el estadio de grano pastoso temprano, los fructanos de grado de polimerización bajo no variaron con el déficit hídrico (Tabla 4.11). Los fructanos de DP bajo aumentaron en el cv. Harrington y las líneas 8 y 76 en comparación con la línea 89 (Tabla 4.11).

En el análisis de la varianza de los fructanos de DP medio y alto, la interacción significativa (Tabla 4.11) mostró que la sequía redujo los fructanos de DP alto en el cv. Harrington, y los aumentó en las líneas 76 y 8 (Fig. 4.13b). En condiciones de control hídrico, la acumulación de fructanos de DP medio y alto fue mayor en Harrington que en las líneas RCSL (Fig. 4.13). En condiciones de déficit hídrico, la fracción de fructanos de DP medio y alto fue mayor en Harrington y las líneas 8 y 76 que en la línea 89 (Fig. 4.13). Los fructanos de DP alto aumentaron, en comparación con el cv. Harrington, en la línea 8 y, sin llegar a alcanzar significación estadística, en la 76 (Fig. 4.13b).

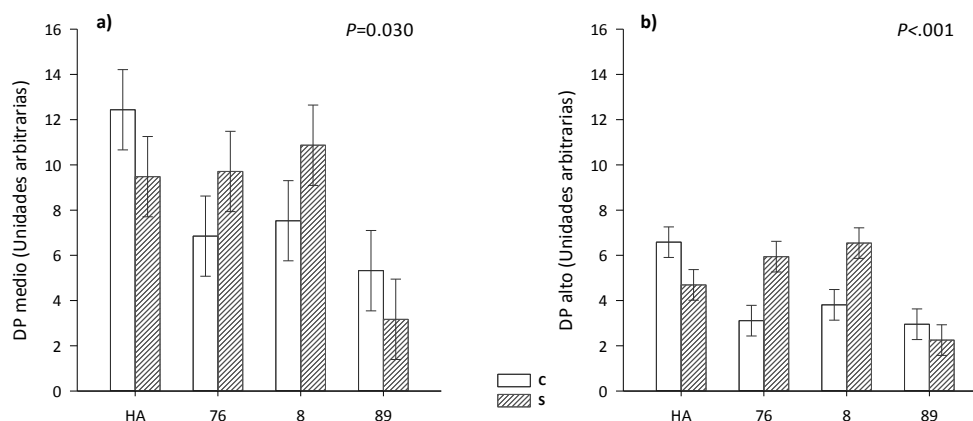


Figura 4.13. Fructanos de **a)** grado de polimerización medio (DP medio) y **b)** grado de polimerización alto (DP alto) del último entrenudo del tallo, en el estadio de grano pastoso temprano (103 ± 1 d.d.s.), de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Isd.

4.1.2.3.- Contenido foliar de clorofilas, aminoácidos y proteínas.

A los 49 días después de la siembra, el déficit hídrico disminuyó, en comparación con las plantas de control hídrico, el contenido de clorofilas en un 17.4% y no tuvo efecto en el contenido de aminoácidos y proteínas foliares (Tabla 4.12). El contenido de proteínas foliares fue mayor en la línea 89 que en las otras líneas RCSL, y mayor a su vez en el cv. Harrington que en la línea 8 (Tabla 4.12).

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico condujo, en comparación con las plantas de control hídrico, a un descenso del contenido foliar de clorofilas de las hojas bandera y penúltima del tallo principal, que se estimó en un 9.5% (Tabla 4.12) y, como ocurrió en la anterior etapa del desarrollo foliar de la cebada, no modificó el contenido de aminoácidos y proteínas. Entre genotipos, el contenido de clorofilas fue mayor en las líneas 8 y 76 que en la línea 89 (Tabla 4.12). En el cv. Harrington, el contenido foliar de aminoácidos aumentó en comparación con las líneas RCSL (Tabla 4.12).

Tabla 4.12. Contenido de clorofila total (Chl, mg-g PF⁻¹), proteína soluble (Prot, mg-g PF⁻¹) y aminoácidos foliares (Aa, μmol-g PF⁻¹) en los estadios de desarrollo vegetativo (49 d.d.s.), inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.), grano lechoso tardío (88 ± 1 d.d.s.) y grano pastoso temprano (103 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones (n=3); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

d.d.s.		Tratamientos				Genotipos					GxT	
		C	S	<i>P</i> .05	SED	HA	76	8	89	<i>P</i> .0.5	SED	<i>P</i> .0.5
49	Chl	2.18a	1.80b	0.006	0.118	1.95	2.07	1.88	2.06	ns		ns
	Prot	17.7	19.6	ns		20.01ac	17.23ab	16.23b	21.33c	0.042	1.810	ns
	Aa	26.57	25.54	ns		27.32	25.53	26.89	24.49	ns		ns
71 ± 2	Chl	3.37a	3.05b	0.047	0.149	3.20ab	3.56a	3.27a	2.82b	0.025	0.211	ns
	Prot	30.9	28.6	ns		30.38	31.16	27.5	30.2	ns		ns
	Aa	40.5	38.6	ns		44.41a	38.78b	36.43b	38.72b	0.017	2.250	ns
88 ± 1	Chl	3.05a	2.57b	0.018	0.183	3.28a	3.04a	2.45b	2.45b	0.010	0.259	ns
	Prot	27.70a	24.45b	0.017	1.219	26.72ab	30.11b	23.86a	23.60a	0.005	1.724	ns
	Aa	52.5a	40.5b	0.007	3.870	48.7	47.7	44.9	44.7	ns		ns
103 ± 1	Chl	2.11a	1.33b	<.001	0.197	2.84a	2.12b	1.40c	0.53d	<.001	0.264	ns
	Prot	22.37a	18.11b	<.001	1.011	28.32a	21.01b	16.08c	15.53c	<.001	1.430	ns
	Aa	65.1a	50.7b	0.041	6.470	42.3a	54.5a	54.4a	70.4b	0.005	9.150	ns

d.d.s. días después de la siembra. ns, sin significación estadística.

En el estadio de grano lechoso tardío, el déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, el contenido de clorofilas, aminoácidos y proteínas en un 15.7%, 22.9 % y 11.7%, respectivamente (Tabla 4.12). Los niveles de clorofilas fueron mayores en la línea 76 y Harrington que en las líneas 8 y 89 (Tabla 4.12). El contenido de proteínas foliares aumentó en la línea 76 en comparación con las otras líneas RCSL y tendió a aumentar, sin lograr alcanzar significación estadística, con respecto al cv. Harrington (Tabla 4.12).

En el estadio de grano pastoso temprano, la sequía disminuyó, con respecto a las plantas de control hídrico, los niveles de clorofilas, aminoácidos y proteínas en un 37%, 22.1% y 19%,

respectivamente (Tabla 4.12). El contenido de clorofilas fue mayor en el cv. Harrington que en las líneas RCSL, mayor en las líneas 76 y 8 que en la línea 89, y mayor a su vez en la línea 76 que en la línea 8 (Tabla 4.12). El contenido de aminoácidos aumentó en la línea 89 en comparación con los demás genotipos. El nivel de proteínas fue mayor en Harrington que en las líneas RCSL, y mayor en la línea 76 que en las otras líneas RCSL (Tabla 4.12).

4.1.2.4.- Contenido de aminoácidos y proteínas en el último entrenudo del tallo principal.

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico incrementó, en comparación con las plantas de control hídrico, el contenido de aminoácidos y proteínas en el último entrenudo del tallo principal en un 11.9% y 14.1%, respectivamente (Tabla 4.13). Los niveles de proteínas fueron mayores en la línea 76 que en el cv. Harrington y la línea 89 (Tabla 4.13).

En el estadio de grano lechoso tardío, el déficit hídrico no tuvo efecto en los niveles de aminoácidos y proteínas en el último entrenudo del tallo y entre genotipos no hubo diferencias significativas (Tabla 4.13).

En el estadio de grano pastoso temprano, el déficit hídrico aumentó, en comparación con las plantas de control hídrico, el contenido de aminoácidos en el último entrenudo del tallo en un 8.1% y no tuvo efecto en el contenido de proteínas (Tabla 4.13). Los niveles de aminoácidos aumentaron en la línea 8 en comparación con los otros genotipos y en la línea 76 respecto a la línea 89 y Harrington (Tabla 4.13). El contenido de proteínas aumentó en el resto de genotipos en comparación con la línea 89 (Tabla 4.13).

Tabla 4.13. Contenido de proteínas solubles (Prot, mg·g PF⁻¹) y aminoácidos (Aa, μmol·g PF⁻¹) en el último entrenudo del tallo en los estadios de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.), grano lechoso tardío (88 ± 1 d.d.s.) y grano pastoso temprano (103 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones (n=3); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

d.d.s.		Tratamientos				Genotipos				GxT		
		C	S	<i>P</i> _{.05}	SED	HA	76	8	89	<i>P</i> _{.05}	SED	<i>P</i> _{.05}
71 ± 2	Prot	11.28a	13.13b	0.026	0.753	11.79a	14.44b	12.26ab	10.34a	0.012	1.065	ns
	Aa	22.42a	25.45b	0.004	0.909	24.13	25.50	24.32	21.79	ns		ns
88 ± 1	Prot	11.07	11.88	ns		10.39	11.86	11.77	11.90	ns		ns
	Aa	26.61	28.93	ns		28.72	28.07	28.25	26.04	ns		ns
103 ± 1	Prot	10.26	10.63	ns		12.65a	11.33a	10.64a	7.16b	<.001	0.963	ns
	Aa	29.66a	32.28b	0.016	0.977	27.63a	32.62b	35.87c	27.78a	<.001	1.392	ns

d.d.s. días después de la siembra. ns, sin significación estadística.

4.1.3.- Efecto del déficit hídrico en el crecimiento de los genotipos de cebada.

En este apartado se describen los resultados de la estimación del crecimiento de las plantas de cebada, para cada uno de los niveles de disponibilidad hídrica estudiados y genotipos, en las fases del

desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano, 71 ± 2 d.d.s., y en la madurez, 138 d.d.s. (ver apartado de descripción de los experimentos).

4.1.3.1.- Parámetros de crecimiento de las plantas de cebada al inicio del desarrollo del grano.

En el inicio del desarrollo del grano, para la estimación del crecimiento se recogió una planta para cada nivel hídrico estudiado, genotipo y repetición, y se separó el tallo principal del resto de la planta. El tallo principal a su vez fue fraccionado en espiga, hoja bandera y penúltima hoja agrupadas conjuntamente (ya que constituyen la muestra foliar recogida con nitrógeno líquido para el análisis de metabolitos foliares), resto de hojas, último entrenudo del tallo y resto del tallo, determinándose el peso fresco y seco y la superficie verde de cada una de las partes y del total del tallo principal.

4.1.3.1.1.- Contenido hídrico relativo de las hojas.

En el inicio del desarrollo del grano, se determinó el contenido hídrico relativo de las hojas bandera y penúltima del tallo principal (RWC, *relative water content*, ver apartado correspondiente en el capítulo de materiales y métodos). El déficit hídrico no tuvo efecto significativo en el contenido hídrico relativo de las hojas de cebada (87.58 y 86.96, lsd 3.312, RWC en plantas de control y déficit hídrico, respectivamente). El RWC de las hojas fue mayor en la línea 89 y el cv. Harrington que en la línea 76 (Fig. 4.14).

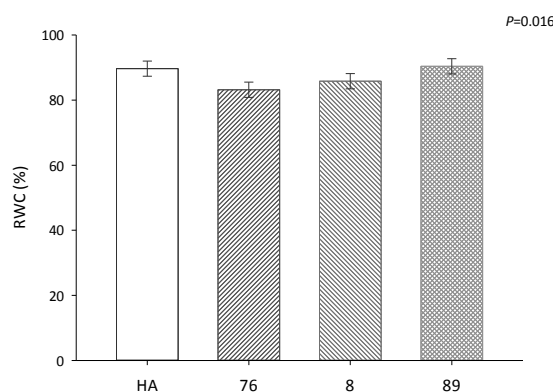


Figura 4.14. Contenido hídrico relativo (RWC) de las hojas de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

4.1.3.1.2.- Superficie verde de las partes del tallo principal.

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico no tuvo efecto en la superficie verde de las hojas, bandera y penúltima, y del último entrenudo del tallo (Tabla 4.14). El área verde foliar fue mayor en la línea 8 y el cultivar Harrington que en las líneas 76 y 89 (Tabla 4.14). La superficie verde del último entrenudo del tallo fue mayor en el resto de genotipos que en la línea 76 (Tabla 4.14).

Tabla 4.14. Superficie verde (cm²) de las diferentes partes del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y el cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones (n=3); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	E	Hojas	RH	UE	RT	TT	TP
Tratamientos							
Control	31.99	5.82	26.89	17.97	43.19	61.2	125.9
Sequía	27.02	5.64	13.32	16.84	30.93	47.8	93.8
<i>P</i> _{.05}	0.002	ns	<.001	ns	<.001	<.001	<.001
SED	1.383		1.519		1.971	2.24	4.11
Genotipos							
cv. HA	28.97	7.0a	17.98	18.40a	35.67	54.1	108.0
RCSL-76	20.34	4.20b	20.27	15.22b	26.06	40.3	85.1
RCSL-8	27.92	7.32a	16.74	17.13a	32.40	49.5	101.5
RCSL-89	40.80	4.40b	25.43	18.87a	55.12	74.0	144.6
<i>P</i> _{.05}	<.001	0.004	0.005	0.003	<.001	<.001	<.001
SED	1.956	0.916	2.148	0.871	2.787	3.170	5.820
Interacción							
GxT (<i>P</i> _{.05})	0.050	ns	<.001	ns	<.001	<.001	<.001
SED	2.766		3.038		3.942	4.480	8.220

(E) espiga, (Hojas) bandera y penúltima, (RH) resto de hojas, (UE) último entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo, (TT) total de la fracción tallo (suma del último entrenudo y resto del tallo) y (TP) tallo principal (suma de las diferentes partes). ns, sin significación estadística.

Las interacciones significativas genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.14) mostraron que el déficit hídrico redujo la superficie verde de la espiga, resto de hojas, resto y total del tallo y tallo principal en la línea 89 (Fig. 4.15), la del resto de hojas, resto y total del tallo, sin llegar a alcanzar significación estadística, y tallo principal en la línea 76 (Fig. 4.15bcde), la del resto de hojas en la línea 8 (Fig. 4.15b), y la del resto y total del tallo y tallo principal, sin llegar a alcanzar significación estadística, en el cv. Harrington (Fig. 4.15cde). En condiciones de control hídrico, la superficie verde de la espiga, resto de hojas, resto y total del tallo y tallo principal fue mayor en la línea 89 que en los otros genotipos (Fig. 4.15). El área verde de la espiga aumentó en el cv. Harrington y, sin llegar a alcanzar significación estadística, la línea 8 con respecto a la línea 76 (Fig. 4.15a). La superficie verde del resto de hojas fue mayor en la línea 76 que en el cv. Harrington y la línea 8 (Fig. 4.15b), y la del resto y total del tallo mayor en Harrington que en las líneas 76 y 8 (Fig. 4.15cd). En condiciones de déficit hídrico, la superficie verde de la espiga fue mayor en la línea 89 que en los otros genotipos de cebada, y mayor en la línea 8 y el cv. Harrington que en la línea 76 (Fig. 4.15a). La superficie verde del resto y total del tallo y del tallo principal aumentó en todos los genotipos en comparación con la línea 76 (Fig. 4.15cde).

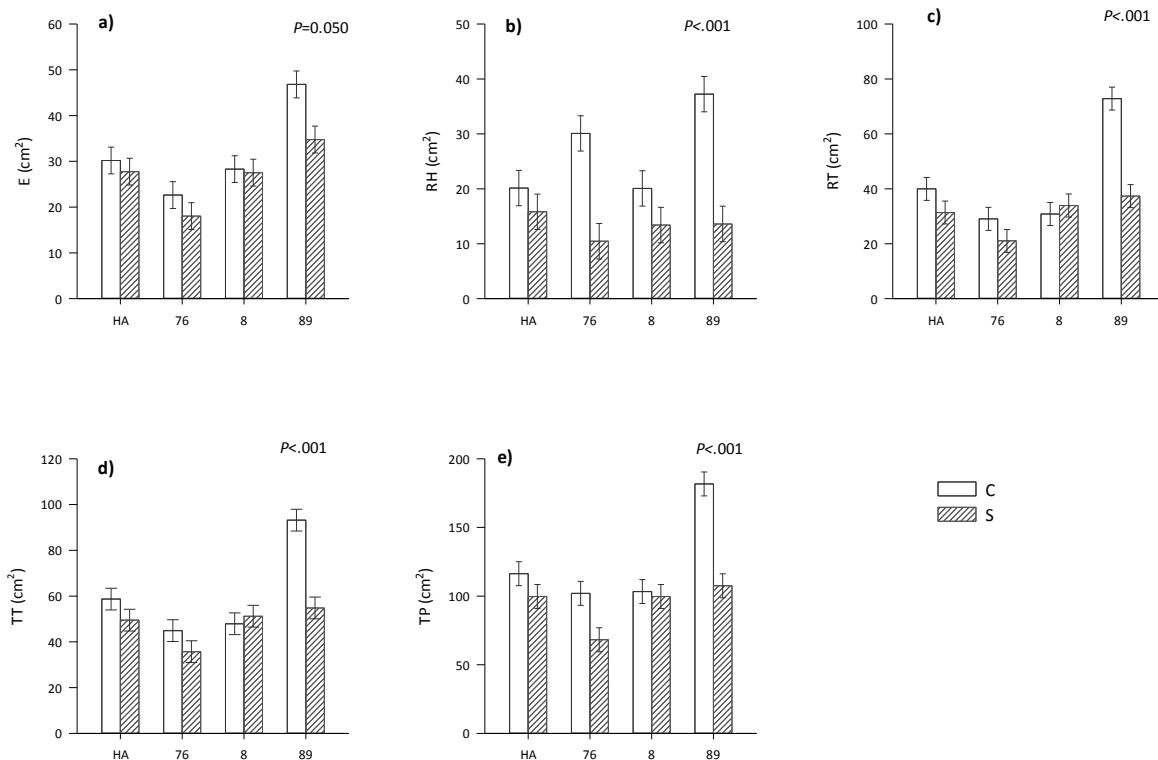


Figura 4.15. Superficie verde de las partes del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.). **a)** Espiga (E), **b)** resto de hojas (RH), **c)** resto del tallo (RT), **d)** total de la fracción tallo (TT) y **e)** tallo principal (TP) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

4.1.3.1.3.- Porcentaje de humedad de las partes del tallo principal.

En el inicio del desarrollo del grano, el estrés hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, el porcentaje de humedad del tallo principal y de algunas de las partes en las que fue fraccionado, tales como resto de hojas, último entrenudo y resto del tallo, y aumentó el porcentaje de humedad de las hojas en un 2.1% (Tabla 4.15). El contenido porcentual de humedad de la espiga, del último entrenudo y resto del tallo y del tallo principal completo aumentó en el cv. Harrington y las líneas 8 y 76 en comparación con la línea 89, y el del resto del tallo y del tallo principal completo en la línea 76 comparada con las líneas 8 y 89 (Tabla 4.15).

Tabla 4.15. Contenido porcentual de humedad (%) de las diferentes partes del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones (n=3); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	E	Hojas	RH	UE	RT	TP
Tratamientos						
Control	68.12	66.91a	74.35a	76.12a	79.64a	75.89a
Sequía	67.31	68.32b	71.77b	74.95b	77.17b	73.85b
<i>P</i> _{.05}	ns	0.045	<.001	0.046	0.003	0.008
SED		0.644	0.578	0.541	0.710	0.670
Genotipos						
cv. HA	68.39a	67.67	71.92	77.30a	79.63ab	75.86ab
RCL-76	68.87a	67.91	73.65	76.58a	81.18b	76.68b
RCL-8	67.76a	67.77	72.83	76.02a	78.34a	74.58a
RCL-89	65.83b	67.11	73.84	72.24b	74.48c	72.37c
<i>P</i> _{.05}	0.013	ns	ns	<.001	<.001	0.002
SED	0.848			0.765	1.004	0.947
Interacción						
GxT (<i>P</i> _{.05})	ns	ns	ns	ns	ns	ns

(E) espiga, (Hojas) bandera y penúltima, (RH) resto de hojas, (UE) último entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo y (TP) tallo principal (suma de las diferentes partes). ns, sin significación estadística.

4.1.3.1.4.- Peso seco de las partes del tallo principal.

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, el peso seco de las hojas y de la espiga en un 13% y 22.5%, respectivamente (Tabla 4.16). El peso de la espiga aumentó en la línea 89 en comparación con los otros genotipos y en la línea 8 comparada con la 76 (Tabla 4.16). El peso seco de las hojas fue mayor en el resto de genotipos que en la línea 76, y mayor en Harrington y la línea 8 que en la línea 89 (Tabla 4.16).

Tabla 4.16. Peso seco (g) de las diferentes partes del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones (n=3); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	E	Hojas	RH	UE	RT	TT	TP
Tratamientos							
Control	0.431a	0.046a	0.214	0.228	0.784	1.012	1.702
Sequía	0.334b	0.040b	0.150	0.204	0.548	0.752	1.276
<i>P</i> _{.05}	0.019	0.034	<.001	0.014	<.001	<.001	<.001
SED	0.037	0.002	0.014	0.009	0.045	0.049	0.075
Genotipos							
cv. HA	0.340ab	0.053a	0.172	0.214	0.562	0.776	1.341
RCL-76	0.248a	0.031b	0.165	0.162	0.377	0.538	0.982
RCL-8	0.407b	0.048a	0.157	0.201	0.551	0.752	1.365
RCL-89	0.534c	0.041c	0.234	0.289	1.173	1.461	2.270
<i>P</i> _{.05}	<.001	<.001	0.004	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	0.052	0.003	0.019	0.012	0.064	0.069	0.106
Interacción							
GxT (<i>P</i> _{.05})	ns	ns	<.001	0.005	<.001	<.001	<.001
SED			0.027	0.017	0.090	0.098	0.149

(E) espiga, (Hojas) bandera y penúltima, (RH) resto de hojas, (UE) último entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo, (TT) total de la fracción tallo (suma del último entrenudo y resto del tallo) y (TP) tallo principal (suma de las diferentes partes). ns, sin significación estadística.

La interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.16) mostró que el déficit hídrico redujo el peso seco del resto de hojas, último entrenudo del tallo, resto y total del tallo y tallo principal en la línea 89 (Fig. 4.16) y del resto de hojas en la línea 76 (Fig. 4.16a). En condiciones de control hídrico, el peso seco del resto de hojas, último entrenudo del tallo, resto y total del tallo y tallo principal aumentó en la línea 89 en comparación con las otras líneas RCSL y el cultivar Harrington (Fig. 4.16). El peso seco del último entrenudo y del total del tallo fue mayor en Harrington que en la línea 76 (Fig. 4.16bd), y el del resto de hojas mayor en la línea 76 que en la línea 8 (Fig. 4.16a). En condiciones de escasa disponibilidad hídrica, el peso seco del resto de hojas fue mayor en Harrington que en la línea 76 (Fig. 4.16a). El peso seco del último entrenudo del tallo, resto y total del tallo y tallo principal fue mayor en las otras líneas RCSL y el cv. Harrington que en la línea 76 (Fig. 4.16bcde), mayor el del último entrenudo del tallo en la línea 89 que en Harrington y la línea 8 (Fig. 4.16b), y mayor a su vez el del resto y total del tallo y del tallo principal en la línea 89 que en el cv. Harrington (Fig. 4.16cde).

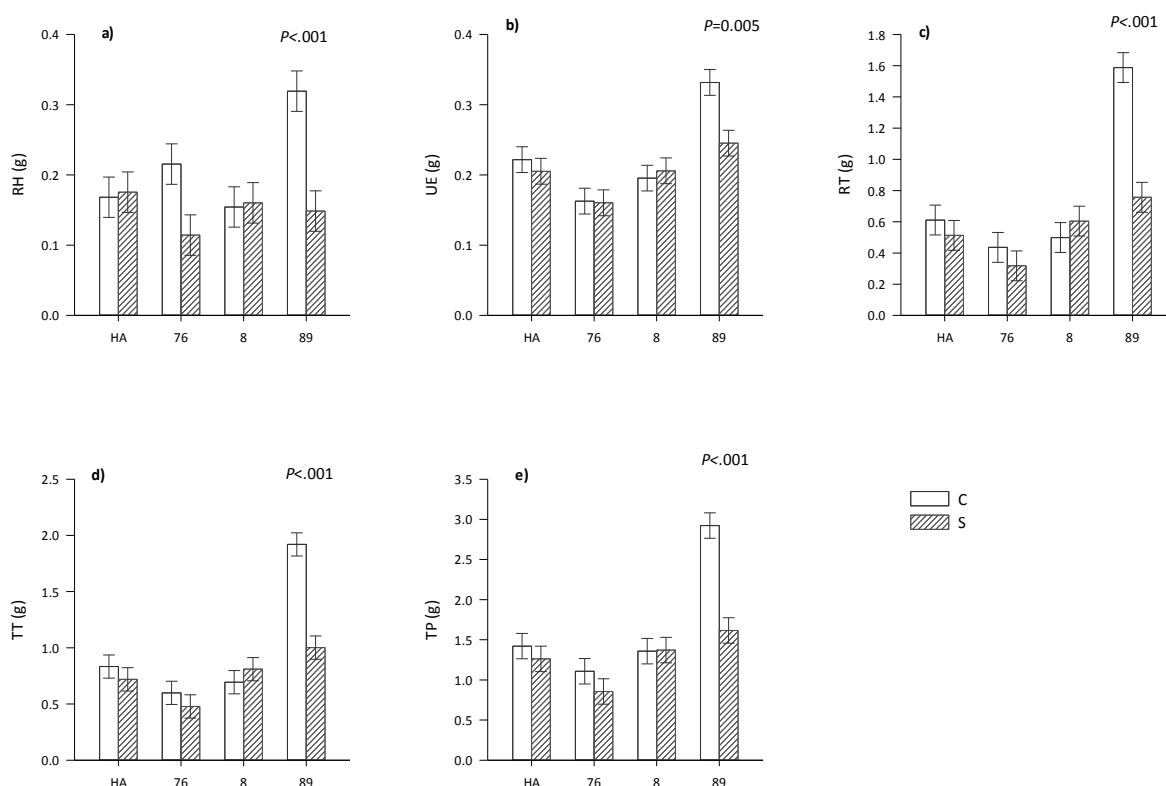


Figura 4.16. Peso seco de las partes del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.). **a)** Resto de hojas (RH), **b)** último entrenudo del tallo (UE), **c)** resto del tallo (RT), **d)** total de la fracción tallo (TT) y **e)** tallo principal (TP) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

4.1.3.1.5.- Longitud de las fracciones del tallo del tallo principal.

En el tallo principal, la fracción tallo se dividió en último entrenudo y resto del tallo y se estimó la longitud de cada una de las partes y el total.

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico redujo la longitud del último entrenudo del tallo (Tabla 4.17). La longitud del último entrenudo del tallo fue mayor en la línea 89 que en los otros genotipos de cebada, y mayor en Harrington y la línea 76 que en la línea 8 (Tabla 4.17).

Tabla 4.17. Longitud (cm) de las fracciones del tallo del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	Tratamientos		P.05	SED	Genotipos				P.05	SED	GxT	
	C	S			HA	76	8	89			P.05	SED
UE	22.61a	21.78b	<.001	0.205	22.35a	22.47a	20.67b	23.30c	<.001	0.290	ns	
RT	33.69	29.02	0.021	1.822	30.42	20.52	28.90	45.60	<.001	2.577	0.003	3.644
TT	56.30	50.81	0.010	1.877	52.77	42.98	49.57	68.90	<.001	2.655	0.003	3.755

(UE) último entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo y (TT) total de la fracción tallo (suma de la longitud del último entrenudo y resto del tallo). ns, sin significación estadística.

El análisis de la varianza de la longitud del resto y del total del tallo alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.17), indicativa de que el déficit hídrico disminuyó la longitud del resto y del total del tallo en la línea 89 (Fig. 4.17). En condiciones de amplia disponibilidad hídrica, la longitud del resto y del total del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con los demás genotipos (Fig. 4.17), la longitud del resto del tallo aumentó en la línea 8 y Harrington con respecto a la línea 76 (Fig. 4.17a), y la longitud del total del tallo aumentó en Harrington en comparación con la línea 76 (Fig. 4.17b). En condiciones de escasa disponibilidad hídrica, la longitud del resto del tallo fue mayor en la línea 89 que en el cv. Harrington y la línea 76, y mayor en la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.17a). En la línea 89, la longitud del total del tallo fue mayor que en las otras líneas RCSL y el cv. Harrington (Fig. 4.17b).

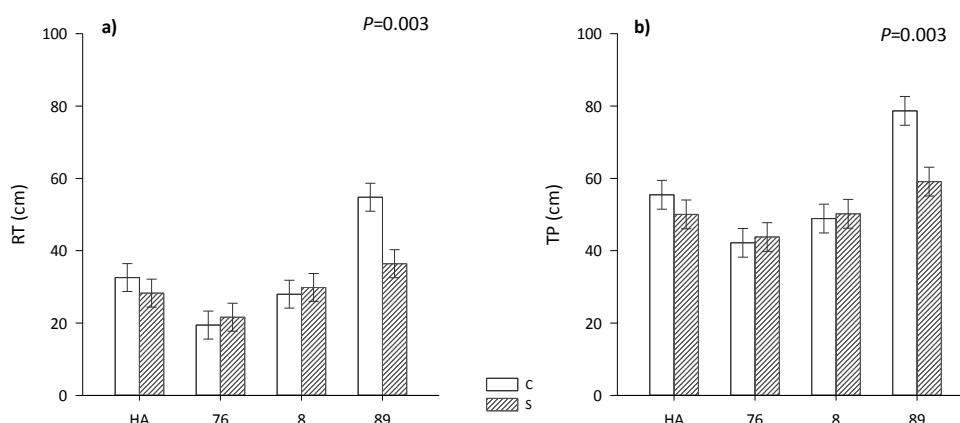


Figura 4.17. Longitud de las fracciones del tallo del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.). **a)** Resto del tallo (RT) y **b)** total de la fracción tallo (TT) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

4.1.3.1.6.- Peso específico de las fracciones del tallo del tallo principal.

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, el peso específico del resto del tallo un 17.7% (Tabla 4.18). En la línea 89, el peso específico del resto del tallo fue mayor que en el cv. Harrington y las otras líneas RCSL (Tabla 4.18).

Tabla 4.18. Peso específico ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-1}$) de las fracciones del tallo del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	Tratamientos				Genotipos				GxT			
	C	S	<i>P</i> .05	SED	HA	76	8	89	<i>P</i> .05	SED	<i>P</i> .05	SED
UE	10.03	9.37	ns		9.54	7.19	9.72	12.36	<.001	0.564	0.016	0.797
RT	22.45a	18.47b	0.028	1.644	18.51b	19.31b	18.97b	25.04a	0.040	2.324	ns	
TT	17.06	14.56	0.012	0.877	14.69	12.69	15.12	20.73	<.001	1.241	0.009	1.754

(UE) último entrenado del tallo, (RT) resto del tallo y (TT) total de la fracción tallo (suma de la longitud del último entrenado y resto del tallo). ns, sin significación estadística.

Las interacciones significativas genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.18) mostraron que la sequía condujo a un descenso del peso específico del último entrenado y del total del tallo en la línea 89 (Fig. 4.18). En condiciones de control hídrico, el peso específico del último entrenado y del total del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con los demás genotipos (Fig. 4.18), y el peso específico del último entrenado del tallo fue mayor en la línea 8 y Harrington que en la línea 76 (Fig. 4.18a). En condiciones de sequía, el peso específico del último entrenado del tallo fue mayor en los otros genotipos que en la línea 76 (Fig. 4.18a). El peso específico del total del tallo aumentó en las líneas 8 y 89 y tendió a aumentar, sin alcanzar significación estadística, en Harrington en comparación con la línea 76 (Fig. 4.18b).

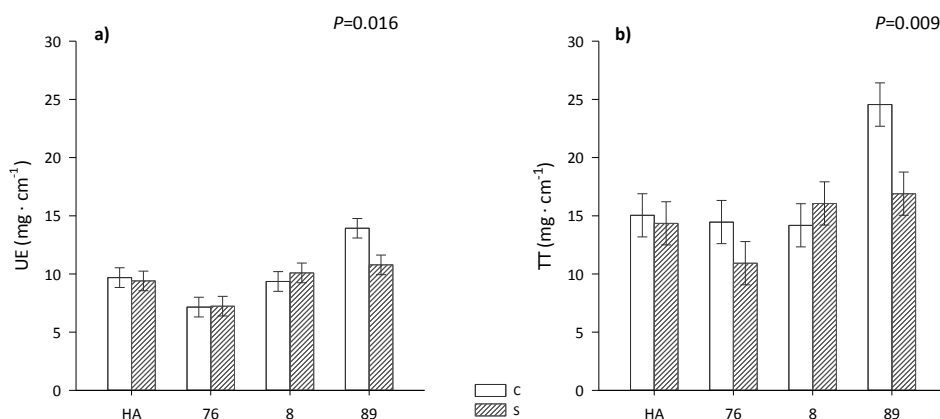


Figura 4.18. Peso específico del **a)** último entrenado del tallo (UE) y **b)** total de la fracción tallo (TT) del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (71 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

4.1.3.2.- Parámetros de crecimiento de las plantas de cebada en la madurez.

En la madurez de las plantas, se contaron el número de tallos hijos y de espigas por planta, se separó el tallo principal del resto de la planta y la espiga del tallo principal del resto de las espigas de la planta. El tallo principal se fraccionó en cada una de las partes antes indicadas y se obtuvo el peso después del secado de cada una de ellas, del total del tallo principal y la biomasa total.

4.1.3.2.1.- Peso seco de las partes del tallo principal.

En la madurez, el déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, notablemente el peso seco del resto de hojas y del resto del tallo, estimándose el porcentaje de pérdida en una proporción similar, 35.1% y 35.5%, respectivamente (Tabla 4.19). El peso seco de las hojas, resto de hojas y resto del tallo aumentó en el cv. Harrington y las líneas 89 y 8 en comparación con la línea 76 (Tabla 4.19). El peso seco del resto del tallo fue también mayor en la línea 89 que en el cv. Harrington y la línea 8 (Tabla 4.19).

Tabla 4.19. Peso seco (g) de las partes del tallo principal en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones (n=3); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	E	H	RH	UE	RT	TT	TP
Tratamientos							
Control	1.555	0.041	0.188a	0.229	0.699a	0.928	2.712
Sequía	1.175	0.036	0.122b	0.163	0.451b	0.614	1.947
$P_{.05}$	<.001	ns	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	0.024		0.013	0.007	0.039	0.041	0.060
Genotipos							
cv. HA	1.393	0.041a	0.164a	0.181	0.588a	0.769	2.366
RCSL-76	1.023	0.028b	0.107b	0.155	0.317b	0.472	1.630
RCSL-8	1.370	0.041a	0.190a	0.178	0.560a	0.738	2.339
RCSL-89	1.674	0.043a	0.161a	0.268	0.836c	1.104	2.981
$P_{.05}$	<.001	0.012	0.002	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	0.047	0.004	0.018	0.011	0.055	0.057	0.085
Interacción							
GxT ($P_{.05}$)	0.012	ns	ns	0.045	ns	0.042	0.007
SED	0.067			0.015		0.081	0.120

(E) espiga, (Hojas) bandera y penúltima, (RH) resto de hojas, (UE) último entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo, (TT) total de la fracción tallo y (TP) tallo principal. ns, sin significación estadística.

El análisis de la varianza del peso seco de la espiga, del último entrenudo del tallo, del total del tallo y del tallo principal alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.19), indicativa de que la sequía redujo el peso de la espiga, del último entrenudo del tallo, del total del tallo y del tallo principal en todos los genotipos de cebada (Fig. 4.19). En plantas de control hídrico, el peso de dichas partes del tallo principal fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, y mayor en el cv. Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.19), exceptuando el peso del último entrenudo del tallo que fue mayor en la línea 8 que en la línea 76, y el del cv. Harrington similar al de ambas líneas RCSL. En plantas de déficit hídrico, el peso seco de la espiga fue mayor en el resto de genotipos que en la línea 76, y mayor en la línea 89 que en la línea 8 (Fig. 4.19a). El peso del último entrenudo y del total del tallo y del tallo principal fue mayor en la línea 89 que en el resto

de genotipos, y mayor en la línea 8 y Harrington que en la línea 76 (Fig. 4.19bcd), exceptuando el peso del último entrenudo del tallo que fue similar entre el cv. Harrington y las líneas 8 y 76.

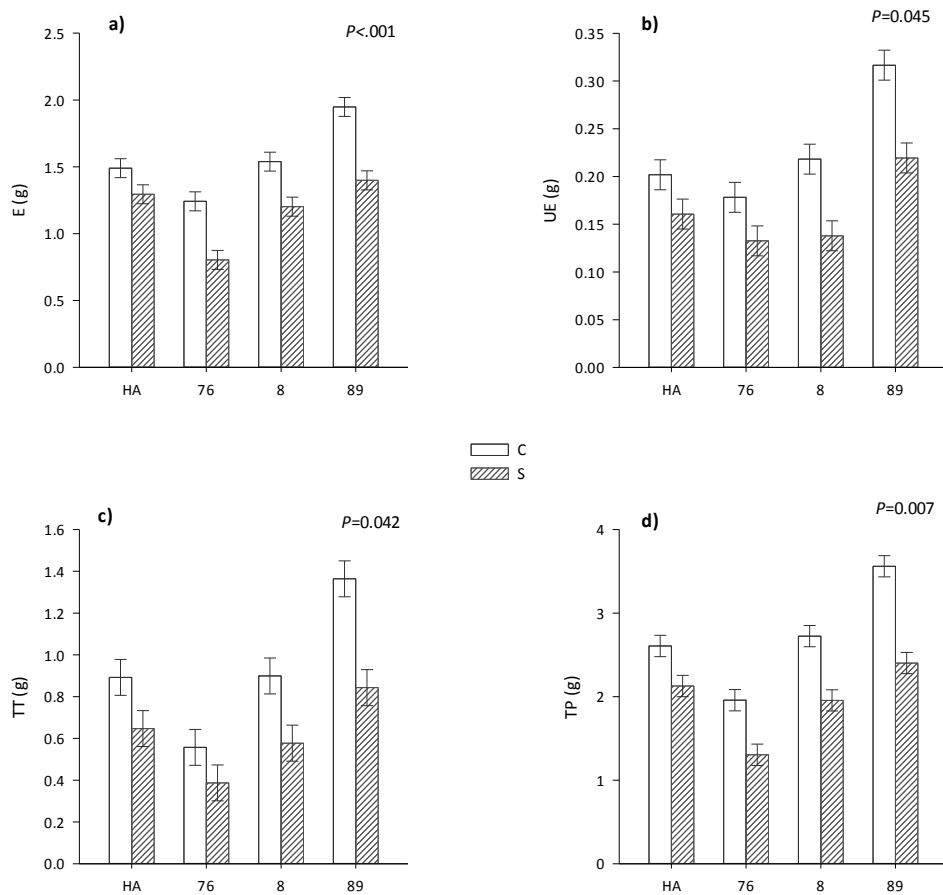


Figura 4.19. Peso seco de las partes del tallo principal en la madurez (138 d.d.s.). **a)** Espiga (E), **b)** último entrenudo del tallo (UE), **c)** total de la fracción tallo (TT) y **d)** tallo principal (TP) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

4.1.3.2.2.- Longitud de las fracciones del tallo del tallo principal.

En la madurez, 138 d.d.s., el déficit hídrico disminuyó la longitud del último entrenudo del tallo (Tabla 4.20), al igual que ocurrió en estadios más tempranos del desarrollo de las plantas de cebada (Tabla 4.17). La longitud del último entrenudo del tallo fue mayor en las líneas 76 y 89 que en la línea 8 y Harrington (Tabla 4.20).

Tabla 4.20. Longitud (cm) de las fracciones del tallo del tallo principal en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones (n=3); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	Tratamientos				Genotipos					GxT		
	C	S	P _{.05}	SED	HA	76	8	89	P _{.05}	SED	P _{.05}	SED
UE	22.70 a	20.28 b	<.001	0.306	20.85 a	22.12 b	20.17 a	22.83 b	<.001	0.433	ns	
RT	37.36	27.61	<.001	0.991	31.38	21.97	31.85	44.73	<.001	1.402	0.001	1.982
TT	60.06	47.89	<.001	0.986	52.23	44.08	52.02	67.57	<.001	1.394	0.002	1.971

(UE) último entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo y (TT) total de la fracción tallo (suma de la longitud del último entrenudo y resto del tallo). ns, sin significación estadística.

La interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.20), puso de manifiesto que la sequía redujo notablemente la longitud del resto y del total del tallo en los cuatro genotipos de cebada (Fig. 4.20). En plantas de control y déficit hídrico, la longitud del resto y del total del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con el resto de genotipos y en el cv. Harrington y la línea 8 con respecto a la línea 76 (Fig. 4.20).

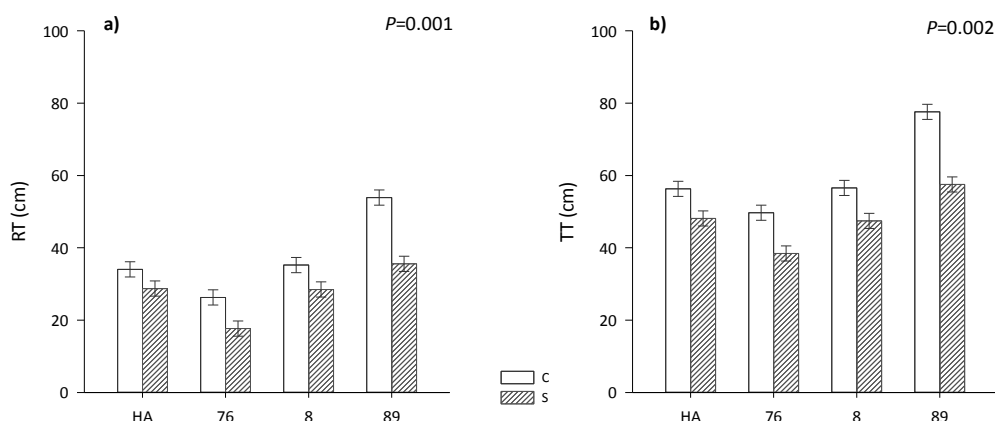


Figura 4.20. Longitud de las fracciones del tallo del tallo principal en la madurez (138 d.d.s.). **a)** Resto del tallo (RT) y **b)** total de la fracción tallo (TT) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

4.1.3.2.3.- Peso específico de las fracciones del tallo del tallo principal.

En la madurez, el déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, el peso específico del resto y del total del tallo en un 12.3% y 16.7%, respectivamente (Tabla 4.21). El peso específico del resto y del total del tallo fue mayor en las líneas 8 y 89 y el cv. Harrington que en la línea 76, y el del total del tallo fue también mayor en la línea 89 que en la línea 8 (Tabla 4.21).

Tabla 4.21. Peso específico ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-1}$) de las fracciones del tallo del tallo principal en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	Tratamientos		<i>P</i> .05	SED	Genotipos				<i>P</i> .05	SED	GxT	
	C	S			HA	76	8	89			<i>P</i> .05	SED
UE	10.06	7.97	<.001	0.296	8.66	6.99	8.75	11.66	<.001	0.418	0.016	0.592
RT	18.34a	16.08b	0.033	0.969	18.53a	14.39b	17.37a	18.54a	0.025	1.371	ns	
TT	15.11a	12.58b	<.001	0.613	14.59ac	10.63b	14.02a	16.14c	<.001	0.867	ns	

(UE) último entrenado del tallo, (RT) resto del tallo y (TT) total de la fracción tallo (suma de la longitud del último entrenado y resto del tallo). ns, sin significación estadística.

La interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.21) mostró que la sequía redujo el peso específico del último entrenado del tallo en las líneas 8 y 89, y condujo a un descenso muy próximo a la significación en la línea 76 (Fig. 4.21). En plantas de control hídrico, el peso específico del último entrenado del tallo fue mayor en la línea 89 que en el resto de genotipos, mayor en la línea 8 y Harrington que en la línea 76, y tendió a aumentar, sin alcanzar significación estadística, en la línea 8 en comparación con el cv. Harrington (Fig. 4.21). En plantas de déficit hídrico, el peso específico del último entrenado del tallo fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, y mayor a su vez en Harrington que en la línea 76 (Fig. 4.21).

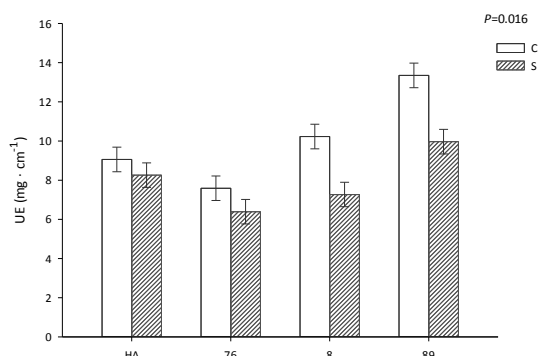


Figura 4.21. Peso específico del último entrenado (UE) del tallo principal en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

4.1.3.2.4.- Biomasa total.

En la madurez, el déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, notablemente la biomasa de las plantas (Fig. 4.23), estimándose el porcentaje de reducción del peso seco en un 74.7% (47 y 11.9 gramos en plantas de control y déficit hídrico, respectivamente, $P<.001$, lsd 6.24). Entre genotipos, la biomasa de la línea 8 fue mayor que la de la línea 76 y el cv. Harrington. La línea 89 mostró un aumento de biomasa muy próximo a la significación en comparación con el cultivar Harrington (Fig. 4.22).

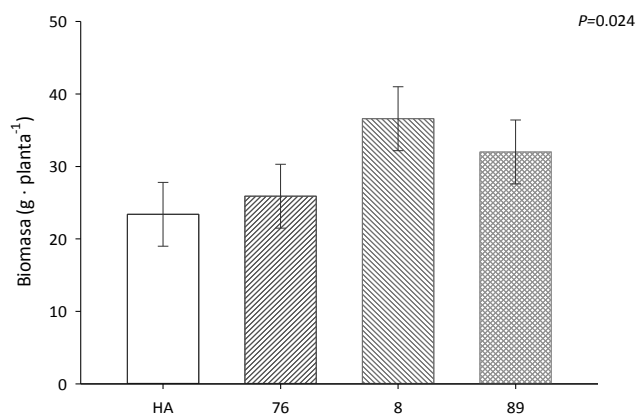


Figura 4.22. Biomasa total en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

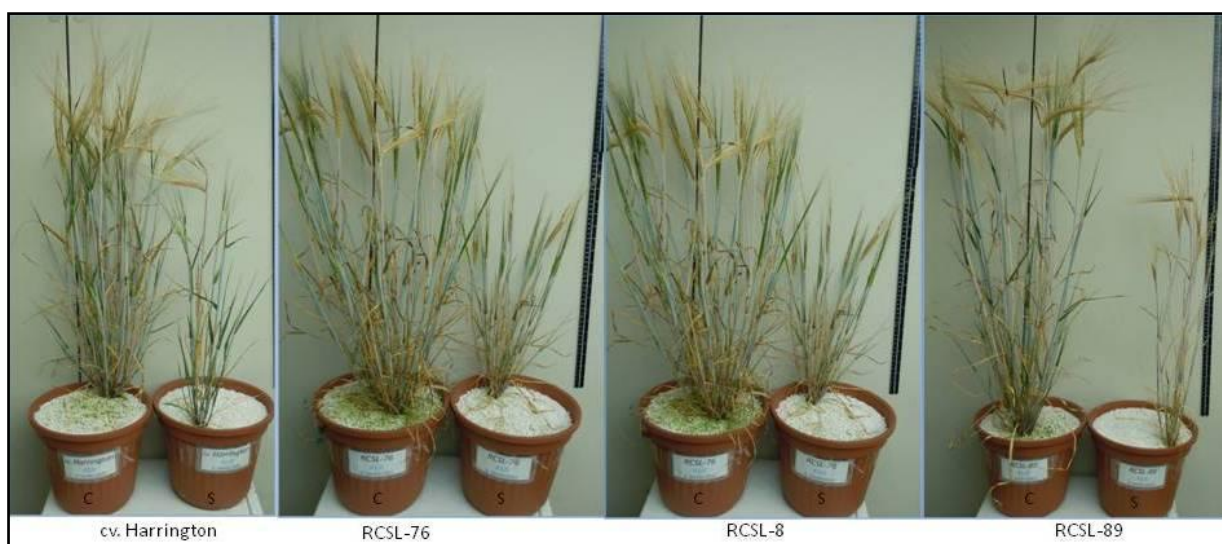


Figura 4.23. Imágenes de plantas de cebada en una fase próxima a la madurez de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cv. Harrington con déficit hídrico (derecha de las imágenes) o amplia disponibilidad hídrica (izquierda de las imágenes), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado.

4.1.3.2.5.- Número de tallos y espigas por planta.

En la madurez, 138 d.d.s., se contabilizaron el número de espigas por planta y el número de tallos totales, con y sin espiga, independientemente de su tamaño, lo que facilitó la estimación del ahijamiento de las plantas de cebada. El déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, el número de tallos por planta en un 54.7% (Tabla 4.22). La sequía no sólo disminuyó el ahijamiento de las plantas sino también el porcentaje de tallos que produjeron espiga en un 27.9% (Tabla 4.22). El porcentaje de tallos con espiga aumentó en las líneas 76 y 89 y en la línea 8, sin alcanzar significación estadística, en comparación con el cv. Harrington (Tabla 4.22).

Tabla 4.22. Número de tallos (NT) y número de espigas (NE) por planta y porcentaje de tallos con espiga (%E) en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones (n=3); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	Tratamientos				Genotipos					GxT		
	C	S	P _{.05}	SED	HA	76	8	89	P _{.05}	SED	P _{.05}	SED
NT	47.2a	21.4b	<.001	3.12	31.3	32.7	40.3	33.0	ns		ns	
NE	26.83	8.50	<.001	1.71	11.83	19.67	20.83	18.33	0.008	2.41	0.026	3.41
%E	56.7a	40.9b	0.001	4.03	37.5a	57.5b	46.3ac	53.9bc	0.014	5.70	ns	

ns, sin significación estadística.

El análisis de la varianza del número de espigas por planta alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.22), mostrando que el déficit hídrico redujo notablemente el número de espigas por planta en todos los genotipos de cebada (Fig. 4.24). Descenso que fue mucho más acusado en la línea 8 (78.65%) que en las líneas 76 y 89 (64.4% y 64.2%, respectivamente) y el cv. Harrington (60.76%). En condiciones de control hídrico, el número de espigas por planta fue mayor en las líneas RCSL que en el cv. Harrington, y mayor en la línea 8 que en la línea 89 (Fig. 4.24). En condiciones de escasa disponibilidad hídrica no hubo diferencias significativas entre los distintos genotipos.

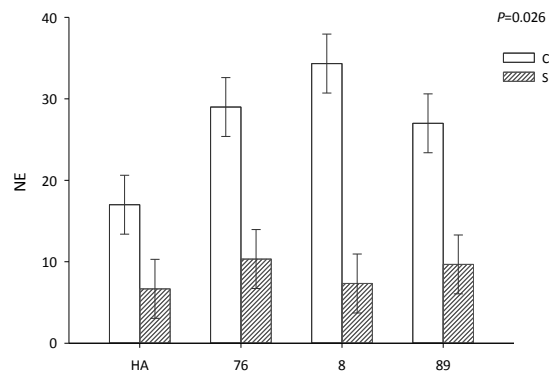


Figura 4.24. Número de espigas por planta (NE) en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Isd.

4.1.4.- Efecto del déficit hídrico en la producción de grano de los genotipos de cebada.

Se ha mencionado con anterioridad, que en la madurez de las plantas se separó la espiga del tallo principal del resto de espigas de la planta. Se determinó el número de granos y el peso del grano por espiga y el peso por grano tanto de la espiga del tallo principal como del resto de las espigas de la planta, y la suma de ambos permitió la determinación de los parámetros indicados por planta.

4.1.4.1.- Espiga del tallo principal.

El estrés hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, el número de granos y el peso del grano por espiga y el peso por grano en un 20%, 24.4% y 7.1%, respectivamente (Tabla 4.23). El número de granos por espiga del tallo principal fue mayor en la línea 8 que en los demás genotipos estudiados (Tabla 4.23). Además, el peso por grano de la línea 89 y el cv. Harrington fue mayor que el de las líneas 8 y 76 (Tabla 4.23).

Tabla 4.23. Número de granos (NG, nº granos·E⁻¹) y peso del grano (PGE, g·E⁻¹) por espiga y peso por grano (PG, mg) de la espiga del tallo principal en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones (n=3); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	Tratamientos				Genotipos						GxT	
	C	S	P _{.05}	SED	HA	76	8	89	P _{.05}	SED	P _{.05}	SED
NG	25.42a	20.33b	0.001	1.312	22.67a	19.83a	26.83b	22.17a	0.013	1.856	ns	
PGE	1.19	0.90	<.001	0.027	1.10	0.85	1.07	1.15	<.001	0.038	0.005	0.053
PG	47.59a	44.19b	0.025	1.375	48.73a	42.37b	40.67b	51.81a	<.001	1.944	ns	

ns, sin significación estadística.



Figura 4.25. Imagen de las espigas del tallo principal de tres líneas recombinantes con sustitución de cromosomas, líneas RCSL 89, 76 y 8, y del cv. Harrington, cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado.

El análisis de la varianza del peso del grano por espiga alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.23), poniendo de manifiesto que el déficit hídrico disminuyó, en comparación con las plantas de control hídrico, el peso del grano por espiga en el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (12.7%, 18.8%, 35% y 32.5%) (Fig. 4.26). En plantas de control hídrico, el peso del grano fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, mayor en el cv. Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.26). En plantas de déficit hídrico, el peso del grano por espiga fue mayor en el cv. Harrington y las líneas 8 y 89 que en la línea 76 (Fig. 4.26).

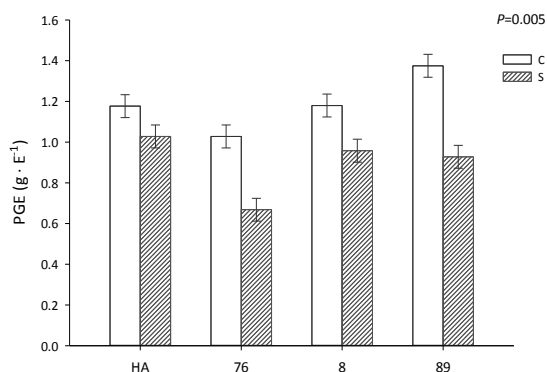


Figura 4.26. Peso del grano por espiga (PGE) del tallo principal en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

4.1.4.2.- Espigas por planta.

El estrés hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, el número de granos, el peso del grano y el peso por grano en un 75%, 77.9% y 11.4%, respectivamente (Tabla 4.24), al igual que en la espiga del tallo principal. No obstante, conviene resaltar que la reducción de dichos parámetros fue más acusada cuando se expresaron por planta que por espiga. El peso del grano por planta fue mayor en la línea 8 que en la línea 89 y el cv. Harrington, y mayor en la línea 76 que en Harrington (Tabla 4.24). El peso por grano fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, mayor en Harrington y la línea 76 que en la línea 8, y mayor a su vez en el cv. Harrington que en la línea 76 (Tabla 4.24).

Tabla 4.24. Número de granos (NG, nº granos·P⁻¹) y peso del grano (PGP, g·P⁻¹) por planta y peso por grano (PG, mg) de las espigas en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones (n=3); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	Tratamientos		P _{.05}	SED	Genotipos				P _{.05}	SED	GxT	
	C	S			HA	76	8	89			P _{.05}	SED
NG	311	78	<.001	20.5	141	220	263	155	0.002	29.0	0.021	41.0
PGP	14.39a	3.18b	<.001	0.99	6.64a	9.77bc	10.98b	7.74ac	0.028	1.40	ns	
PG	46.91a	41.57b	<.001	0.63	46.09a	42.46b	40.03c	48.38d	<.001	0.90	ns	

ns, sin significación estadística.

El análisis de la varianza del número de granos por planta alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x tratamiento hídrico (Tabla 4.24), mostrando que la sequía condujo a un descenso del número de granos por planta en todos los genotipos de cebada (Fig. 4.27). En plantas de control hídrico, el número de granos por planta aumentó en las líneas 8 y 76 en comparación con la línea 89 y Harrington, y en la línea 8 tendió a aumentar, sin llegar a alcanzar significación estadística, con respecto a la línea 76 (Fig. 4.27). En plantas de déficit hídrico, el número de granos no varió significativamente entre los distintos genotipos (Fig. 4.27).

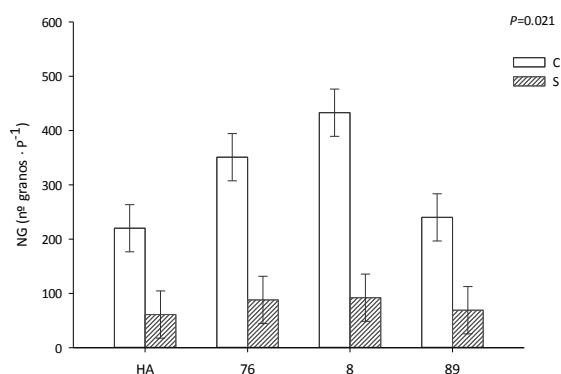


Figura 4.27. Número de granos por planta (NG) en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

4.1.4.3.- Índice de cosecha (IC).

Este parámetro muestra la relación entre el peso del grano por planta y el peso seco de la planta. El déficit hídrico condujo, en comparación con las plantas de control hídrico, a un descenso del índice de cosecha en un 13.8% (0.311 y 0.268 en plantas de control y déficit hídrico, respectivamente, $P=0.026$, Lsd 0.037). En la línea 76, el índice de cosecha aumentó en comparación con el cv. Harrington y las líneas 8 y 89 (Fig. 4.28).

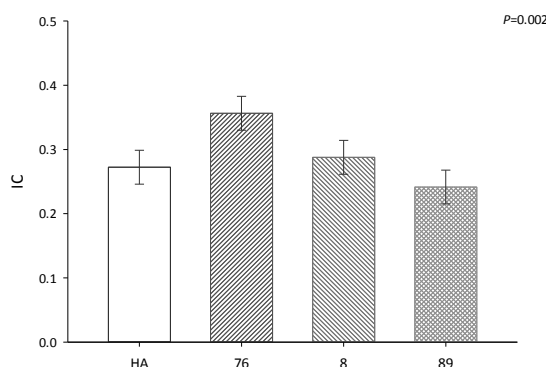


Figura 4.28. Índice de cosecha (IC) en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

4.1.5.- Efecto del déficit hídrico en el contenido de metabolitos en la madurez de los genotipos de cebada.

En la madurez de las plantas, se determinó el contenido de carbohidratos y proteínas solubles en las fracciones del tallo principal analizadas durante la post-antesis de las plantas de cebada (hojas, bandera y penúltima, y último entrenudo del tallo), y el contenido de nitrógeno y carbohidratos en el grano de la espiga del tallo principal.

4.1.5.1.- Contenido de carbohidratos y proteínas en el grano de la espiga del tallo principal.

A las características nutricionales del grano contribuye no sólo la riqueza en hidratos de carbono, que confieren el poder energético de la cebada, sino también su contenido proteico. Por ello, en un intento de evaluar, de forma aproximada, la calidad nutricional del grano, se determinó el contenido de carbohidratos en el grano de la espiga del tallo principal, junto al de proteínas de forma indirecta, a partir del nitrógeno cuantificado por el método Kjeldahl (ver apartado materiales y métodos).

El déficit hídrico incrementó el contenido de sacarosa y carbohidratos solubles en agua en el grano y no tuvo efecto en el contenido de almidón, glucosa, fructanos y carbohidratos totales (Tabla 4.25). El contenido de glucosa y sacarosa aumentó en el cv. Harrington y las líneas 76 y 89 en comparación con la línea 8, y en la línea 76 y Harrington con respecto a la línea 89 (Tabla 4.25). El contenido de fructanos fue mayor en la línea 89 y Harrington que en las líneas 8 y 76, y mayor en la línea 89 que en Harrington (Tabla 4.25). La acumulación de carbohidratos solubles aumentó en el cv. Harrington y las líneas 76 y 89 en comparación con la línea 8, y en Harrington y la línea 89 con respecto a la línea 76 (Tabla 4.25).

Tabla 4.25. Contenido de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa, almidón y total de carbohidratos en el grano de la espiga del tallo principal de las plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmol de hexosas por gramo de peso seco ($\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PS}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa}\cdot\text{g PS}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón	CHO Total
Tratamientos							
Control	110.9a	49.8	28.59a	2.64	1.33	2511	2622
Sequía	122.9b	55.5	31.49b	3.07	1.39	2438	2561
$P_{.05}$	0.004	ns	0.005	0.002	ns	ns	ns
SED	3.520		0.882	0.112			
Genotipos							
cv. HA	130.8a	58.2a	33.91a	3.22	1.60a	2519	2650
RCSL-76	109.2b	40.5b	32.29a	2.55	1.54a	2471	2580
RCSL-8	94.5c	40.4b	25.48b	2.11	0.94b	2447	2541
RCSL-89	133.2a	71.3c	28.48c	2.55	1.36c	2462	2595
$P_{.05}$	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	ns	ns
SED	4.980	3.990	1.247	0.159	0.074		
Interacción							
GxT ($P_{.05}$)	ns	ns	ns	0.004	ns	ns	ns
SED				0.224			

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). CHO Total (suma de carbohidratos solubles totales y almidón). ns, sin significación estadística.

La interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.25) mostró que la sequía aumentó el contenido de fructosa del grano de la línea 89 (Fig. 4.29). En plantas de control hídrico, el contenido de fructosa fue mayor en el cv. Harrington y la línea 89 que en las líneas 8 y 76 (Fig. 4.29). En plantas de déficit hídrico, la acumulación de fructosa fue mayor en la línea 89 que en Harrington y las otras líneas RCSL, y mayor en el cv. Harrington que en la línea 8 (Fig. 4.29).

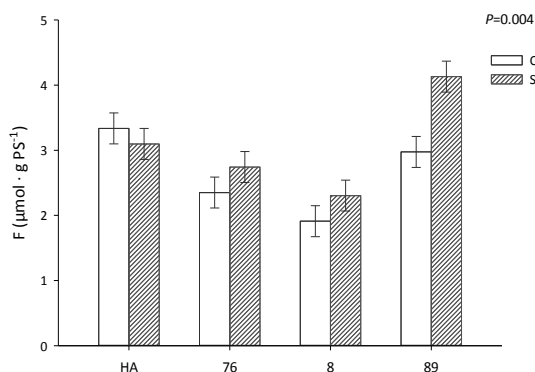


Figura 4.29. Contenido de fructosa (F) en el grano de la espiga del tallo principal en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

Como era de esperar, el carbohidrato predominante en los granos de cebada fue el almidón (Tabla 4.25). En el total de carbohidratos (solubles e insolubles, sin considerar la celulosa y otros carbohidratos de paredes celulares) valorados en el grano, dicho polisacárido representó en el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (95.1%, 96.3%, 95.8% y 94.9%) (Tabla 4.25). La línea 89 y el cv. Harrington, en comparación con las líneas 76 y 8, mostraron el mayor contenido de carbohidratos solubles en el grano y el menor porcentaje de almidón en el total de carbohidratos del grano (Tabla 4.25). El contenido de carbohidratos solubles en el total de azúcares del grano representó en el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (4.9%, 3.7%, 4.2% y 5.1%) (Tabla 4.25). El aumento de carbohidratos solubles en la línea 89 y Harrington se relacionó con la acumulación de fructanos, que representaron en el total de carbohidratos del grano en el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (2.2%, 1.6%, 1.6% y 2.7%), y de sacarosa, cuya contribución al total de carbohidratos del grano en el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (2.56%, 2.01%, 2.5% y 2.20%). El contenido de glucosa y fructosa en el grano fue notablemente inferior que el de los carbohidratos anteriormente mencionados, si bien el porcentaje de cada uno de ellos en el total de carbohidratos del grano refleja también cierta variabilidad genotípica. La contribución de la glucosa se estimó en el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (0.06%, 0.04%, 0.06% y 0.05%). La fructosa representó, como promedio, en el total de carbohidratos del grano en el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (0.12%, 0.08%, 0.1% y 0.1%), ya que la interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica únicamente afectó a la línea 89, indicativa de un mayor contenido de fructosa en condiciones de escasa disponibilidad hídrica, contribuyendo en mayor medida al promedio de fructosa encontrado en dicho genotipo (Fig. 4.29).

Tabla 4.26. Contenido de proteína total (Prot) ($\text{mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$) y nitrógeno (N) en el grano de la espiga principal en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	Tratamientos		<i>P</i> . ₀₅	SED	Genotipos				<i>P</i> . ₀₅	SED	GxT
	C	S			HA	76	8	89			<i>P</i> . ₀₅
Prot	114.0a	136.7b	0.001	5.890	105.0a	126.8b	122.7b	147.0c	0.001	8.330	ns
N	19.99a	23.99b	0.001	1.033	18.42a	22.24b	21.52b	25.78c	0.001	1.461	ns

ns, sin significación estadística.

En comparación con las plantas de control hídrico, el déficit hídrico condujo a un aumento del contenido de nitrógeno en el grano, que se estimó en un 16.6%, y, por tanto, aumentó también los niveles de proteínas (Tabla 4.26). El contenido de nitrógeno y proteínas en el grano fue mayor en las líneas RCSL que en el cv. Harrington, y mayor en la línea 89 que en las otras líneas RCSL (Tabla 4.26).

4.1.5.2.- Contenido de carbohidratos y proteínas en las hojas y en el último entrenudo del tallo.

En la madurez de las plantas, junto a la estimación del crecimiento, producción de grano y calidad nutricional del grano, se ha evaluado también la variabilidad genotípica en el contenido de carbohidratos y proteínas solubles foliares y del último entrenudo del tallo principal, a fin de poder valorar potenciales diferencias en la translocación de las reservas al grano entre los genotipos. Y en el último entrenudo del tallo se estimó también el contenido de nitrógeno.

En las hojas, el déficit hídrico condujo, en comparación con las plantas de control hídrico, a un aumento del contenido foliar de glucosa y a un descenso del contenido de almidón, estimándose el porcentaje de aumento y descenso en un 22.2% y 62.1%, respectivamente, y no tuvo efecto en el contenido de sacarosa y fructosa (Tabla 4.27). El contenido foliar de sacarosa aumentó en el cv. Harrington en relación a la línea 89 (Tabla 4.27).

Tabla 4.27. Contenido foliar de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmol de hexosas por gramo de peso seco ($\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PS}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa}\cdot\text{g PS}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	65.5	13.6	4.02	21.5	22.4a	7.66a
Sequía	85.4	21.4	3.63	27.8	28.8b	2.90b
<i>P</i> _{.05}	0.007	0.053	ns	ns	0.026	<.001
SED	6.460	3.750			2.640	0.964
Genotipos						
cv. HA	97.0	27.3	5.18a	30.5	28.8	6.60
RCSL-76	79.0	19.8	3.97ab	24.8	26.5	3.75
RCSL-8	73.6	14.3	3.80ab	25.4	26.3	6.75
RCSL-89	52.1	8.6	2.34b	17.8	20.8	4.02
<i>P</i> _{.05}	0.002	0.017	0.022	ns	ns	ns
SED	9.140	5.300	0.796			
Interacción						
GxT (<i>P</i> _{.05})	0.007	0.032	ns	ns	ns	ns
SED	12.93	7.500				

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

La interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.27) mostró que el déficit hídrico aumentó el contenido foliar de carbohidratos solubles y fructanos en el cv. Harrington (Fig. 4.30). En plantas de control hídrico, los niveles foliares de carbohidratos solubles fueron mayores en la línea 76 que en la línea 89 (Fig. 4.30a). En plantas de déficit hídrico, la acumulación de carbohidratos solubles y fructanos fue mayor en el cv. Harrington que en las líneas RCSL (Fig. 4.30). En la línea 8, el contenido de carbohidratos solubles mostró un aumento muy próximo a la significación estadística en comparación con la línea 89 (Fig. 4.30a).

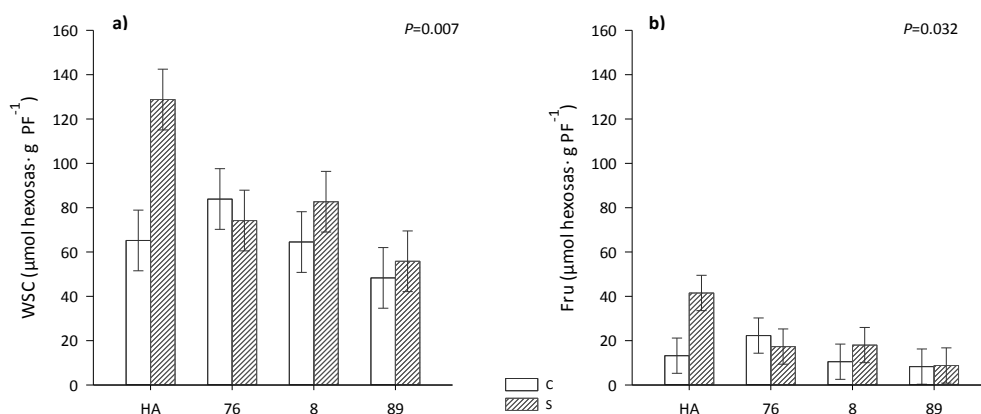


Figura 4.30. Contenido foliar de **a)** carbohidratos solubles totales (WSC) y **b)** fructanos (Fru) en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

En el último entrenado del tallo principal, la sequía redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, el contenido de almidón en un 28.5% (Tabla 4.28) y no tuvo efecto significativo en el contenido de glucosa, fructosa, sacarosa, fructanos y carbohidratos solubles en agua totales (Tabla 4.28). El contenido de almidón fue mayor en la línea 8 que en el resto de genotipos de cebada (Tabla 4.28).

Tabla 4.28. Contenido de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el último entrenado del tallo principal en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmoles de hexosas por gramo de peso seco ($\mu\text{mol hexosas} \cdot \text{g PS}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa} \cdot \text{g PS}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en **negrita**. Los valores son medias de tres repeticiones ($n=3$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	171	15.3	13.2	75.0	49.3	2.42a
Sequía	124	12.7	14.1	49.0	36.0	1.73b
$P_{.05}$	ns	ns	ns	ns	ns	0.007
SED						0.223
Genotipos						
cv. HA	188	20.1	20.0	79.0	49.3	1.56a
RCSL-76	146	14.9	14.9	58.0	44.9	2.01a
RCSL-8	164	13.4	12.2	79.0	49.8	2.71b
RCSL-89	91	7.6	7.4	32.0	26.5	2.02a
$P_{.05}$	ns	ns	ns	ns	ns	0.017
SED						0.315
Interacción						
GxT ($P_{.05}$)	ns	ns	ns	ns	ns	ns

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

En comparación con las plantas de control hídrico, el déficit hídrico no tuvo efecto en el contenido de nitrógeno del último entrenado del tallo y en el contenido proteico de las hojas de las plantas de cebada, pero condujo a un descenso de proteínas en el último entrenado del tallo principal, que se estimó en un 9.8% (Tabla 4.29). El contenido de proteínas en el último entrenado del tallo fue mayor en la línea 76 y el cv. Harrington que en las líneas 8 y 89 (Tabla 4.29). El contenido de nitrógeno del

último entrenado del tallo fue mayor en el cv. Harrington y las otras líneas RCSL que en la línea 89, y mayor en la línea 76 que en la 8 (Tabla 4.29).

Tabla 4.29. Contenido de proteína soluble (Prot, mg·g PS⁻¹) en las hojas, bandera y penúltima, y en el último entrenado del tallo, y contenido de nitrógeno (N, mg·g PS⁻¹) en el último entrenado del tallo en la madurez (138 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de tres repeticiones (n=3); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	Tratamientos				Genotipos				GxT		
	C	S	<i>P</i> .05	SED	HA	76	8	89	<i>P</i> .05	SED	<i>P</i> .05
Hoja-Prot	17.23	15.47	ns		13.72	17.85	16.66	17.16	ns		ns
UE -Prot	13.51a	12.19b	0.048	0.616	16.19a	16.94a	9.59b	8.67b	<.001	0.871	ns
UE- N	4.76	4.73	ns		5.36ab	6.35a	4.50b	2.76c	<.001	0.703	ns

(Hoja) bandera y penúltima, (UE) último entrenado del tallo. ns, sin significación estadística.

4.2.- EXPERIMENTO 2.

4.2.1.- Efecto del déficit hídrico en el intercambio gaseoso de los genotipos de cebada.

En este experimento se realizaron medidas de intercambio gaseoso con 390 y 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 en la medida y 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, en la penúltima hoja de las plantas de cebada, en las fases de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano, grano lechoso medio y grano lechoso tardío (ver capítulo materiales y métodos), cuyos resultados se describen a continuación.

Tabla 4.30. Parámetros de intercambio gaseoso medidos con 390 y 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 y 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en el inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cinco repeticiones ($n=5$); SED, error estándar de la diferencia.

	390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2				2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2			
	A	g_s	C_i	E	A	g_s	C_i	E
Tratamientos								
Control	15.69	163.8	217.0	4.680	28.06	135.3	1462.1	4.078
Sequía	10.52	126.7	243.5	3.157	28.13	88.9	1299.5	3.063
$P_{.05}$	<.001	<.001	<.001	<.001	ns	<.001	<.001	<.001
SED	0.228	4.660	4.840	0.107		4.040	16.27	0.134
Genotipos								
cv. HA	13.06	148.8	230.8	3.979	27.98	109.4	1409.3	3.256
RCSL-76	13.02	154.7	244.3	4.509	26.51	127.0	1431.2	4.041
RCSL-8	13.13	144.1	232.5	3.932	28.28	107.0	1338.3	3.639
RCSL-89	13.20	133.3	213.2	3.254	29.63	105.0	1344.4	3.346
$P_{.05}$	ns	0.012	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED		6.600	6.850	0.152	0.571	5.710	23.00	0.190
Interacción								
GxT ($P_{.05}$)	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	0.456	9.330	9.680	0.215	0.807	8.070	32.53	0.268

(A) asimilación fotosintética del carbono ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), (g_s) conductancia de los estomas ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), (C_i) concentración de CO_2 en los espacios intercelulares ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y (E) transpiración ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). ns, sin significación estadística.

En el inicio del desarrollo del grano, los análisis de la varianza de los parámetros de intercambio gaseoso (A, g_s , E y C_i) medidos con 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 y 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa mostraron significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.30), indicativa de que, en comparación con las plantas control, el déficit hídrico disminuyó en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente, la asimilación fotosintética del CO_2 (23.15%, 35.19%, 35.98% y 36.87%) (Fig. 4.31a), la conductancia de los estomas (13.01%, 19.76%, 13.39% y 43.36%) (Fig. 4.31b) y la transpiración (24.56%, 28.41%, 44.85% y 28.22%) (Fig. 4.31d) y aumentó la concentración de CO_2 en los espacios intercelulares, con la excepción de la línea 89 (9.29%, 15.4%, 20% y sin efecto en la línea 89) (Fig. 4.31c). En condiciones de control hídrico, no hubo diferencias significativas en la g_s y la C_i entre los genotipos de cebada (Fig. 4.31bc) y la A fue mayor en las líneas RCSL que en el cv. Harrington (Fig. 4.31a). La E fue mayor en Harrington y las otras dos líneas RCSL que en la línea 89, mientras que en la línea 76 aumentó en comparación con los otros genotipos (Fig. 4.31d). En condiciones de déficit hídrico, al contrario que en las plantas control, la fotosíntesis fue mayor en el cv. Harrington que en las líneas RCSL (Fig. 4.31a). La g_s , la E y la C_i aumentaron en los otros genotipos en comparación con la línea 89 (Fig. 4.31bcd). Y en la línea 76, la C_i fue mayor que en Harrington y las líneas 8 y 89 (Fig. 4.31c).

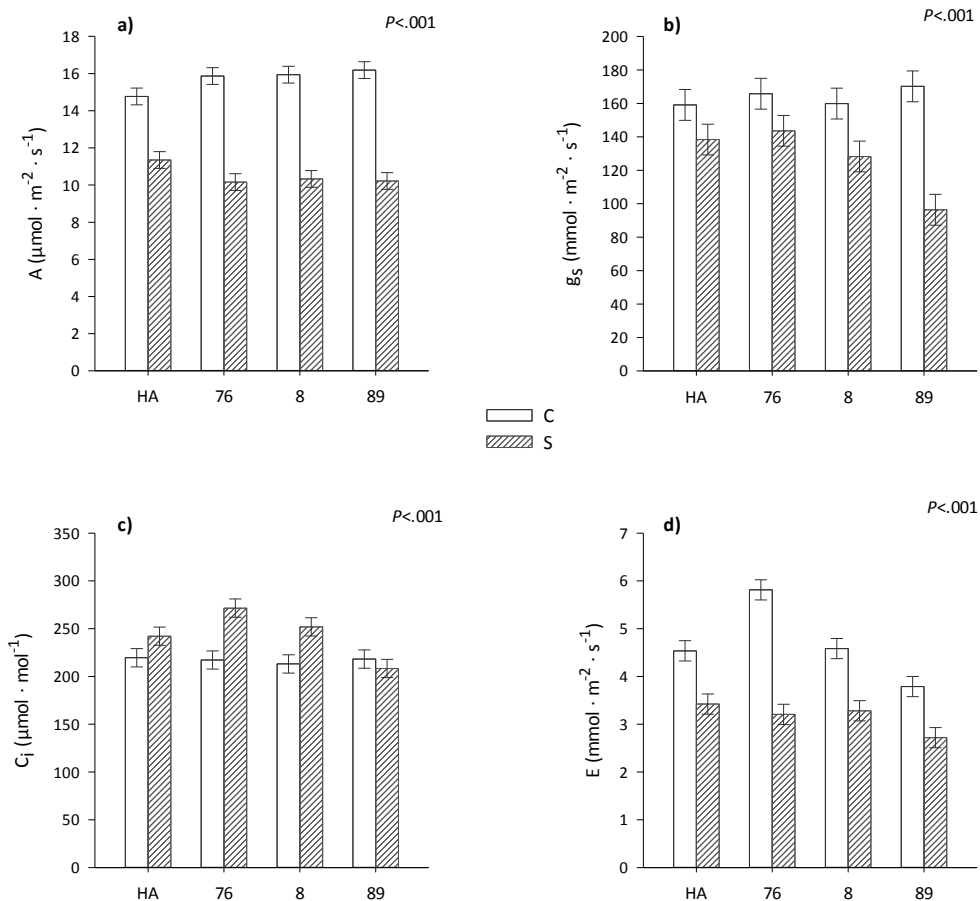


Figura 4.31. a) Asimilación fotosintética del carbono (A), b) conductancia de los estomas (g_s), c) concentración de CO_2 en los espacios intercelulares (C_i) y d) transpiración (E) medidos con $390 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 y $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en el inicio del desarrollo del grano de la cebada (70 ± 1 d.d.s.). Plantas de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, *lsd*.

Con $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 en la medida y $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, las interacciones significativas genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.30) pusieron de manifiesto que el déficit hídrico no tuvo efecto en la A, la E y la C_i en el cv. Harrington (Fig. 4.32adc), pero disminuyó, en comparación con las plantas de control hídrico, la conductancia de los estomas en todos los genotipos (15.59%, 33.07%, 51.87% y 29.13% en el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente) (Fig. 4.32b) y la E y C_i en las tres líneas recombinantes (23.39% y 14.61%, 15.52% y 16.45%, 47.76% y 10.54% en las líneas 8, 76 y 89, respectivamente) (Fig. 4.32dc). Mientras que el estrés hídrico aumentó, con respecto a las plantas control, la asimilación fotosintética del CO_2 en las líneas 8 y 89 (7.16% y 5.41%, respectivamente) y la disminuyó en la línea 76 (12.45%) (Fig. 4.32a). En plantas de control hídrico, la fotosíntesis aumentó en la línea 89 en comparación con la línea 8 y no varió significativamente con respecto a la línea 76 y el cv. Harrington (Fig. 4.32a). La g_s y la C_i fueron mayores en la línea 76 que en Harrington y las líneas 8 y 89 (Fig. 4.32bc). La E aumentó en las líneas RCSL en comparación con Harrington (Fig. 4.32d). En plantas de déficit hídrico, la fotosíntesis de Harrington y las líneas 8 y 89 aumentó en comparación con la línea 76, y la de la línea 89 fue mayor que la de Harrington (Fig. 4.32a). En el cv. Harrington, la C_i fue mayor que en las líneas RCSL (Fig. 4.32c) y la g_s mayor que en la línea 76 (Fig. 4.32b). La E aumentó en las otras líneas RCSL y el cv. Harrington en comparación con la línea 89 (Fig. 4.32d).

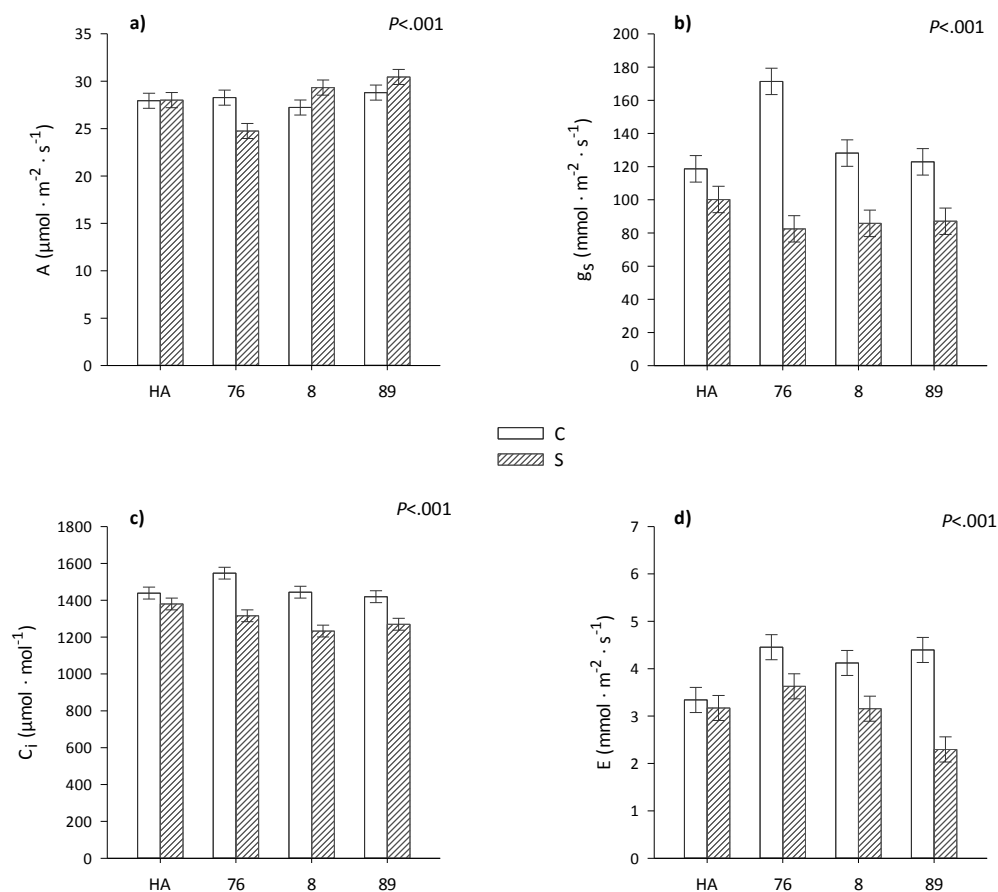


Figura 4.32. a) Asimilación fotosintética del carbono (A), b) conductancia de los estomas (g_s), c) concentración de CO_2 en los espacios intercelulares (C_i) y d) transpiración (E) medidos con $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 y $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en el inicio del desarrollo del grano de la cebada (70 ± 1 d.d.s.). Plantas de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

En el estadio de grano lechoso medio, cuando las medidas de intercambio gaseoso se realizaron con $390 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 y $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, el déficit hídrico condujo, en comparación con las plantas control, a un aumento de la concentración de CO_2 en los espacios intercelulares y a un descenso de la transpiración, que fueron estimados en un 11.35% y 15.71%, respectivamente (Tabla 4.31). La C_i fue mayor en las líneas 8 y 89 que en la línea 76, y en la línea 89 mostró un aumento próximo a la significación con respecto al cv. Harrington (Tabla 4.31). La E aumentó en la línea 76 en comparación con Harrington y las otras líneas RCSL, y entre estos genotipos, fue mayor en el cv. Harrington que en las líneas 8 y 89 (Tabla 4.31).

Tabla 4.31. Parámetros de intercambio gaseoso medidos con 390 y 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 y 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cinco repeticiones ($n=5$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2				2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2			
	A	g_s	C_i	E	A	g_s	C_i	E
Tratamientos								
Control	13.49	150.7	227.4a	3.667a	26.54	119.2	1441.0	3.482
Sequía	10.57	134.6	256.5b	3.091b	24.86	110.0	1445.0	2.733
$P_{.05}$	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	ns	ns	<.001
SED	0.177	3.840	6.030	0.099	0.360			0.108
Genotipos								
cv. HA	11.86	137.8	239.8ab	3.550a	25.79	127.4	1491.0	2.888
RCSL-76	11.78	132.1	227.0b	3.872b	24.65	129.0	1502.0	3.492
RCSL-8	12.03	146.5	245.7a	3.115c	26.63	95.8	1371.0	3.080
RCSL-89	12.36	154.2	255.4a	2.978c	25.73	106.2	1408.0	2.970
$P_{.05}$	ns	<.001	0.010	<.001	0.002	<.001	<.001	<.001
SED		5.430	8.520	0.140	0.510	6.720	28.60	0.153
Interacción								
GxT ($P_{.05}$)	<.001	<.001	ns	ns	0.013	0.052	<.001	0.002
SED	0.355	7.680			0.721	9.500	40.50	0.216

(A) asimilación fotosintética del carbono ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), (g_s) conductancia de los estomas ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), (C_i) concentración de CO_2 en los espacios intercelulares ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y (E) transpiración ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). ns, sin significación estadística.

El análisis de la varianza de la A y la g_s mostró significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.31), la cual mostró que el déficit hídrico redujo, con respecto a las plantas de control hídrico, la fotosíntesis en todos los genotipos (11.95%, 22.29%, 19.73% y 31.02% en el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente) (Fig. 4.33a) y la conductancia de los estomas de la línea 89 (Fig. 4.33b). En condiciones de control hídrico, la fotosíntesis aumentó en las líneas RCSL en comparación con el cv. Harrington y en la línea 89 respecto a los demás genotipos de cebada (Fig. 4.33a). La conductancia de los estomas de las líneas 8 y 89 aumentó en comparación con Harrington y la línea 76, y la de la línea 89 fue mayor que la de la 8 (Fig. 4.33b). En plantas de déficit hídrico, la fotosíntesis aumentó en el cv. Harrington comparación con las líneas 76 y 89 (Fig. 4.33a). La g_s no varió significativamente entre los genotipos de cebada (Fig. 4.33b).

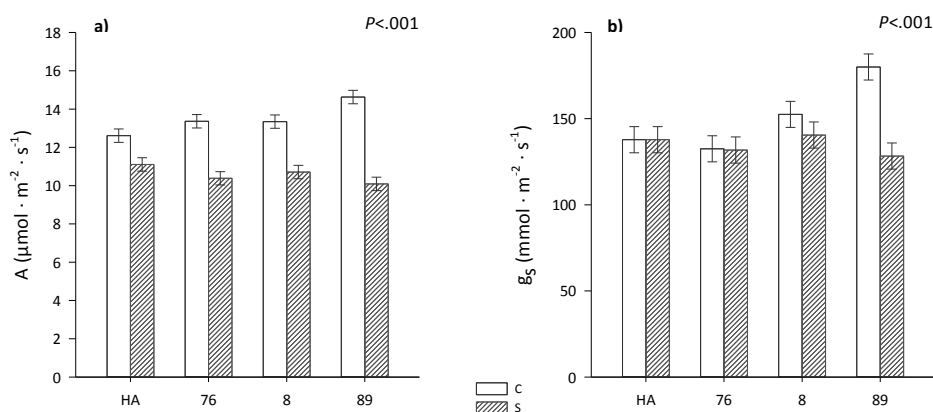


Figura 4.33. a) Asimilación fotosintética del carbono (A), b) conductancia de los estomas (g_s), medidos con 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 y 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en el estadio de grano lechoso medio de la cebada (80 ± 2 d.d.s.). Plantas de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

Con $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 en la medida y $1500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, las interacciones significativas genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.31) indicaron que el déficit hídrico disminuyó la asimilación fotosintética del CO_2 en la línea 76 (14.10%) (Fig. 4.34a), la transpiración en todos los genotipos, con la excepción de la línea 8 (17.85%, 7.92% (ns), 33.37% y 23.21%, para el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89 respectivamente) (Fig. 4.34d) y la conductancia de los estomas y la concentración de CO_2 en los espacios intercelulares en la línea 89 (6.79%) (Fig. 4.34bc), mientras que aumentó la C_i en la línea 76 (9.03%) (Fig. 4.34c). En condiciones de control hídrico, la A no varió significativamente entre los genotipos de cebada (Fig. 4.34a). La C_i y la g_s aumentaron en el cv. Harrington con respecto a la línea 8 (Fig. 4.34cb), y en la línea 76 aumentó, la g_s en comparación con la línea 8 (Fig. 4.34b). La E fue mayor en la línea 76 que en Harrington y las otras líneas RCSL (Fig. 4.34d). En condiciones de déficit hídrico, la A fue mayor en las otras líneas RCSL y Harrington que en la línea 76 (Fig. 4.34a). La g_s y la C_i aumentaron en la línea 76 y el cv. Harrington en comparación con las líneas 8 y 89, y la línea 76 mostró un aumento próximo a la significación estadística comparada con Harrington (Fig. 4.34bc). La E no varió significativamente entre los genotipos de cebada (Fig. 4.34d).

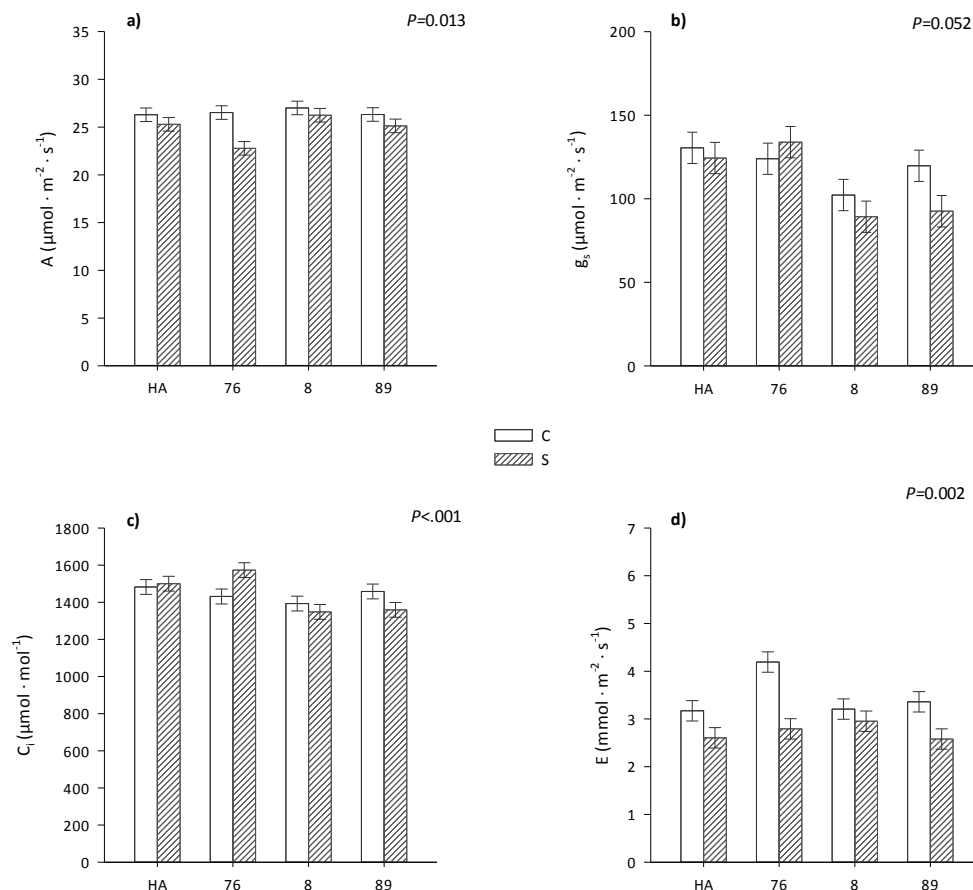


Figura 4.34. a) Asimilación fotosintética del carbono (A), b) conductancia de los estomas (g_s), c) concentración de CO_2 en los espacios intercelulares (C_i) y d) transpiración (E) medidos con $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 y $1500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en el estadio de grano lechoso medio de la cebada (80 ± 2 d.d.s.). Plantas de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd .

Tabla 4.32. Parámetros de intercambio gaseoso medidos con 390 y 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 y 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en el estadio de grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cinco repeticiones ($n=5$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2				2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2			
	A	g_s	C_i	E	A	g_s	C_i	E
Tratamientos								
Control	11.61	130.5	240.4	3.298	23.62a	107.0	1494.2	2.951
Sequía	8.55	98.9	249.2	2.454	21.90b	79.6	1412.6	2.188
$P_{.05}$	<.001	<.001	ns	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	0.232	3.46		0.080	0.410	2.110	11.94	0.111
Genotipos								
cv. HA	10.39	107.6	253.8	2.758	24.56a	84.7	1378.6	2.549
RCSL-76	11.37	104.8	211.5	3.856	22.67b	100.8	1477.0	3.340
RCSL-8	9.86	120.6	231.9	2.641	24.42a	96.8	1445.1	2.325
RCSL-89	8.69	125.6	281.9	2.250	19.39c	90.9	1512.9	2.065
$P_{.05}$	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	0.328	4.900	7.130	0.113	0.580	2.990	16.88	0.156
Interacción								
GxT ($P_{.05}$)	0.019	0.005	<.001	<.001	ns	<.001	<.001	<.001
SED	0.464	6.930	10.08	0.159		4.220	13.87	0.221

(A) asimilación fotosintética del carbono ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), (g_s) conductancia de los estomas ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), (C_i) concentración de CO_2 en los espacios intercelulares ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) y (E) transpiración ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). ns, sin significación estadística.

En el estadio de grano lechoso tardío, los análisis de la varianza de los parámetros de intercambio gaseoso, cuando las medidas se realizaron a la concentración de CO_2 de crecimiento, mostraron significación para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.32), que pusieron de manifiesto que, con respecto a las plantas control, el déficit hídrico redujo en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente, la fijación fotosintética del CO_2 (24.19%, 30.21%, 29.20% y 20.08%) (Fig. 4.35a), la transpiración (15.27%, 22.99%, 34.85% y 23.87%) (Fig. 4.35d) y la conductancia de los estomas, con la excepción, de la línea 76 (20.51%, 35.87%, 10.80% ns y 20.51%) (Fig. 4.35b). Mientras que el estrés hídrico aumentó, la C_i en la línea 76 (18.92% en comparación con las plantas control) y tendió a aumentarla en el cv. Harrington y a disminuirla en la línea 8 sin llegar a alcanzar significación estadística (Fig. 4.35c). En plantas de control hídrico, en la línea 76 aumentó, en comparación con los otros genotipos, la A y la E (Fig. 4.35ad) y disminuyó la C_i y la g_s (Fig. 4.35bc), y en los otros genotipos aumentó la A (Fig. 4.35a) y la E (Fig. 4.35d) y disminuyó la C_i (Fig. 4.35c) con respecto a la línea 89. En plantas de déficit hídrico, la fotosíntesis de la línea 76 aumentó en comparación con la de las líneas 8 y 89, y la del cv. Harrington fue mayor que la de la línea 89 (Fig. 4.35a). En las otras líneas RCSL y el cv. Harrington aumentó la g_s con respecto a la línea 8 (Fig. 4.35b). Las líneas 76 y 89 mostraron la máxima y mínima transpiración de todos los genotipos, respectivamente (Fig. 4.35d). En el cv. Harrington y la línea 89, la C_i fue mayor que en las líneas RCSL 8 y 76 (Fig. 4.35c).

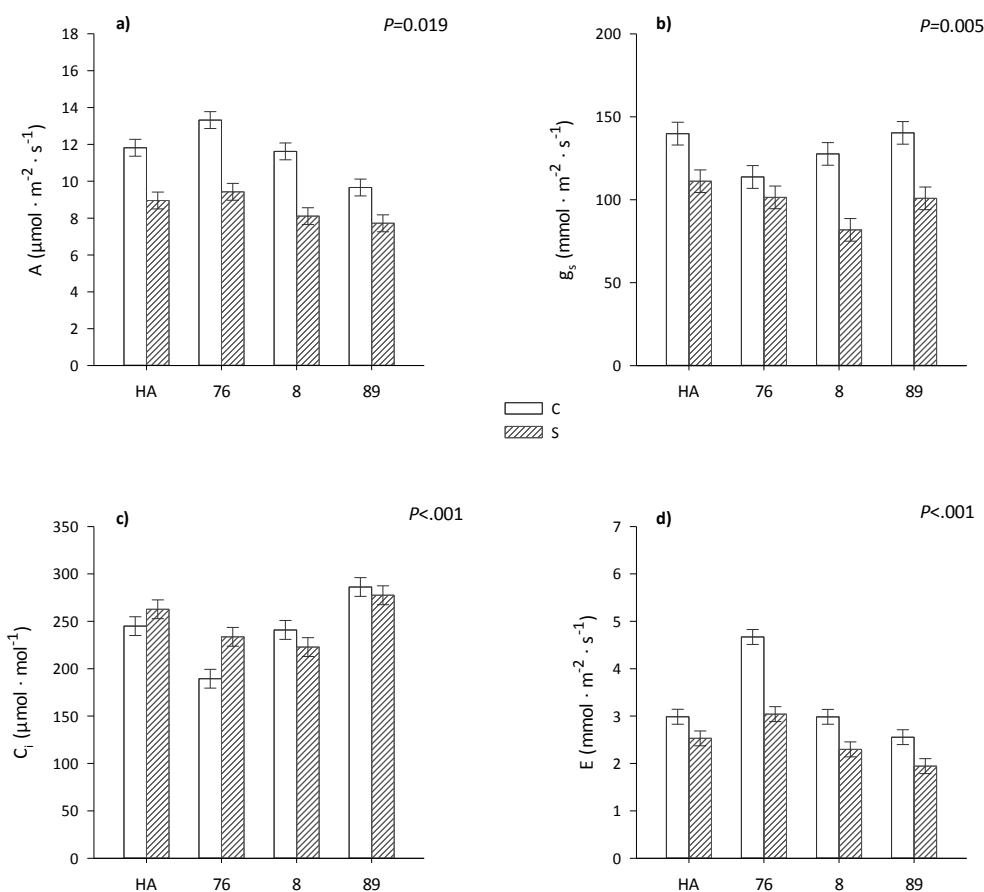


Figura 4.35. a) Asimilación fotosintética del carbono (A), b) conductancia de los estomas (g_s), c) concentración de CO_2 en los espacios intercelulares (C_i) y d) transpiración (E) medidos con $390 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 y $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en el estadio de grano lechoso tardío de la cebada (91 ± 3 d.d.s.). Plantas de las líneas RCL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

Con $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 en la medida y $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, el déficit hídrico condujo a un descenso de la fotosíntesis (Tabla 4.32). En la línea 8 y el cv. Harrington, la fotosíntesis fue mayor que en las líneas 76 y 89, y la de la línea 76 aumentó en comparación con la de la línea 89 (Tabla 4.32).

Las interacciones significativas genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.32) mostraron que, en comparación con las plantas control, el estrés hídrico redujo, en todos los genotipos, la conductancia de los estomas (22.62%, 30.32%, 14.10% y 34.52% en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente) (Fig. 4.36a), la transpiración, con la excepción, de la línea 89 (15.59%, 26.97% y 38.18% en Harrington y las líneas 8 y 76, respectivamente) (Fig. 4.36c) y la concentración de CO_2 en los espacios intercelulares, exceptuando la línea 76 (4.5%, 6.37% y 10.46% en Harrington y las líneas 8 y 89, respectivamente) (Fig. 4.36b). En condiciones de control hídrico, la g_s y la C_i aumentaron en las líneas RCL en comparación con el cv. Harrington (Fig. 4.36ab). En la línea 89 disminuyó, con respecto a Harrington y las otras líneas RCL, la E y aumentó la C_i (Fig. Fig. 4.36cb). En la línea 76 fue mayor la E que en los demás genotipos (Fig. 4.36c). En condiciones de déficit hídrico, la C_i fue mayor en las líneas RCL que en Harrington, y en la línea 76 que en las otras dos RCL (Fig. 4.36b). Para la E, el cv. Harrington mostró un aumento próximo a la significación estadística con respecto a la línea 89 y la línea 76 un aumento significativo en comparación con las líneas 8 y 89 (Fig. 4.36c). En la línea 76 aumentó también la g_s en comparación con Harrington y las otras líneas RCL (Fig. 4.36a).

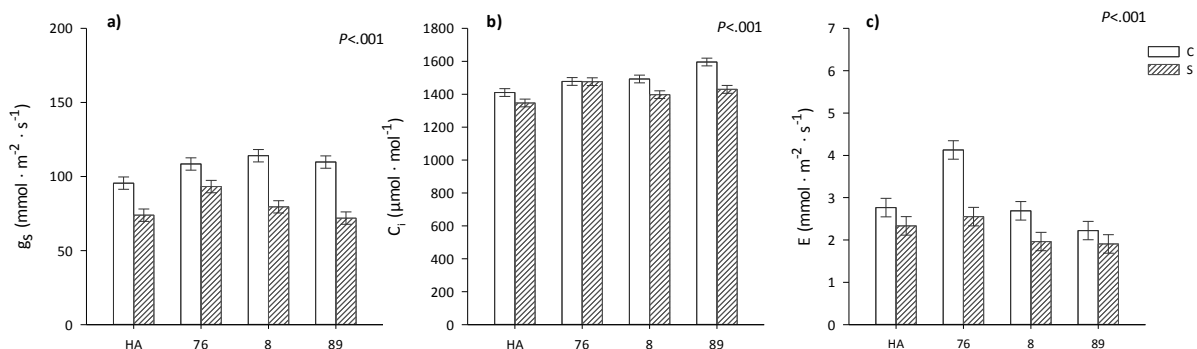


Figura 4.36. a) Conductancia de los estomas (g_s), **b)** concentración de CO_2 en los espacios intercelulares (C_i) y **c)** transpiración (E) medidos con $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de CO_2 y $1500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa en el estadio de grano lechoso tardío de la cebada (91 ± 3 d.d.s.). Plantas de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd .

4.2.2.- Efecto del déficit hídrico en el contenido de metabolitos de los genotipos de cebada.

Como se explica en el apartado de descripción de los experimentos del capítulo de materiales y métodos, se recogieron muestras foliares de las hojas bandera y penúltima conjuntamente, y del último y penúltimo entrenudos del tallo principal en las fases del desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano, grano lechoso medio y grano lechoso tardío para la determinación de metabolitos.

4.2.2.1.- Contenido foliar de carbohidratos.

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico aumentó el contenido foliar de carbohidratos solubles, fructanos y sacarosa (Tabla 4.33). La acumulación de fructanos fue mayor en la línea 89 que en el resto de genotipos (Tabla 4.33). El contenido de sacarosa aumentó en el cv. Harrington y la línea 89 con respecto a las líneas 8 y 76 (Tabla 4.33). El contenido de carbohidratos solubles en agua fue mayor en la línea 89 y el cv. Harrington que en la línea 8, y mayor en la línea 89 que en la línea 76 (Tabla 4.33).

Tabla 4.33. Contenido foliar de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmol de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	83.8a	12.3a	34.3a	1.04	1.94	16.49
Sequía	129.6b	24.6b	49.1b	2.92	3.91	11.90
$P_{.05}$	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	0.002
SED	8.120	4.280	2.630	0.237	0.478	1.287
Genotipos						
cv. HA	115.0ac	14.5a	48.0a	1.79	2.73	16.19
RCSL-76	97.6ab	16.5a	39.1b	1.14	1.86	12.11
RCSL-8	84.1b	15.8a	32.0b	1.45	2.75	15.68
RCSL-89	130.1c	27.0b	47.6a	3.53	4.36	12.80
$P_{.05}$	0.003	0.028	<.001	<.001	<.001	ns
SED	11.48	6.250	3.720	0.335	0.338	
Interacción						
GxT ($P_{.05}$)	ns	ns	ns	<.001	<.001	0.005
SED				0.474	0.676	2.574

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

Los análisis de la varianza del contenido de glucosa, fructosa y almidón mostraron significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.33), poniendo de manifiesto que el estrés hídrico aumentó notablemente el contenido foliar de glucosa y fructosa en la línea 89 (Fig. 4.37ba), de fructosa en la línea 76 (Fig. 4.37a) y redujo el contenido foliar de almidón en la línea 8 y el cv. Harrington (Fig. 4.37c). En condiciones de control hídrico, el contenido de almidón fue mayor en la línea 8 y el cv. Harrington que en las líneas 76 y 89 (Fig. 4.37c), y los niveles de glucosa y fructosa no variaron entre Harrington y las líneas RCSL (Fig. 4.37ab). En condiciones de déficit hídrico, la acumulación foliar de glucosa y fructosa fue mayor en la línea 89 que en Harrington y las otras líneas RCSL (Fig. 4.37ba), y no hubo diferencias significativas entre genotipos en el contenido de almidón (Fig. 4.37c).

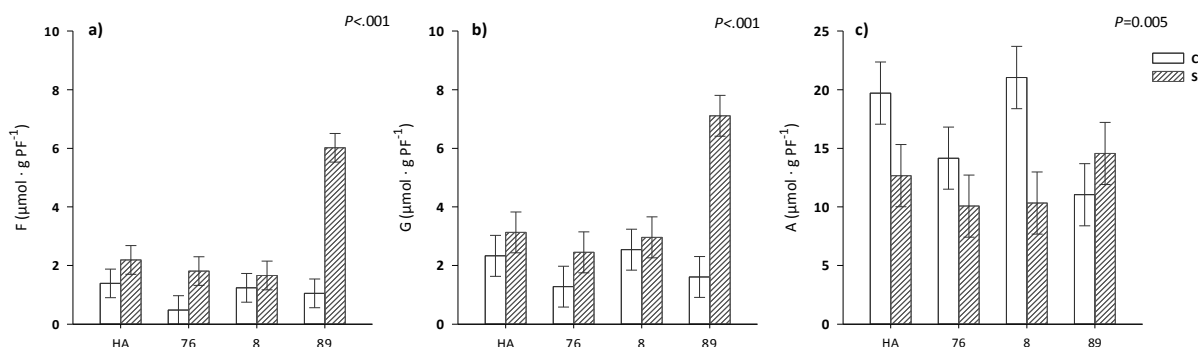


Figura 4.37. Contenido foliar de **a)** fructosa (F), **b)** glucosa (G) y **c)** almidón (A) en el inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

En el estadio de grano lechoso medio, la sequía redujo el contenido foliar de almidón y aumentó el contenido de carbohidratos solubles, como resultado del aumento de glucosa, fructosa y sacarosa, y no tuvo efecto en el contenido de fructanos (Tabla 4.34). El contenido de carbohidratos solubles y fructanos aumentó en la línea 89 en comparación con el cv. Harrington y las otras líneas RCSL (Tabla 4.34), y el contenido de carbohidratos solubles fue también mayor en el cv. Harrington que en la línea 76. Los niveles de sacarosa aumentaron en la línea 89 y Harrington en comparación con las líneas 8 y 76 (Tabla 4.34), y los de almidón aumentaron en las líneas 8 y 89 con respecto a Harrington y la línea 76 (Tabla 4.34).

Tabla 4.34. Contenido foliar de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmoles de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	96.5a	19.04	37.07a	1.25a	2.06a	14.74a
Sequía	109.1b	19.30	41.75b	2.80b	3.50b	8.51b
<i>P</i> . ₀₅	0.011	ns	0.002	0.009	0.020	<.001
SED	4.600		1.380	0.550	0.580	0.712
Genotipos						
cv. HA	104.3a	16.36a	41.56a	2.07	2.80	10.09a
RCSL-76	88.4b	14.79a	35.13b	1.35	1.97	8.42a
RCSL-8	98.6ab	19.98a	37.46b	1.37	2.28	14.01b
RCSL-89	119.9c	25.53b	43.50a	3.32	4.08	13.99b
<i>P</i> . ₀₅	<.001	0.002	<.001	ns	ns	<.001
SED	6.510	2.645	1.950			1.008
Interacción						
GxT (<i>P</i> . ₀₅)	ns	ns	ns	ns	ns	ns

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

En el estadio de grano lechoso tardío, el déficit hídrico condujo a una mayor acumulación foliar de glucosa, fructosa, sacarosa y de carbohidratos solubles en agua y, como ya se observó en la anterior fase de desarrollo, no tuvo efecto en el contenido de fructanos (Tabla 4.35). Los niveles de carbohidratos solubles aumentaron en las líneas RCSL en comparación con el cv. Harrington (Tabla 4.35). El contenido de fructanos aumentó en las líneas RCSL en comparación con Harrington y en la línea 8 con respecto a las líneas 76 y 89 (Tabla 4.35). El contenido de sacarosa aumentó en la línea 89 en comparación con la línea 8 y Harrington (Tabla 4.35).

Tabla 4.35. Contenido foliar de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el estadio de grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmol de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	126.4a	39.0	40.70a	2.94a	2.98a	31.16
Sequía	146.7b	37.2	48.98b	5.42b	6.03b	18.55
$P_{.05}$	<.001	ns	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	5.290		1.260	0.560	0.570	1.850
Genotipos						
cv. HA	119.3a	26.5a	42.91a	3.29	3.74	20.28
RCSL-76	135.1b	35.8b	45.61ab	3.79	4.30	20.98
RCSL-8	143.5b	49.6c	42.33a	4.26	4.96	36.85
RCSL-89	148.1b	40.6b	48.52b	5.39	5.02	21.30
$P_{.05}$	0.004	<.001	0.008	ns	ns	<.001
SED	7.480	4.190	1.790			2.610
Interacción						
GxT ($P_{.05}$)	ns	ns	ns	ns	ns	0.001
SED						3.700

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

La interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.35) mostró que la limitación en la disponibilidad hídrica condujo a un notable descenso del contenido foliar de almidón en las tres líneas RCSL y no tuvo efecto significativo en el cv. Harrington (Fig. 4.38). En plantas de control hídrico, la acumulación de almidón fue mayor en la línea 8 que en el cv. Harrington y las demás líneas RCSL (Fig. 4.38). En plantas de déficit hídrico, el contenido de almidón aumentó en la línea 8 con respecto a la línea 76 y tendió a aumentar, sin llegar a alcanzar significación estadística, en comparación con la línea 89 (Fig. 4.38).

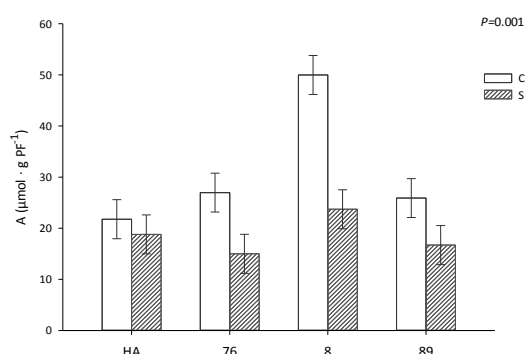


Figura 4.38. Contenido foliar de almidón (A) en el estadio de grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

4.2.2.2.- Contenido de carbohidratos en el último entrenado del tallo principal.

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico incrementó, en comparación con las plantas de control hídrico, el contenido de sacarosa en el último entrenado del tallo principal en un 30.8%, disminuyó el contenido de fructanos un 17% y no tuvo efecto en los niveles de almidón y carbohidratos solubles en agua (Tabla 4.36). El contenido de carbohidratos solubles y fructanos en el último entrenado del tallo fue mayor en la línea 89 que en el cv. Harrington y las otras líneas RCSL, y mayor en Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Tabla 4.36). La acumulación de sacarosa fue mayor en las líneas 76 y 89 que en la línea 8, y mayor en la línea 89 que en el cv. Harrington (Tabla 4.36).

Tabla 4.36. Contenido de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el último entrenado del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmoles de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	161.2	102.6a	16.10a	15.52	10.88	7.31
Sequía	166.7	85.2b	23.28b	18.74	16.16	6.10
<i>P</i> . ₀₅	ns	0.006	<.001	0.009	<.001	ns
SED		5.780	1.307	1.141	0.834	
Genotipos						
cv. HA	134.6a	72.1a	18.85ab	13.36	11.41	5.05
RCSL-76	104.1b	44.1b	20.54ac	10.62	8.34	8.86
RCSL-8	126.6a	69.6a	15.53b	14.13	11.76	6.59
RCSL-89	290.5c	189.9c	23.83c	30.40	22.58	6.32
<i>P</i> . ₀₅	<.001	<.001	0.002	<.001	<.001	ns
SED	10.31	8.170	1.848	1.614	1.180	
Interacción						
GxT (<i>P</i> . ₀₅)	ns	ns	ns	<.001	<.001	ns
SED				2.282	1.668	

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

El análisis de la varianza del contenido de fructosa y glucosa alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.36), mostrando que el déficit hídrico aumentó el contenido de fructosa y glucosa en el último entrenado del tallo de la línea 89 (Fig. 4.39). En condiciones de control hídrico, la acumulación de glucosa y fructosa en el último entrenado del tallo fue mayor en la línea 89 que en las otras líneas RCSL y Harrington (Fig. 4.39). En condiciones de déficit hídrico, el contenido de glucosa y fructosa fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos (Fig. 4.39) y el contenido de glucosa fue también mayor en Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.39b).

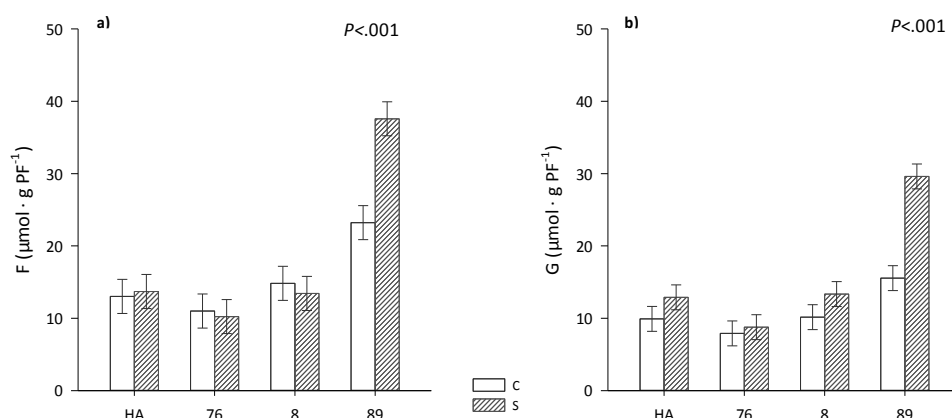


Figura 4.39. Contenido de **a)** fructosa (F) y **b)** glucosa (G) en el último entrenudo del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Isd.

En el estadio de grano lechoso medio, el déficit hídrico aumentó, en comparación con las plantas de control hídrico, el contenido de sacarosa y glucosa en el último entrenudo del tallo en un 16.4% y 31.9%, respectivamente (Tabla 4.37). El contenido de fructosa, glucosa y sacarosa en el último entrenudo del tallo fue mayor en la línea 89 que en el resto de genotipos, y el de sacarosa fue también mayor en la línea 8 que en la línea 76 (Tabla 4.37).

Tabla 4.37. Contenido de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el último entrenudo del tallo principal en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmoles de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas} \cdot \text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa} \cdot \text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	220.6	167.5	22.08a	4.77	4.12a	4.30
Sequía	206.2	140.3	26.41b	7.03	6.05b	3.14
$P_{.05}$	ns	0.033	<.001	ns	0.002	0.002
SED		12.05	0.778		0.546	0.335
Genotipos						
cv. HA	196.7	142.4	22.95ab	4.36a	4.06a	2.99
RCSL-76	97.3	49.3	20.77a	3.23a	3.15a	3.29
RCSL-8	187.5	133.4	23.08b	4.03a	3.85a	4.04
RCSL-89	372.2	290.6	30.17c	11.99b	9.28b	4.56
$P_{.05}$	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	0.012
SED	18.69	17.05	1.101	1.695	0.772	0.473
Interacción						
GxT ($P_{.05}$)	0.011	0.010	ns	ns	ns	0.004
SED	26.43	24.11				0.669

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

La interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.37) puso de manifiesto que el déficit hídrico redujo el contenido de carbohidratos solubles y fructanos en el cv. Harrington (Fig. 4.40ab), y de almidón en las líneas 76 y 89 (Fig. 4.40c). En plantas de control hídrico, el contenido de carbohidratos solubles, fructanos y almidón en el último entrenudo del tallo fue mayor en la línea 89 que en el resto de genotipos (Fig. 4.40), y el de carbohidratos solubles y fructanos fue también mayor en Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.40ab). En plantas de déficit hídrico, el contenido de carbohidratos solubles y fructanos fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, y mayor en el cv. Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.40ab). El contenido de almidón aumentó en la línea 8 en comparación con la línea 76 (Fig. 4.40c).

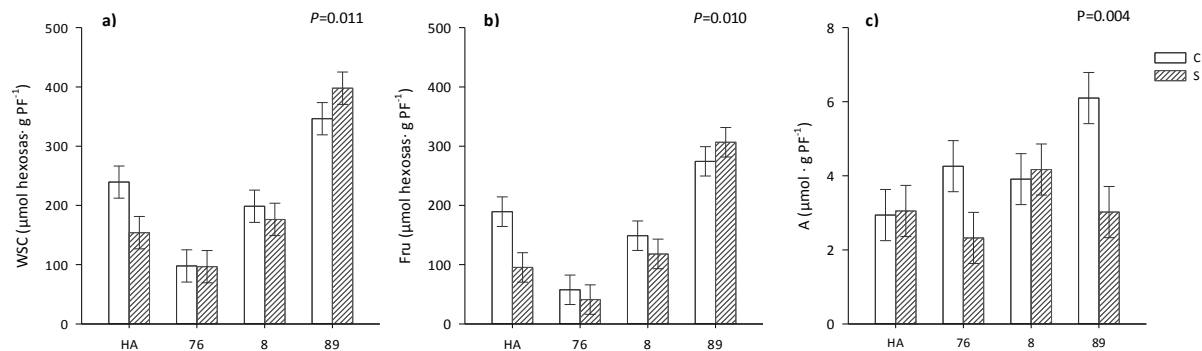


Figura 4.40. Contenido de **a)** carbohidratos solubles en agua (WSC), **b)** fructanos (Fru) y **c)** almidón (A) en el último entrenudo del tallo principal en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

En el estadio de grano lechoso tardío, el déficit hídrico condujo a un aumento del contenido de sacarosa y glucosa en el último entrenudo del tallo y a un descenso de los niveles de almidón, fructanos y del total de carbohidratos solubles, mientras que no tuvo efecto significativo en el contenido de fructosa (Tabla 4.38). La disminución de los niveles de carbohidratos solubles, en comparación con las plantas de control hídrico, se asoció con el notable descenso del contenido de fructanos, que se estimó en un 46.2% (281.2 y 151.2 $\mu\text{mol hexosas} \cdot \text{g PF}^{-1}$ en plantas control y sequía, respectivamente) (Tabla 4.38). El contenido de almidón en el último entrenudo del tallo fue mayor en las líneas RCSL que en el cv. Harrington (Tabla 4.38). Los niveles de carbohidratos solubles, glucosa, fructosa, sacarosa y fructanos en el último entrenudo del tallo aumentaron en la línea 89 en comparación con el resto de genotipos, los de carbohidratos solubles y fructanos aumentaron en el cv. Harrington y la línea 8 con respecto a la línea 76, y los de glucosa y sacarosa aumentaron en la línea 76 en comparación con la línea 8 (Tabla 4.38).

Tabla 4.38. Contenido de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el último entrenudo del tallo principal en el estadio de grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmoles de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	341.6a	281.2a	24.74a	7.15	3.71a	7.25a
Sequía	221.1b	151.2b	28.87b	6.84	5.28b	5.93b
$P_{.05}$	<.001	<.001	<.001	ns	<.001	0.021
SED	15.34	14.33	0.733		0.288	0.536
Genotipos						
cv. HA	270.1a	211.9a	25.21ab	3.83a	3.91ab	4.50a
RCSL-76	196.4b	133.1b	27.03a	4.85a	4.41b	6.59b
RCSL-8	252.3a	196.9a	24.28b	3.47a	3.32a	7.95b
RCSL-89	406.5c	323.0c	30.71c	15.83b	6.33c	7.31b
$P_{.05}$	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	21.70	20.27	1.037	1.601	0.407	0.758
Interacción						
GxT ($P_{.05}$)	ns	ns	ns	ns	ns	ns

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

4.2.2.3.- Contenido de carbohidratos en el penúltimo entrenudo del tallo principal.

En el estadio correspondiente al inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico aumentó, en comparación con las plantas de control hídrico, el contenido de sacarosa en el penúltimo entrenudo del tallo en un 13.9% y redujo el contenido de almidón y del total de carbohidratos solubles en agua en un 75.3% y 25.8%, respectivamente (Tabla 4.39). El contenido de carbohidratos solubles y sacarosa en el penúltimo entrenudo del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con el resto de genotipos, y el de sacarosa fue mayor en el cv. Harrington y la línea 76 que en la línea 8, y el de carbohidratos solubles en agua fue mayor en Harrington que en la línea 8 (Tabla 4.39).

Tabla 4.39. Contenido de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el penúltimo entrenado del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmol de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	214.3a	152.8	20.40a	10.54	10.15	5.38a
Sequía	159.1b	90.0	23.72b	11.03	10.64	1.33b
<i>P</i> . ₀₅	<.001	<.001	0.028	ns	ns	0.012
SED	13.33	12.15	1.423			1.487
Genotipos						
cv. HA	160.9a	99.9	22.74a	7.24	8.27	2.35
RCSL-76	149.0ab	88.0	21.42a	10.47	7.71	1.34
RCSL-8	118.7b	68.5	16.02b	9.89	8.29	4.01
RCSL-89	318.2c	229.2	28.06c	15.55	17.33	5.73
<i>P</i> . ₀₅	<.001	<.001	<.001	0.011	<.001	ns
SED	18.86	17.18	2.012	2.278	1.275	
Interacción						
GxT (<i>P</i> . ₀₅)	ns	0.039	ns	<.001	<.001	ns
SED		24.29		3.222	1.803	

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

El análisis de la varianza del contenido de fructanos, fructosa y glucosa alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.39), indicativa de que el déficit hídrico redujo el contenido de fructanos en el penúltimo entrenado del tallo en la línea 89 y el cv. Harrington (Fig. 4.41a) y el de glucosa y fructosa en la línea 8, mientras que aumentó el contenido de glucosa y fructosa en la línea 89 (Fig. 4.41bc). En condiciones de control hídrico, el contenido de fructanos fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, y mayor en el cv. Harrington que en la línea 8 (Fig. 4.41a). En la línea 89 aumentó el contenido de glucosa en comparación con la línea 76 (Fig. 4.41c). En condiciones de déficit hídrico, el contenido de fructanos, fructosa y glucosa en el penúltimo entrenado del tallo fue mayor en la línea 89 que en Harrington y las otras líneas RCSL (Fig. 4.41).

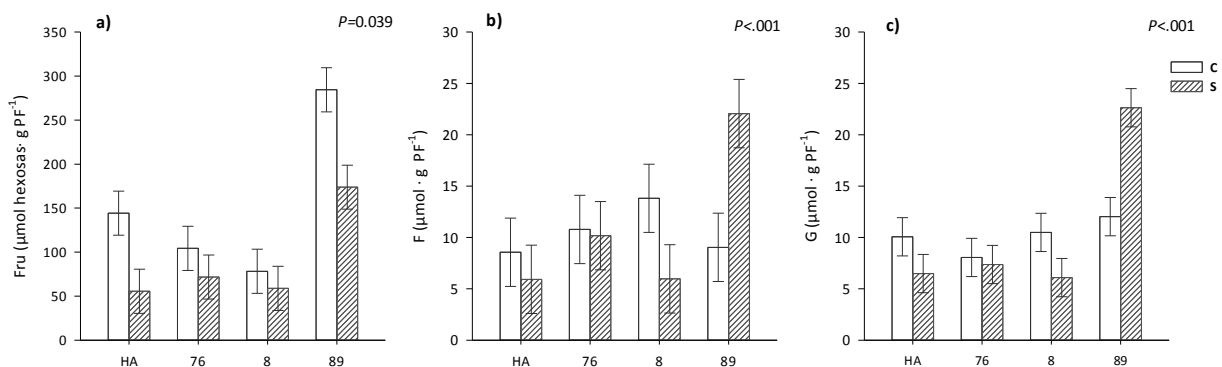


Figura 4.41. Contenido de **a)** fructanos (Fru), **b)** fructosa (F) y **c)** glucosa (G) en el penúltimo entrenado del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

En el estadio de grano lechoso medio, el déficit hídrico no modificó significativamente los niveles de glucosa, fructosa y sacarosa en el penúltimo entrenudo del tallo de las plantas de cebada (Tabla 4.40). El contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en dicha fracción del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con el resto de genotipos, y el contenido de sacarosa fue también mayor en el cv. Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Tabla 4.40).

Tabla 4.40. Contenido de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el penúltimo entrenudo del tallo principal en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmoles de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas}\cdot\text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa}\cdot\text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	421.9	373.2	20.59	3.85	3.59	2.07
Sequía	304.7	252.7	21.96	4.56	3.43	1.69
$P_{.05}$	<.001	<.001	ns	ns	ns	ns
SED	17.98	17.51				
Genotipos						
cv. HA	336.8	289.5	20.49a	3.52a	2.86a	1.89
RCSL-76	202.1	163.6	16.99b	2.54a	2.04a	1.50
RCSL-8	371.7	320.9	21.94a	3.42a	3.51a	1.70
RCSL-89	542.4	478.1	25.67c	7.33b	5.62b	2.41
$P_{.05}$	<.001	<.001	<.001	0.028	0.003	ns
SED	25.43	24.76	0.979	1.585	0.868	
Interacción						
GxT ($P_{.05}$)	0.004	0.005	ns	ns	ns	0.012
SED	35.96	35.02				0.474

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

Los análisis de la varianza del contenido de carbohidratos solubles, fructanos y almidón mostraron significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.40), poniendo de manifiesto que el déficit hídrico redujo el contenido de carbohidratos solubles y fructanos en el cv. Harrington y las líneas 8 y 76 (Fig. 4.42ab) y el contenido de almidón en la línea 89 (Fig. 4.42c). En plantas de control hídrico, el contenido de carbohidratos solubles, fructanos y almidón en el penúltimo entrenudo del tallo fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos (Fig. 4.42), y el contenido de carbohidratos solubles y fructanos fue también mayor en Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.42ab). En plantas de déficit hídrico, el contenido de carbohidratos solubles y fructanos fue mayor en la línea 89 que en los otros genotipos de cebada, y mayor a su vez en el cv. Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.42ab), y el contenido de almidón no varió entre las líneas RCSL y el cv. Harrington (Fig. 4.42c).

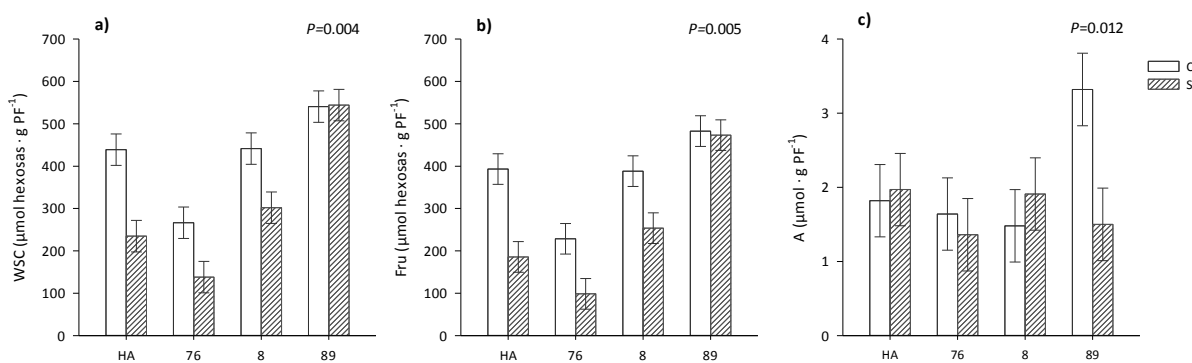


Figura 4.42. Contenido de **a)** carbohidratos solubles en agua (WSC), **b)** fructanos (Fru) y **c)** almidón (A) en el penúltimo entrenudo del tallo principal en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Isd.

En el estadio de grano lechoso tardío, el déficit hídrico aumentó, en comparación con las plantas de control hídrico, el contenido de sacarosa y glucosa en el penúltimo entrenudo del tallo de las plantas de cebada y redujo el contenido de carbohidratos solubles en agua, como consecuencia del notable descenso del contenido de fructanos, que se estimó en un 49% (Tabla 4.41). Los fructanos representaron, en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente, el 88.2%, 89%, 83.2% y 85.6% del total de carbohidratos solubles en el penúltimo entrenudo del tallo (Tabla 4.41). Los niveles de sacarosa, glucosa y fructosa aumentaron en la línea 89 en comparación con los demás genotipos. El contenido de carbohidratos solubles y fructanos aumentó en el resto de genotipos en comparación con la línea 76 y el de carbohidratos solubles en agua fue también mayor en la línea 89 que en el cv. Harrington (Tabla 4.41).

Tabla 4.41. Contenido de carbohidratos solubles totales, fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón en el penúltimo entrenudo del tallo principal en el estadio de grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Datos expresados en μmoles de hexosas por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol hexosas} \cdot \text{g PF}^{-1}$), con la excepción de la sacarosa, que se expresa en $\mu\text{mol sacarosa} \cdot \text{g PF}^{-1}$. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	WSC	Fructanos	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	Almidón
Tratamientos						
Control	529.6a	476.3a	22.02a	6.40	2.89a	4.96
Sequía	299.7b	243.1b	23.33b	5.89	4.05b	3.65
<i>P</i> _{.05}	<.001	<.001	0.049	ns	<.001	0.002
SED	17.92	17.68	0.631		0.310	0.301
Genotipos						
cv. HA	423.2a	373.4a	21.35a	3.82a	3.28a	3.49
RCSL-76	305.6b	254.2b	22.15a	3.91a	3.13a	3.72
RCSL-8	444.7ac	395.7a	21.22a	3.36a	3.19a	4.95
RCSL-89	485.1c	415.4a	25.99b	13.49b	4.28b	4.52
<i>P</i> _{.05}	<.001	<.001	<.001	<.001	0.049	0.007
SED	25.34	25.01	0.892	1.917	0.439	0.425
Interacción						
GxT (<i>P</i> _{.05})	ns	ns	ns	ns	ns	<.001
SED						0.602

WSC (carbohidratos solubles en agua, suma de los contenidos de glucosa y fructosa libres y de las hexosas de la sacarosa y de los fructanos). ns, sin significación estadística.

La interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.41) mostró que el déficit hídrico condujo a un descenso del contenido de almidón en el penúltimo entrenudo del tallo en las líneas 76 y 89 (Fig. 4.43). En condiciones de control hídrico, el contenido de almidón de dicha fracción del tallo fue mayor en las líneas RCSL que en el cv. Harrington y mayor en la línea 89 que en la línea 76 (Fig. 4.43). En condiciones de déficit hídrico, la acumulación de almidón fue mayor en la línea 8 que en las otras líneas RCSL, y mayor a su vez en el cv. Harrington que en la línea 76 (Fig. 4.43).

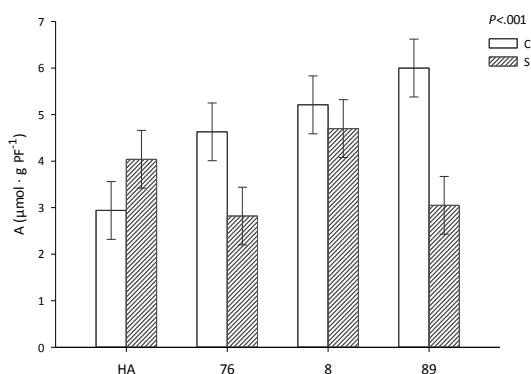


Figura 4.43. Contenido de almidón (A) en el penúltimo entrenudo del tallo principal en el estadio de grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

4.2.2.4.- Contenido foliar de compuestos nitrogenados.

En todas las fases del desarrollo durante la post-antesis de la cebada, el déficit hídrico condujo, en comparación con las plantas de control hídrico, a un aumento del contenido foliar de proteínas solubles, que fue más acusado en el inicio del desarrollo del grano que en los estadios de grano lechoso medio y lechoso tardío (26.7%, 12.5% y 10.3% para cada uno de ellos, respectivamente) (Tabla 4.42). La escasez en la disponibilidad hídrica no tuvo efecto en el contenido de clorofilas en las fases de desarrollo investigadas (Tabla 4.42), con la excepción del estadio de grano lechoso medio en la que redujo el contenido de clorofilas en la línea 76 (Tabla 4.42, Fig. 4.44).

En el inicio del desarrollo del grano, el contenido de clorofilas aumentó en la línea 76 en comparación con los demás genotipos. El contenido de proteínas aumentó en las líneas 76 y 89 en comparación con la línea 8 y Harrington, aunque el aumento en la línea 89 no fue significativo (Tabla 4.42).

Tabla 4.42. Contenido foliar de clorofila total (Chl, mg·g PF⁻¹) y proteína soluble (Prot, mg·g PF⁻¹) en los estadios de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.), grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) y grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones (n=4); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

d.d.s.		Tratamientos				Genotipos				GxT			
		C	S	P _{.05}	SED	HA	76	8	89	P _{.0.5}	SED	P _{.0.5}	SED
70 ± 1	Chl	3.18	3.47	ns		3.27a	3.86b	3.09a	3.07a	0.010	0.242	ns	
	Prot	31.90a	43.50b	<.001	2.710	33.60a	44.90b	34.70a	37.70ab	0.030	3.830	ns	
80 ± 2	Chl	3.03	2.90	ns		2.94	3.30	2.67	2.95	<.001	0.093	0.016	0.13
	Prot	22.96a	26.24b	<.001	0.874	23.70ac	28.43b	24.57a	21.71c	<.001	1.236	ns	
91 ± 3	Chl	2.62	2.64	ns		2.84a	2.93a	2.22b	2.53c	<.001	0.120	ns	
	Prot	19.33a	21.56b	0.001	0.620	24.03a	21.71b	15.95c	20.10b	<.001	0.877	ns	

d.d.s. días después de siembra. ns, sin significación estadística.

En el estadio de grano lechoso medio, el contenido de proteínas fue mayor en la línea 76 que en Harrington y las otras líneas RCSL, y mayor en la línea 8 que en la 89 (Tabla 4.42). El análisis de la varianza del contenido de clorofilas mostró significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.42), poniendo de manifiesto, como se ha indicado con anterioridad, que la escasez en la disponibilidad hídrica redujo el contenido de clorofilas en la línea 76 (Fig. 4.44). En plantas de control hídrico, el contenido de clorofila fue mayor en la línea 76 que en el resto de genotipos, y mayor en el cv. Harrington y la línea 89 que en la línea 8 (Fig. 4.44). En plantas de déficit hídrico, los niveles de clorofila aumentaron en la línea 76 en comparación con la línea 8 y tendió a aumentar, sin llegar a alcanzar significación estadística, con respecto a la línea 89 (Fig. 4.44).

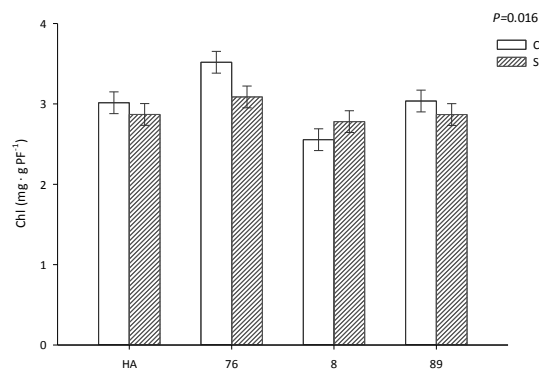


Figura 4.44. Contenido de clorofila total (Chl) en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

En el estadio de grano lechoso tardío, el contenido de clorofilas aumentó en el cv. Harrington y la línea 76 en comparación con las otras líneas RCSL y en la línea 89 en comparación con la línea 8 (Tabla 4.42). El contenido de proteínas solubles fue mayor en el cv. Harrington que en las líneas RCSL, y mayor a su vez en las líneas 76 y 89 que en la línea 8 (Tabla 4.42).

4.2.2.5.- Contenido de proteínas en el último entrenudo del tallo principal.

En todas las fases del desarrollo durante la post-antesis de la cebada, el déficit hídrico indujo la acumulación de proteínas en el último entrenudo del tallo principal (Tabla 4.43). En el inicio del desarrollo del grano, el contenido de proteínas aumentó en el resto de genotipos con respecto a la línea 8 y en la línea 76 y Harrington en comparación con la línea 89 (Tabla 4.43). En el estadio de grano lechoso tardío, el nivel de proteínas en el último entrenudo del tallo fue mayor en Harrington y la línea 76 que en las otras líneas RCSL, y mayor a su vez en la línea 76 que en el cv. Harrington (Tabla 4.43).

Tabla 4.43. Contenido de proteína soluble (Prot, mg·g PF⁻¹) en el último entrenudo del tallo principal en los estadios de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.), grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) y grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA), con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones (n=4); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

d.d.s.	Tratamientos		P _{.05}	SED	Genotipos				P _{.05}	SED	GxT	
	C	S			HA	76	8	89			P _{.05}	SED
70 ± 1	9.60a	12.30b	<.001	0.59	13.42a	14.03a	7.24b	9.09c	<.001	0.84	ns	
80 ± 2	6.62	10.25	<.001	0.23	7.98	8.78	8.05	8.93	0.013	0.33	0.036	0.47
91 ± 3	8.59a	12.25b	<.001	0.25	11.70a	12.47b	8.63c	8.88c	<.001	0.36	ns	

d.d.s. días después de siembra. ns, sin significación estadística.

En el estadio de grano lechoso medio, la interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.43) mostró que la sequía condujo a una mayor acumulación de proteínas en el último entrenudo del tallo en todos los genotipos de cebada (Fig. 4.45). En plantas de control hídrico, el contenido de proteínas fue mayor en la línea 76 que en la línea 8 y el cv. Harrington, y fue similar al de la línea 89 (Fig. 4.45). En plantas de déficit hídrico, el contenido de proteínas aumentó en la línea 89 en comparación con las otras líneas RCSL y Harrington (Fig. 4.45).

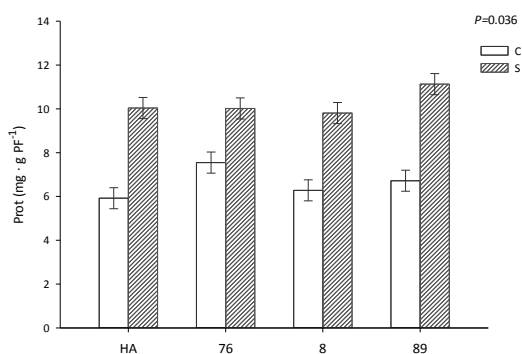


Figura 4.45. Contenido de proteína soluble (Prot) en el último entrenudo del tallo en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

4.2.2.6.- Contenido de proteínas en el penúltimo entrenudo del tallo principal.

Los niveles de proteínas fueron menores con independencia de la disponibilidad hídrica en el penúltimo que en el último entrenudo del tallo durante la post-antesis de la cebada (Tabla 4.44 vs Tabla 4.43).

Tabla 4.44. Contenido de proteína soluble (Prot, mg·g PF⁻¹) en el penúltimo entrenudo del tallo principal en los estadios de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.), grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) y grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA), con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones (n=4); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

d.d.s.	Tratamientos		P _{.05}	SED	Genotipos				P _{.05}	SED	GxT	
	C	S			HA	76	8	89			P _{.05}	SED
70 ± 1	5.47	7.29	<.001	0.235	5.92	6.95	5.72	6.93	<.001	0.332	0.021	0.470
80 ± 2	5.53a	6.75b	<.001	0.245	5.78ac	7.08b	6.24c	5.45a	<.001	0.347	ns	
91 ± 3	4.54a	6.70b	<.001	0.213	4.81a	4.93a	5.79b	6.96c	<.001	0.301	ns	

d.d.s. días después de siembra. ns, sin significación estadística.

En el inicio del desarrollo del grano, la interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.44) mostró que el déficit hídrico aumentó el contenido de proteínas en el penúltimo entrenudo del tallo en las líneas RCSL y no tuvo efecto significativo en el cv. Harrington (Fig. 4.46). En condiciones de control hídrico, el nivel de proteínas fue mayor en la línea 89 que en la línea 8 (Fig. 4.46). En condiciones de déficit hídrico, el contenido de proteínas aumentó en las líneas 76 y 89 en comparación con el cv. Harrington y la línea 8 (Fig. 4.46)

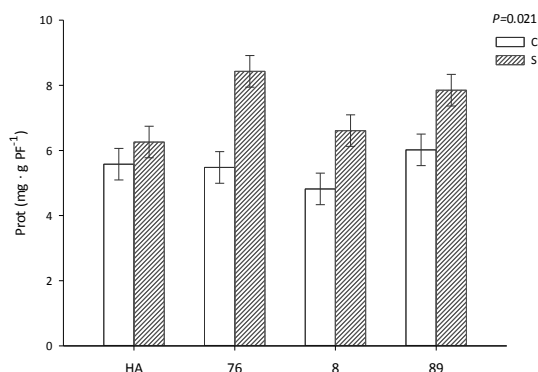


Figura 4.46. Contenido de proteína soluble (Prot) en el penúltimo entrenudo del tallo en el inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

El déficit hídrico aumentó, en comparación con las plantas de control hídrico, el contenido de proteínas en el penúltimo entrenudo del tallo principal en los estadios de grano lechoso medio y lechoso tardío en un 18.07% y 32.24%, respectivamente (Tabla 4.44). En el estadio de grano lechoso medio, el contenido de proteínas aumentó en la línea 76 en comparación con los demás genotipos y en la línea 8 con respecto a la línea 89 (Tabla 4.44). En el estadio de grano lechoso tardío, la acumulación de proteínas en el penúltimo entrenudo del tallo fue mayor en la línea 89 que en Harrington y las otras líneas RCSL, y mayor en la línea 8 que en el cv. Harrington y la línea 76 (Tabla 4.44).

4.2.3.- Efecto del déficit hídrico en la actividad nitrato reductasa foliar de los genotipos de cebada.

En el inicio del desarrollo del grano, el análisis de la varianza de la actividad nitrato reductasa (NR) máxima y selectiva y del estado de activación del enzima alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.45).

Tabla 4.45. Actividad ($\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) y estado de activación (%) de la nitrato reductasa en las hojas bandera y penúltima de la cebada en los estadios de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.), grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) y grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.). Plantas de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

d.d.s		Tratamientos				Genotipos				GxT			
		C	S	<i>P</i> _{.05}	SED	HA	76	8	89	<i>P</i> _{.05}	SED	<i>P</i> _{.05}	SED
70 ± 1	NRM	10.32	17.73	<.001	1.095	15.03	13.03	15.64	12.40	ns		0.008	2.789
	NRS	7.90	14.75	<.001	0.881	12.63	9.76	13.09	9.82	0.020	1.255	0.013	1.775
	%	77.9	83.5	ns		83.8	74.2	83.8	80.9	ns		0.028	6.850
80 ± 2	NRM	11.23a	18.04b	<.001	0.769	16.96a	17.82a	14.44b	9.31c	<.001	1.088	ns	
	NRS	8.43	15.20	<.001	0.669	13.35	14.21	11.80	7.89	<.001	0.946	0.001	1.338
	%	76.6	84.1	0.041	3.44	78.7	77.6	82.4	82.5	ns		0.016	6.870
91 ± 3	NRM	10.55a	14.86b	<.001	0.917	8.62a	17.65b	15.02b	9.52a	<.001	1.296	ns	
	NRS	9.16a	13.35b	<.001	0.845	6.71a	15.76b	13.86b	8.68a	<.001	1.195	ns	
	%	85.9	88.5	ns		76.5a	89.5b	92.1b	90.6b	0.004	4.240	ns	

(NRM) nitrato reductasa máxima (actividad NR en ausencia de magnesio), (NRS) nitrato reductasa selectiva (actividad NR en presencia de magnesio). d.d.s. días después de siembra. ns, sin significación estadística.

Las interacciones significativas genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.45) mostraron que el déficit hídrico aumentó la actividad NR máxima y selectiva en el cv. Harrington y las líneas 76 y 89 y no tuvo efecto significativo en la línea 8 (Fig. 4.47ab), y aumentó también el estado de activación del enzima en la línea 76 (Fig. 4.47c). En plantas de control hídrico, la actividad NR máxima aumentó en la línea 8 en comparación con Harrington y la línea 89 y tendió a aumentar, sin llegar a alcanzar significación estadística, con respecto a la línea 76 (Fig. 4.47a). La actividad nitrato reductasa selectiva fue mayor en la línea 8 que en los demás genotipos (Fig. 4.47b). El estado de activación de la NR fue mayor en Harrington y las líneas 8 y 89 que en la línea 76 (Fig. 4.47c). En plantas de déficit hídrico, la actividad NR máxima y selectiva aumentó en el cv. Harrington en comparación con las tres líneas RCSL (Fig. 4.47ab) y el estado de activación del enzima no varió significativamente entre genotipos (Fig. 4.47c).

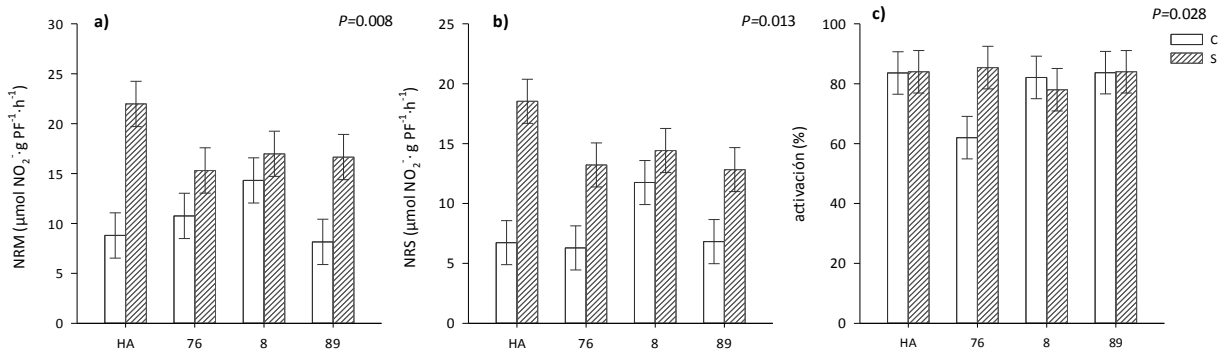


Figura 4.47. a) Actividad nitrato reductasa máxima (NRM), **b)** actividad nitrato reductasa selectiva (NRS) y **c)** estado de activación de la NR (activación) al inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

En el estadio de grano lechoso medio, el déficit hídrico indujo, en comparación con las plantas de control hídrico, un aumento de la actividad NR máxima (Tabla 4.45). La actividad NRM fue mayor en Harrington y las otras líneas RCSL que en la línea 89, y mayor en la línea 76 y el cv. Harrington que en la línea 8 (Tabla 4.45).

Las interacciones significativas genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.45) mostraron que la sequía condujo a un aumento significativo de la actividad NR selectiva en el cv. Harrington y las líneas 76 y 89 (Fig. 4.48a) y del estado de activación de la NR únicamente en la línea 76 (Fig. 4.48b). En condiciones de control hídrico, la actividad NR selectiva de Harrington y las demás líneas RCSL aumentó en comparación con la línea 89 (Fig. 4.48a). El estado de activación de la NR aumentó en la línea 8 en comparación con la línea 76 y tendió a aumentar, sin llegar a alcanzar significación estadística, con respecto la línea 89 y el cv. Harrington (Fig. 4.48b). En condiciones de déficit hídrico, la actividad NR selectiva fue mayor en la línea 76 y Harrington que en la línea 8 y 89 (Fig. 4.48a), mientras que el estado de activación no varió significativamente entre los genotipos (Fig. 4.48b).

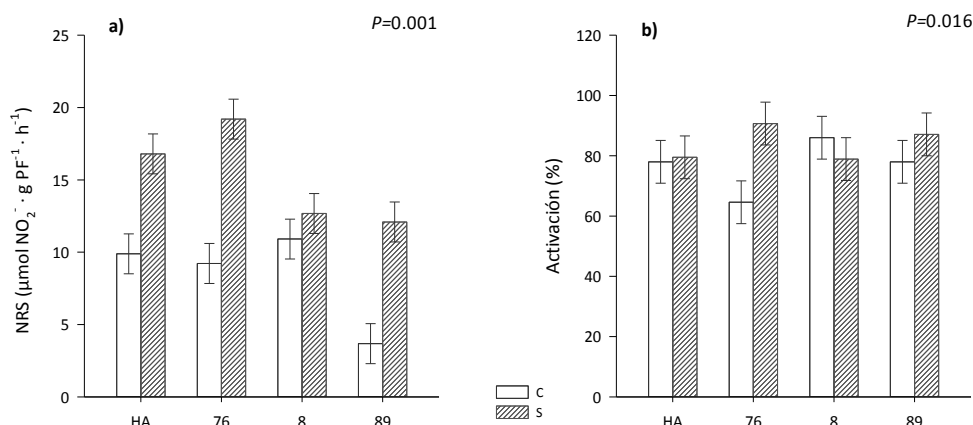


Figura 4.48. a) Actividad nitrato reductasa selectiva (NRS) y **b)** estado de activación de la NR (activación) en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

En el estadio de grano lechoso tardío, el déficit hídrico indujo un aumento de la actividad NR máxima y selectiva y no tuvo efecto en el estado de activación del enzima (Tabla 4.45). La actividad NR máxima y selectiva fue mayor en las líneas 8 y 76 que en la línea 89 y el cv. Harrington, (Tabla 4.45). El estado de activación de la NR aumentó en las líneas RCSL en comparación con el cv. Harrington (Tabla 4.45).

4.2.4.- Efecto del déficit hídrico en el perfil de expresión de genes del metabolismo del carbono y del nitrógeno en los genotipos de cebada.

En los estadios de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano y grano lechoso tardío, se ha evaluado el nivel de expresión de algunos genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo del carbono y nitrógeno. Entre ellos, algunos relacionados con la biosíntesis y degradación de fructanos, tales como la sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST), la sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa (6-SFT), la fructano:fructano 1-fructosiltransferasa (1-FFT) y la fructano 1-exohidrolasa (1-FEH), junto a una invertasa de pared celular (CWINV2) y la nitrato reductasa (NR), enzima clave en la regulación de la asimilación del nitrógeno en plantas.

4.2.4.1.- Nivel de expresión de genes del metabolismo del C y N en las hojas.

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico aumentó los niveles de transcritos del gen que codifica la 1-FEH en las hojas y no tuvo efecto en la expresión del gen que codifica la CWINV2 (Tabla 4.46). Los niveles de transcritos de dichos genes no variaron significativamente entre los genotipos de cebada (Tabla 4.46).

En relación con la expresión génica de proteínas involucradas en la biosíntesis de fructanos, la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.46) mostró que el déficit hídrico condujo a un descenso de transcritos del gen que codifica la 1-SST en las hojas de las líneas 76 y 8, y del gen que codifica la 6-SFT en el cv. Harrington y las líneas 8 y 76, junto a un aumento de los niveles de transcritos del gen que codifica la 1-FFT en la línea 89 (Tabla 4.46). En plantas de control hídrico, la expresión del gen que codifica la 1-SST fue mayor en las otras líneas RCSL que en la línea 89, y la del gen que codifica la 1-FFT aumentó en los otros genotipos en comparación con la línea 89 (Tabla 4.46). La expresión de la 6-SST no varió entre los genotipos (Tabla 4.46). En plantas de déficit hídrico, la expresión génica de la 1-SST aumentó en el resto de genotipos en comparación con la línea 8, la de la 6-SFT aumentó en la línea 89 en comparación con el cv. Harrington y la línea 8, y la de la 1-FFT no mostró diferencias entre los genotipos (Tabla 4.46).

Con respecto a la expresión génica de la nitrato reductasa, la interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.46) puso de manifiesto que el déficit hídrico indujo, con respecto a las plantas control, un incremento de transcritos de la NR en el cv. Harrington y la línea 76 (Tabla 4.46). En condiciones de control hídrico, los niveles de transcritos del gen que codifica la NR aumentaron en las líneas 8 y 89 en comparación con Harrington y la línea 76 (Tabla 4.46). En condiciones de déficit hídrico, la expresión de la NR no varió significativamente entre los genotipos (Tabla 4.46).

Tabla 4.46. Nivel de expresión de los genes del metabolismo del carbono y del nitrógeno en la hoja de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cv. Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C) en los estadios correspondientes al inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.) y grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.). Plantas cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los resultados se muestran en escala \log_2 en un *heat map*. Los genes que no cambian más que el valor umbral establecido aparecen en blanco y los genes que aumentan y disminuyen varían en la intensidad de color azul y rojo, respectivamente.



Genes	Tratamientos		Genotipos				Interacción GxT								
							HA		76		8		89		
	C	S	HA	76	8	89	C	S	C	S	C	S	C	S	
70 ± 1 d.d.s.	CWINV2 (AJ534444)	0.00	0.31	0.00	0.16	0.25	0.59	0.00	0.16	0.29	0.31	0.33	0.44	0.39	1.07
	1-SST (AJ567377)	0.00	-0.82	0.00	0.38	-0.08	-0.12	abc	c	a	bc	ab	d	c	abc
	6-SFT (X83233)	0.00	-2.12	0.00	0.53	-0.05	-0.11	a	c	a	bc	a	c	ab	ab
	1-FFT (JQ411253)	0.00	-0.27	0.00	0.23	0.47	0.00	a	ab	a	ab	a	a	b	a
	1-FEH (AJ605333)	0.00	0.48	0.00	-0.41	0.24	-0.11	0.00	0.16	-0.73	0.21	0.34	0.42	-0.34	0.41
	NR (X57845)	0.00	0.09	0.00	0.11	0.58	0.55	b	a	b	a	a	a	a	a
91 ± 3 d.d.s.	CWINV2 (AJ534444)	0.00	-0.03	a	b	b	b	0.00	0.07	0.50	0.39	0.77	0.94	0.68	0.63
	1-SST (AJ567377)	0.00	-0.38	a	ab	b	ab	0.00	0.03	0.21	0.57	1.99	1.64	0.90	0.49
	6-SFT (X83233)	0.00	-0.97	a	b	b	ab	0.00	-1.07	0.06	-1.15	0.30	0.38	0.42	-1.00
	1-FFT (JQ411253)	0.00	-0.17	a	b	ab	a	0.00	0.01	0.40	0.40	1.22	1.20	0.12	-0.04
	1-FEH (AJ605333)	0.00	0.25	0.00	0.49	0.16	-0.01	0.00	0.27	0.48	0.87	0.17	0.52	0.14	0.20
	NR (X57845)	0.00	0.38	0.00	-0.01	0.24	-0.66	abc	ab	cd	a	abc	a	bcd	d

(CWINV2) invertasa de pared celular, (1-SST) sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa, (6-SFT) sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa, (1-FFT) fructano:fructano 1-fructosiltransferasa, (1-FEH) fructano 1-exohidrolasa y (NR) nitrato reductasa. d.d.s. días después de la siembra. Valores con la misma letra y/o sin ella carecen significación estadística.

En el estadio de grano lechoso tardío, el déficit hídrico condujo a un descenso de transcritos del gen que codifica la 6-SFT y a un aumento de aquellos que codifican la 1-FEH, mientras que no tuvo efecto en la expresión de la 1-SST, 1-FFT y CWINV2 (Tabla 4.46). La acumulación de transcritos del gen que codifica la invertasa de pared celular fue mayor en las líneas RCSL que en el cv. Harrington (Tabla 4.46). Los niveles de transcritos del gen que codifica la 1-SST aumentaron en la línea 8 en comparación con el cv. Harrington (Tabla 4.46), y los del gen que codifica la 1-FEH fueron mayores en la línea 76 que en Harrington y la línea 89 (Tabla 4.46).

La interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.46) mostró que el déficit hídrico indujo la acumulación de transcritos del gen que codifica la NR en las hojas de la línea 76 (Tabla 4.46). En condiciones de control hídrico, la expresión génica de la NR no mostró diferencias significativas entre los genotipos de cebada. En condiciones de déficit hídrico, la acumulación de transcritos del gen que codifica la NR aumentó notablemente en las otras líneas RCSL y el cv. Harrington en comparación con la línea 89 (Tabla 4.46).

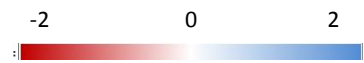
4.2.4.2.- Nivel de expresión de genes del metabolismo del C y N en el último entrenudo del tallo.

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico condujo a un aumento de los niveles de transcritos del gen que codifica la 1-FEH y a un descenso de transcritos del gen que codifica la 6-SFT en el último entrenudo del tallo, y no tuvo efecto en la expresión de la 1-SST (Tabla 4.47). La expresión génica de la 1-SST, 6-SFT y 1-FEH aumentó en las otras líneas RCSL y el cv. Harrington en comparación con la línea 8 (Tabla 4.47).

Los análisis de la varianza de los niveles de expresión génica de la 1-FFT y CWINV2 mostraron significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.47), indicativa de que el déficit hídrico indujo, en el último entrenudo del tallo, la acumulación de transcritos del gen que codifica la 1-FFT en la línea 89 y la del gen que codifica la CWINV2 en las líneas 8 y 76 (Tabla 4.47). En condiciones de control hídrico, la expresión del gen que codifica la 1-FFT fue mayor en la línea 76 y Harrington que en la línea 8 (Tabla 4.47). La expresión génica de la invertasa de pared celular aumentó en la línea 89 en comparación con los otros genotipos y en el cv. Harrington y la línea 76 con respecto a la línea 8 (Tabla 4.47). En plantas de déficit hídrico, los niveles de transcritos del gen que codifica la 1-FFT aumentaron en los otros genotipos en comparación con la línea 8, y los del gen que codifica la CWINV2 fueron mayores en la línea 89 que en el cv. Harrington y la línea 8 (Tabla 4.47).

En relación con la expresión de la nitrato reductasa, la interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.47) mostró que la sequía indujo la expresión génica de la NR en el último entrenudo del tallo en el cv. Harrington y las líneas 76 y 8, y no tuvo efecto significativo en la expresión de la NR en la línea 89 (Tabla 4.47). En plantas de control hídrico, la acumulación de transcritos de la NR aumentó en la línea 89 en comparación con el resto de genotipos y en las líneas 76 y 8 en comparación con el cv. Harrington (Tabla 4.47). En plantas de déficit hídrico, el nivel de expresión de la NR no varió significativamente entre los genotipos de cebada (Tabla 4.47).

Tabla 4.47. Nivel de expresión de los genes del metabolismo del carbono y del nitrógeno en el último entrenudo del tallo de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cv. Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C) en los estadios correspondientes al inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.) y grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.). Plantas cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los resultados se muestran en escala \log_2 en un *heat map*. Los genes que no cambian más que el valor umbral establecido aparecen en blanco y los genes que aumentan y disminuyen varían en la intensidad de color azul y rojo, respectivamente.



Genes	Tratamientos		Genotipos				Interacción GxT								
							HA		76		8		89		
	C	S	HA	76	8	89	C	S	C	S	C	S	C	S	
70 ± 1 d.d.s.							cd	bcd	d	abc	e	cd	ab	a	
	CWINV2 (AJ534444)	0.00	0.51	0.00	-0.06	-0.63	1.05	0.00	0.14	-0.42	0.54	-1.06	0.03	0.86	1.46
	1-SST (AJ567377)	0.00	-0.14	0.00	0.16	-0.92	0.62	0.00	-0.73	-0.18	-0.12	-0.94	-1.53	-0.17	0.79
	6-SFT (X83233)	0.00	-0.51	0.00	0.04	-1.31	0.46	0.00	-0.75	0.14	-0.70	-1.51	-1.76	-0.14	0.42
	1-FFT (JQ411253)	0.00	-0.11	0.00	-0.04	-1.10	-0.63	0.00	-0.39	-0.05	-0.38	-1.06	-1.48	-0.80	0.33
	1-FEH (AJ605333)	0.00	0.37	0.00	-0.36	-0.69	-0.03	0.00	0.00	-0.64	-0.08	-0.98	-0.40	-0.32	0.26
	NR (X57845)	0.00	1.39	0.00	0.67	0.03	0.83	0.00	2.30	0.85	2.98	0.63	1.93	1.81	2.36
91 ± 3 d.d.s.			a	b	b	b									
	CWINV2 (AJ534444)	0.00	-0.06	0.00	0.48	0.52	0.59	0.00	-0.27	0.52	0.21	0.38	0.44	0.29	0.66
	1-SST (AJ567377)	0.00	-0.63	0.00	-0.96	0.64	-0.05	0.00	-0.90	-1.40	-1.26	0.55	0.00	-0.25	-0.58
	6-SFT (X83233)	0.00	-0.51	0.00	-0.07	0.11	-0.38	0.00	-1.00	-0.29	-0.66	-0.15	-0.43	-0.65	0.91
	1-FFT (JQ411253)	0.00	-0.35	0.00	-0.39	0.43	-0.55	0.00	-0.80	-0.61	-0.80	0.16	0.04	-0.87	-0.88
	1-FEH (AJ605333)	0.00	0.40	0.00	0.53	0.36	-0.33	0.00	0.21	0.24	0.82	0.16	0.79	-0.36	-0.07
	NR (X57845)	0.00	1.24	0.00	0.06	0.32	-0.28	0.00	1.65	0.38	1.85	0.67	2.09	0.47	1.10

(CWINV2) invertasa de pared celular, (1-SST) sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa, (6-SFT) sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa, (1-FFT) fructano:fructano 1-fructosiltransferasa, (1-FEH) fructano 1-exohidrolasa y (NR) nitrato reductasa. d.d.s. días después de la siembra. Valores con la misma letra y/o sin ella carecen significación estadística.

En el estadio de grano lechoso tardío, al igual que en el anterior estadio de desarrollo, el déficit hídrico indujo la expresión génica de la 1-FEH y redujo la expresión de la 6-SFT en el último entrenudo del tallo (Tabla 4.47), aunque no tuvo efecto en la expresión génica de la CWINV2 (Tabla 4.47). Entre genotipos, los niveles de transcritos del gen que codifica la 1-FFT aumentaron en la línea 8 en comparación con las otras líneas RCSL y Harrington, y los del gen que codifica la 1-SST aumentaron en la línea 8 con respecto a la línea 76. La expresión génica de la 1-FEH fue mayor en las líneas 8 y 76 que en la línea 89 y el cv. Harrington, y la expresión de la invertasa de pared celular aumentó en las líneas RCSL en comparación con el cv. Harrington (Tabla 4.47).

En esta fase del desarrollo, la sequía condujo a un aumento de transcritos del gen que codifica la NR en el último entrenudo del tallo (Tabla 4.47). Los niveles de transcritos de dicho gen no variaron significativamente entre los genotipos de cebada (Tabla 4.47).

4.2.5.- Efecto del déficit hídrico en el crecimiento de los genotipos de cebada.

En el presente apartado se describen los resultados de la evaluación del crecimiento de las plantas de cebada, para cada uno de los niveles de disponibilidad hídrica estudiados y genotipos, en las fases del desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.), grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.), grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) y en la madurez (161 ± 1 d.d.s.) (ver apartado, descripción de los experimentos).

4.2.5.1.- Parámetros de crecimiento de las plantas de cebada en la fase reproductiva.

Para la estimación del crecimiento, se recogió una planta para cada nivel hídrico estudiado, genotipo y repetición en las mismas fases del desarrollo que para la determinación de metabolitos, se separó el tallo principal del resto de la planta y se fraccionó en espiga, hojas bandera y penúltima agrupadas conjuntamente (ya que constituyen la muestra foliar recogida con nitrógeno líquido para el análisis de metabolitos foliares), resto de hojas, último y penúltimo entrenudos del tallo y resto del tallo, determinándose el peso fresco y seco y la superficie verde de cada una de las partes y del total del tallo principal.

4.2.5.1.1.- Contenido hídrico relativo de las hojas.

En el inicio del desarrollo del grano, la escasez de agua no tuvo efecto en el contenido hídrico relativo de las hojas, bandera y penúltima, de los genotipos de cebada (Tabla 4.48). En el estadio de grano lechoso medio, el déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas control, el contenido hídrico relativo de las hojas en un 3.82% (Tabla 4.48).

Tabla 4.48. Contenido hídrico relativo (%) de las hojas en los estadios de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.), grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) y grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones (n=4); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

d.d.s.	Tratamientos				Genotipos				GxT			
	C	S	P _{.05}	SED	HA	76	8	89	P _{.05}	SED	P _{.05}	SED
70 ± 1	90.85	88.96	ns		90.86	89.92	88.24	90.61	ns		ns	
80 ± 2	86.45a	83.14b	0.016	1.284	85.15	81.89	85.61	86.53	ns		ns	
91 ± 3	88.66	85.58	0.031	1.347	87.82	82.59	92.75	85.32	<.001	1.905	0.003	2.694

d.d.s. días después de la siembra. ns, sin significación estadística.

En el estadio de grano lechoso tardío, la interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.48) mostró que la sequía redujo el contenido hídrico relativo de las hojas en la línea 76, mientras que en el resto de genotipos no tuvo efecto significativo (Fig. 4.49). En condiciones de control hídrico, el contenido hídrico relativo de las hojas de la línea 8 aumentó en comparación con la línea 89 (Fig. 4.49). En condiciones de déficit hídrico, el RWC de las hojas aumentó en el resto de genotipos en comparación con la línea 76 (Fig. 4.49).

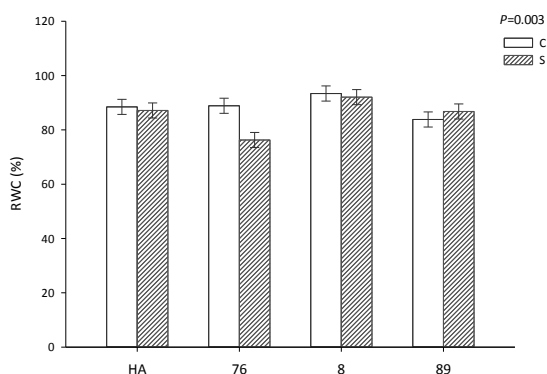


Figura 4.49. Contenido hídrico relativo (RWC) de las hojas de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C) en el estadio de grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.). Plantas cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

4.2.5.1.2.- Área foliar específica.

Tabla 4.49. Área foliar específica (cm²·g⁻¹) en los estadios de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.), grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) y grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones (n=4); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

d.d.s.	Tratamientos				Genotipos				GxT			
	C	S	P _{.05}	SED	HA	76	8	89	P _{.05}	SED	P _{.05}	SED
70 ± 1	156.0	146.1	ns		155.6	161.1	149.9	137.8	0.056	8.23	0.050	11.63
80 ± 2	166.5a	145.8b	<.001	5.33	157.2ab	169.5b	146.3a	151.4a	0.033	7.54	ns	
91 ± 3	161.6a	138.8b	<.001	4.08	151.3ab	163.0b	144.8a	141.8a	0.006	5.77	ns	

d.d.s. días después de siembra. ns, sin significación estadística.

En el inicio del desarrollo del grano, el análisis de la varianza del área foliar específica (SLA, *Specific leaf area*) mostró significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.49), indicativa de que el déficit hídrico redujo el área foliar específica en la línea 76 (Fig. 4.50). En plantas de control hídrico, el SLA aumentó en la línea 76 en comparación con las otras líneas RCSL. En plantas de déficit hídrico, el SLA fue mayor en la línea 8 que en la 89 (Fig. 4.50).

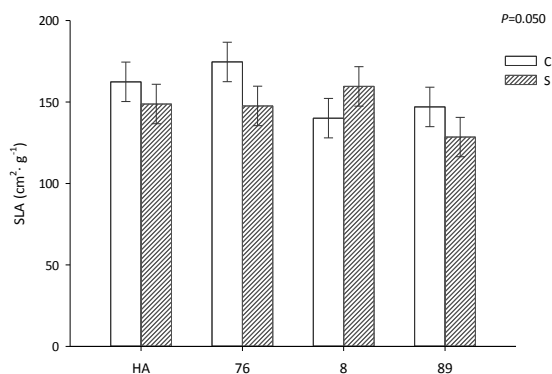


Figura 4.50. Área foliar específica (SLA) al inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

En los estadios de grano lechoso medio y lechoso tardío, el déficit hídrico disminuyó, en comparación con las plantas de control hídrico, el área foliar específica un 12.4% y 14.1%, respectivamente (Tabla 4.49). El SLA aumentó en la línea 76 en comparación con las otras líneas RCSL y fue similar a la del cv. Harrington (Tabla 4.49).

4.2.5.1.3.- Superficie verde de las partes del tallo principal.

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, la superficie verde de la espiga, hojas, último entrenudo y resto del tallo, total del tallo y tallo principal en un 14.31%, 23.72%, 11.43 %, 9.59%, 9.20% y 7.93%, respectivamente (Tabla 4.50). Entre genotipos, el área verde de las hojas aumentó en el resto de genotipos en comparación con la línea 76 (Tabla 4.50). La superficie verde del resto de hojas aumentó en las líneas 76 y 89 con respecto a Harrington y la línea 8 (Tabla 4.50). El área verde de la espiga, último y penúltimo entrenudos del tallo, resto y total del tallo fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, y mayor a su vez en el cv. Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Tabla 4.50). La superficie verde del tallo principal aumentó en la línea 89 en comparación con Harrington y las demás líneas RCSL, y no varió significativamente entre estos últimos genotipos (Tabla 4.50).

Tabla 4.50. Superficie verde (cm²) de las diferentes partes del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones (n=4); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	E	Hojas	RH	UE	PE	RT	TT	TP
Tratamientos								
Control	34.51a	9.02a	40.4	18.99a	15.57	41.52a	76.1a	160.2a
Sequía	29.57b	6.88b	42.0	16.82b	14.69	37.54b	69.1b	147.5b
<i>P</i> _{.05}	0.003	0.015	ns	0.006	ns	0.039	0.006	0.022
SED	1.486	0.820		0.718		1.823	2.31	5.120
Genotipos								
cv. HA	32.67a	10.23a	36.1a	17.83a	14.50a	35.07a	67.4a	146.4a
RCSL-76	24.98b	4.41b	49.6b	14.57b	10.87b	28.95b	54.4b	133.4a
RCSL-8	30.54a	8.97a	33.5a	17.29a	14.33a	34.70a	66.3a	139.4a
RCSL-89	39.97c	8.19a	45.6b	21.92c	20.82c	59.41c	102.2c	195.9b
<i>P</i> _{.05}	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	2.102	2.393	3.760	1.015	0.925	2.579	3.27	7.250
Interacción								
GxT (<i>P</i> _{.05})	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

(E) espiga, (Hojas) bandera y penúltima, (RH) resto de hojas, (UE) último entrenudo del tallo, (PE) penúltimo entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo, (TT) total de la fracción tallo (suma del último y penúltimo entrenudos del tallo y resto del tallo) y (TP) tallo principal (suma de las diferentes partes). ns, sin significación estadística.

En el estadio de grano lechoso medio, el déficit hídrico condujo, en comparación con las plantas control, a un descenso de la superficie verde de las hojas, resto y total del tallo, que se estimó en un 36.1%, 15% y 13.1%, respectivamente (Tabla 4.51). La superficie verde de la espiga fue mayor en la línea 89 que en el resto de genotipos, y mayor en Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Tabla 4.51). El área verde foliar aumentó en el resto de genotipos en comparación con la línea 76 (Tabla 4.51). La superficie verde del resto y total del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con el resto de genotipos, la superficie verde del resto del tallo fue mayor en el cv. Harrington que en la línea 76 y la del total del tallo fue mayor en Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Tabla 4.51).

Tabla 4.51. Superficie verde (cm²) de las diferentes partes del tallo principal en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones (n=4); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	E	Hojas	RH	UE	PE	RT	TT	TP
Tratamientos								
Control	43.56	10.51a	31.2	19.76	16.65	39.9a	76.4a	161.6
Sequía	41.77	6.72b	31.2	18.05	14.44	33.9b	66.4b	144.1
<i>p</i> _{.05}	ns	<.001	ns	0.004	<.001	0.010	<.001	<.001
SED		0.877		0.536	0.452	2.17	2.48	4.60
Genotipos								
cv. HA	42.53a	10.30a	32.6	18.89	15.55	34.2a	68.6a	154.0
RCSL-76	36.58b	5.79b	34.7	15.93	12.56	26.9b	55.4b	132.4
RCSL-8	42.04a	8.82a	24.7	18.20	14.40	33.0ab	65.6a	141.2
RCSL-89	49.52c	9.55a	32.7	22.60	19.67	53.6c	95.8c	183.8
<i>p</i> _{.05}	<.001	0.007	0.013	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	2.480	1.241	2.960	0.758	0.640	3.070	3.500	6.500
Interacción								
GxT (<i>p</i> _{.05})	ns	ns	0.005	0.050	0.006	ns	ns	0.025
SED			4.18	1.072	0.905			9.200

(E) espiga, (Hojas) bandera y penúltima, (RH) resto de hojas, (UE) último entrenudo del tallo, (PE) penúltimo entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo, (TT) total de la fracción tallo (suma del último y penúltimo entrenudos del tallo y resto del tallo) y (TP) tallo principal (suma de las diferentes partes). ns, sin significación estadística.

Las interacciones significativas genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.51) pusieron de manifiesto que el estrés hídrico disminuyó la superficie verde del resto de hojas, penúltimo entrenudo del tallo y tallo principal en la línea 8 (Fig. 4.51acd), la del último y penúltimo entrenudos del tallo y tallo principal en la línea 89 (Fig. 4.51bcd) y aumentó el área verde del resto de hojas en la línea 76 (Fig. 4.51a) y no tuvo efecto significativo en dichas superficies en el cv. Harrington (Fig. 4.51). En plantas de control hídrico, la superficie verde del último y penúltimo entrenudos del tallo y del tallo principal aumentó en la línea 89 en comparación con el resto de genotipos (Fig. 4.51bcd), y la del penúltimo entrenudo del tallo y tallo principal fue mayor en el cv. Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.51cd). El área verde del resto de hojas no varió significativamente entre genotipos (Fig. 4.51a). En plantas de déficit hídrico, la superficie verde del resto de hojas fue mayor en el resto de genotipos que en la línea 8, y mayor a su vez en la línea 76 que en la línea 89 (Fig. 4.51a). El área verde del penúltimo entrenudo del tallo fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, y mayor en Harrington que en las líneas 8 y 76 (Fig. 4.51c). La superficie verde del último entrenudo del tallo fue mayor en el resto de genotipos que en la línea 76, y mayor en la línea 89 que en la línea 8 (Fig. 4.51b). El área verde del tallo principal aumentó en el cv. Harrington y la línea 89 en comparación con las otras dos líneas RCSL (Fig. 4.51d).

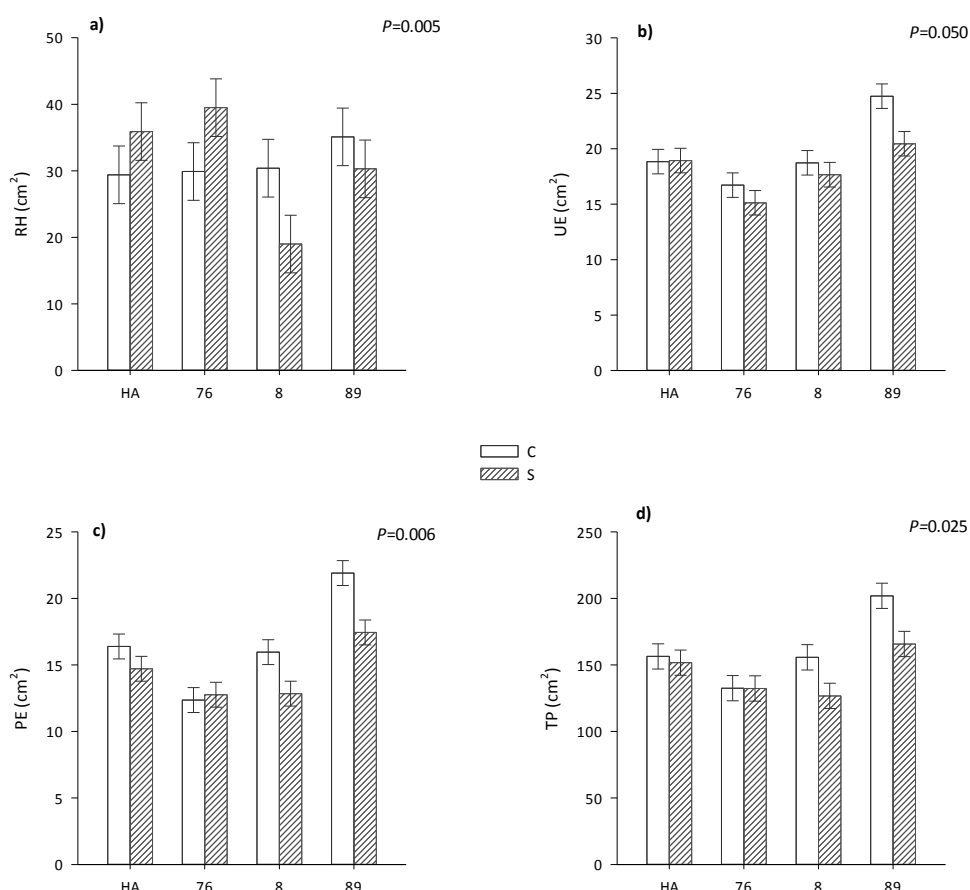


Figura 4.51. Superficie verde de las partes del tallo principal en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.). **a)** Resto de hojas (RH), **b)** último entrenudo del tallo (UE), **c)** penúltimo entrenudo del tallo (PE) y **d)** tallo principal (TP) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

En el estadio de grano lechoso tardío, el déficit hídrico disminuyó, en comparación con las plantas de control hídrico, la superficie verde de las hojas, espiga y penúltimo entrenudo del tallo en un 32.14%, 5.87% y 8.25%, respectivamente (Tabla 4.52). Además, la escasez en la disponibilidad hídrica aumentó la superficie verde del resto de hojas en un 17.18% (Tabla 4.52). La superficie verde de la espiga fue mayor en las líneas 8 y 89 que en el cv. Harrington y la línea 76, y mayor en Harrington que en la línea 76 (Tabla 4.52). El área verde de las hojas bandera y penúltima fue mayor en Harrington y la línea 8 que en las otras dos líneas RCSL, y mayor a su vez en la línea 89 que en la 76 (Tabla 4.52). La superficie verde del resto de hojas aumentó en la línea 76 y Harrington y tendió a aumentar, sin llegar a alcanzar significación estadística, en la línea 89 en comparación con la línea 8 (Tabla 4.52). El área verde del último y penúltimo entrenudos del tallo, resto y total del tallo y tallo principal fue mayor en la línea 89 que en el resto de genotipos, y mayor en Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Tabla 4.52).

Tabla 4.52. Superficie verde (cm²) de las diferentes partes del tallo principal en el estadio de grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones (n=4); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	E	Hojas	RH	UE	PE	RT	TT	TP
Tratamientos								
Control	44.98a	10.33a	20.29a	18.38	15.40a	33.68	67.46	143.1
Sequía	42.34b	7.01b	24.50b	17.68	14.13b	32.68	64.49	138.3
<i>P</i> _{.05}	0.044	<.001	0.031	ns	0.048	ns	ns	ns
SED	1.244	0.607	1.835		0.613			
Genotipos								
cv. HA	41.83a	10.29a	26.23a	18.79a	14.72a	30.06a	63.57a	141.9a
RCSL-76	36.64b	5.54b	23.65a	15.11b	11.89b	22.62b	49.62b	115.5b
RCSL-8	46.64c	10.43a	17.37b	17.66a	14.42a	31.38a	63.45a	137.3a
RCSL-89	50.09c	8.43c	22.32ab	20.57c	18.02c	48.67c	87.27c	168.1c
<i>P</i> _{.0.5}	<.001	<.001	0.017	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	1.759	0.859	2.595	0.753	0.867	1.962	2.795	5.220
Interacción								
GxT (<i>P</i> _{.0.5})	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

(E) espiga, (Hojas) bandera y penúltima, (RH) resto de hojas, (UE) último entrenudo del tallo, (PE) penúltimo entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo, (TT) total de la fracción tallo (suma del último y penúltimo entrenudos del tallo y resto del tallo) y (TP) tallo principal (suma de las diferentes partes). ns, sin significación estadística.

4.2.5.1.4.- Porcentaje de humedad de las partes del tallo principal.

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas control, el porcentaje de humedad de las hojas, bandera y penúltima, y del resto de hojas del tallo principal de las plantas (4.99% y 3.58%, respectivamente), y aumentó el porcentaje de humedad del penúltimo entrenudo y del resto del tallo (1.67% y 2.66%, respectivamente), y no tuvo efecto significativo en el porcentaje de humedad de la espiga, del último entrenudo del tallo y del tallo principal (Tabla 4.53). El contenido porcentual de humedad de las hojas aumentó en la línea 8 en comparación con las otras líneas RCSL y fue similar al del cv. Harrington, y el del resto de hojas aumentó en la línea 76 con respecto al resto de genotipos (Tabla 4.53). El porcentaje de humedad del último y penúltimo entrenudos del tallo y resto del tallo aumentó en los otros genotipos en comparación con la línea 89, y el del resto del tallo fue mayor en la línea 76 que en el cv. Harrington y la línea 8 (Tabla 4.53).

Tabla 4.53. Contenido porcentual de humedad (%) de las diferentes partes del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	E	Hojas	RH	UE	PE	RT	TP
Tratamientos							
Control	67.07	72.16a	75.65a	75.72	78.14a	78.39a	75.59
Sequía	64.79	68.56b	72.94b	75.02	79.47b	80.53b	74.88
$P_{.05}$	ns	<.001	0.036	ns	0.016	<.001	ns
SED		0.752	1.224		0.516	0.501	
Genotipos							
cv. HA	63.82	70.12ab	73.42a	76.05a	79.57a	80.45a	75.62
RCSL-76	67.02	69.83a	79.00b	76.46a	80.00a	81.94b	76.22
RCSL-8	67.86	72.22b	72.91a	77.21a	80.70a	79.67a	76.11
RCSL-89	65.03	69.28a	71.86a	71.76b	74.96b	75.78c	72.98
$P_{.05}$	ns	0.054	0.002	<.001	<.001	<.001	ns
SED		1.064	1.731	0.648	0.729	0.708	
Interacción							
GxT ($P_{.05}$)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

(E) espiga, (Hojas) bandera y penúltima, (RH) resto de hojas, (UE) último entrenudo del tallo, (PE) penúltimo entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo y (TP) tallo principal (suma de las diferentes partes). ns, sin significación estadística.

En el estadio de grano lechoso medio, el déficit hídrico redujo, con respecto a las plantas de control hídrico, el porcentaje de humedad de las hojas en un 7.83% (Tabla 4.54), y a su vez aumentó el porcentaje de humedad del resto del tallo en un 5.5% (Tabla 4.54), y no tuvo efecto en el porcentaje de humedad de la espiga, el último entrenudo del tallo y del tallo principal (Tabla 4.54). Los efectos inducidos por la sequía en las partes del tallo principal antes indicadas fueron sensiblemente superiores a los observados al inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.54). El porcentaje de humedad de la espiga aumentó en las otras líneas RCSL en comparación con la línea 89 y fue similar al del cv. Harrington (Tabla 4.54). El contenido porcentual de humedad del resto del tallo fue mayor en los otros genotipos que en la línea 89, y mayor en la línea 76 que en la línea 8 y el cv. Harrington (Tabla 4.54).

Tabla 4.54. Contenido porcentual de humedad (%) de las diferentes partes del tallo principal en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	E	Hojas	RH	UE	PE	RT	TP
Tratamientos							
Control	63.78	72.39a	72.4	72.98	72.70	72.48a	69.87
Sequía	63.25	66.72b	66.5	71.53	75.67	76.49b	70.57
$P_{.05}$	ns	<.001	0.011	ns	<.001	<.001	ns
SED		1.287	2.150		0.424	0.529	
Genotipos							
cv. HA	63.36ab	68.90	71.7	71.74	74.89	75.42a	70.73
RCSL-76	64.08a	70.74	76.4	74.10	77.40	77.82b	72.81
RCSL-8	65.13a	70.02	65.9	73.46	75.81	74.94a	70.61
RCSL-89	61.49b	68.54	63.7	67.71	68.63	69.74c	66.74
$P_{.05}$	0.024	ns	0.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	0.789		3.030	0.552	0.600	0.748	0.828
Interacción							
GxT ($P_{.05}$)	ns	ns	0.039	0.006	0.043	ns	0.036
SED			4.290	0.781	0.849		1.171

(E) espiga, (Hojas) bandera y penúltima, (RH) resto de hojas, (UE) último entrenudo del tallo, (PE) penúltimo entrenudo del tallo (RT) resto del tallo y (TP) tallo principal (suma de las diferentes partes). ns, sin significación estadística.

Las interacciones significativas genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.54) mostraron que el déficit hídrico redujo el porcentaje de humedad del resto de hojas en las líneas 8 y 89 y el del último entrenudo del tallo en la línea 89 (Fig. 4.52ab). La escasez en la disponibilidad hídrica también incrementó el porcentaje de humedad del penúltimo entrenudo del tallo en todos los genotipos de cebada (Fig. 4.52c), y el del último entrenudo del tallo y del tallo principal en el cv. Harrington (Fig. 4.52bd). En plantas de control hídrico, el porcentaje de humedad del último y penúltimo entrenudos del tallo y del tallo principal aumentó en los otros genotipos en comparación con la línea 89 (Fig. 4.52bcd), el del último y penúltimo entrenudos del tallo fue mayor en las líneas 8 y 76 que en el cv. Harrington (Fig. 4.52bc), y el del tallo principal fue mayor en la línea 76 que en el cv. Harrington (Fig. 4.52d). En plantas de déficit hídrico, el contenido porcentual de humedad del resto de hojas aumentó en Harrington y la línea 76 en comparación con las otras líneas RCSL (Fig. 4.52a). El porcentaje de humedad del último y penúltimo entrenudos del tallo y del tallo principal fue mayor en el cv. Harrington y las demás líneas RCSL que en la línea 89 (Fig. 4.52bcd), el del penúltimo entrenudo fue mayor en la línea 76 que en la línea 8 (Fig. 4.52c), y el del tallo principal fue mayor en el cv. Harrington y la línea 76 que la línea 8 (Fig. 4.52d).

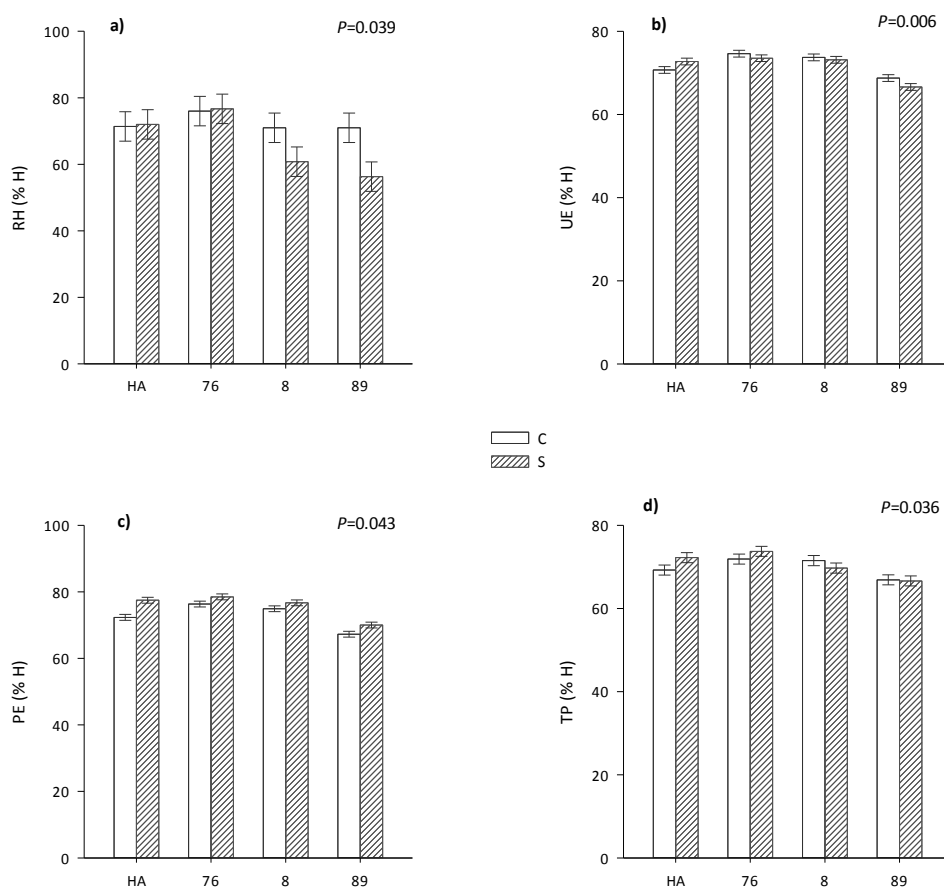


Figura 4.52. Contenido porcentual de humedad de las partes del tallo principal en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.). **a)** Resto de hojas (RH), **b)** último entrenudo del tallo (UE), **c)** penúltimo entrenudo del tallo (PE) y **d)** tallo principal (TP) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

En el estadio de grano lechoso tardío, el déficit hídrico disminuyó, con respecto a las plantas control, el porcentaje de humedad de las hojas en un 6.54%, y aumentó el contenido porcentual de humedad del resto del tallo en un 7.37% y no tuvo efecto en el porcentaje de humedad del resto de hojas, espiga y tallo principal (Tabla 4.55). El contenido porcentual de humedad de las hojas aumentó en las otras líneas RCSL y Harrington en comparación con la línea 89, y el del resto de hojas fue mayor en Harrington y la línea 76 que en la línea 8 (Tabla 4.55). El porcentaje de humedad del resto del tallo aumentó en la línea 76 y Harrington en comparación con las líneas 8 y 89, y el del tallo principal fue mayor en el cv. Harrington que en las líneas 8 y 89, y mayor en la línea 76 que en la línea 89 (Tabla 4.55).

Tabla 4.55. Contenido porcentual de humedad (%) de las diferentes partes del tallo principal en el estadio de grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	E	Hojas	RH	UE	PE	RT	TP
Tratamientos							
Control	54.03	71.24a	66.0	69.04	70.64	68.67a	63.74
Sequía	51.74	66.58b	67.7	70.68	74.89	74.13b	65.18
$P_{.05}$	ns	<.001	ns	0.006	<.001	<.001	ns
SED		0.530		0.549	0.575	0.579	
Genotipos							
cv. HA	55.44	69.28a	70.0a	70.84	73.37	72.83a	66.27a
RCSL-76	51.67	69.35a	71.0a	72.39	75.80	74.49a	65.55ab
RCSL-8	54.31	69.83a	62.2b	70.24	72.45	69.35b	63.89bc
RCSL-89	50.12	67.15b	64.2ba	65.97	69.44	68.91b	62.13c
$P_{.05}$	ns	0.007	0.038	<.001	<.001	<.001	0.003
SED		0.750	3.390	0.776	0.813	0.819	1.054
Interacción							
GxT ($P_{.05}$)	ns	ns	ns	0.009	0.012	ns	ns
SED				1.098	1.150		

(E) espiga, (Hojas) bandera y penúltima, (RH) resto de hojas, (UE) último entrenudo del tallo, (PE) penúltimo entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo y (TP) tallo principal (suma de las diferentes partes). ns, sin significación estadística.

Las interacciones significativas genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.55) mostraron que la sequía aumentó el porcentaje de humedad del último y penúltimo entrenudos del tallo en la línea 8 y el cultivar Harrington (Fig. 4.53), y el del penúltimo entrenudo del tallo en la línea 76 (Fig. 4.53b). En condiciones de control hídrico, el porcentaje de humedad del último y penúltimo entrenudos del tallo aumentó en la línea 76 en comparación con Harrington y las demás líneas RCSL (Fig. 4.53), y el del último entrenudo del tallo aumentó en la línea 8 en comparación con la línea 89 (Fig. 4.53a). En condiciones de déficit hídrico, el contenido porcentual de humedad del último y penúltimo entrenudos del tallo aumentó en el resto de genotipos en comparación con la línea 89 (Fig. 4.53), y el porcentaje de humedad del penúltimo entrenudo del tallo fue mayor en la línea 76 que en la línea 8 (Fig. 4.53b).

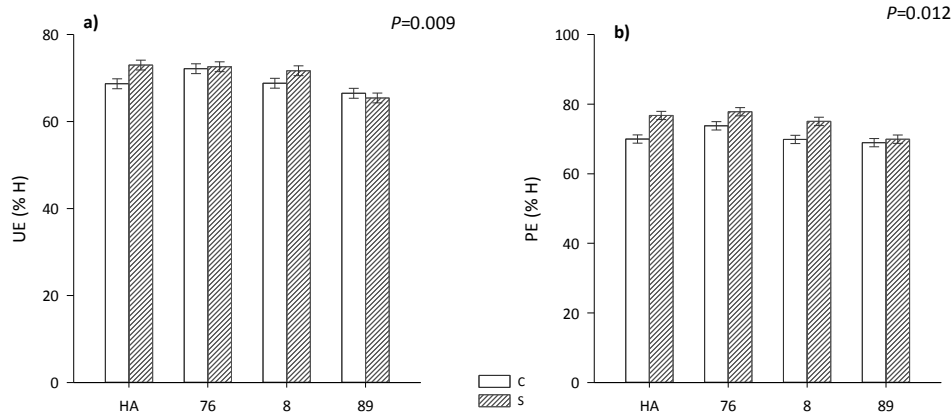


Figura 4.53. Contenido porcentual de humedad en el estadio de grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.). **a)** Último entrenudo del tallo (UE) y **b)** penúltimo entrenudo del tallo (PE) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

4.2.5.1.5.- Peso seco de las partes del tallo principal.

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, el peso seco de las hojas, último y penúltimo entrenudos del tallo, resto y total del tallo y tallo principal en un 22.41%, 13.92%, 18.42%, 21.22%, 19.1% y 12.71%, respectivamente, y aumentó el del resto de hojas en un 9.45% (Tabla 4.56). El peso seco de las hojas fue mayor en Harrington y las otras líneas RCSL que en la línea 76 (Tabla 4.56). El peso de la espiga y del resto de hojas aumentó en la línea 89 en comparación con el resto de genotipos y en el cv. Harrington con respecto a la línea 76 (Tabla 4.56). El peso seco del tallo principal, de cada una de las fracciones del tallo y del total de la fracción tallo fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, y mayor en Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Tabla 4.56).

Tabla 4.56. Peso seco (g) de las diferentes partes del tallo principal en el inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	E	Hojas	RH	UE	PE	RT	TT	TP
Tratamientos								
Control	0.451	0.058a	0.316a	0.237a	0.228a	0.754a	1.220a	2.045a
Sequía	0.407	0.045b	0.349b	0.204b	0.186b	0.594b	0.987b	1.785b
$P_{.05}$	ns	0.007	0.015	0.008	0.001	0.001	<.001	0.004
SED		0.004	0.013	0.012	0.016	0.045	0.058	0.082
Genotipos								
cv. HA	0.429a	0.062a	0.336a	0.207a	0.182a	0.551a	0.941a	1.768a
RCSL-76	0.309b	0.029b	0.288b	0.152b	0.124b	0.395b	0.671b	1.297b
RCSL-8	0.374ab	0.057a	0.302ab	0.193a	0.167a	0.529a	0.889a	1.622a
RCSL-89	0.605c	0.058a	0.404c	0.329c	0.356c	1.221c	1.906c	2.973c
$P_{.05}$	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	0.035	0.006	0.018	0.017	0.011	0.063	0.082	0.116
Interacción								
GxT ($P_{.05}$)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

(E) espiga, (Hojas) bandera y penúltima, (RH) resto de hojas, (UE) último entrenudo del tallo, (PE) penúltimo entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo, (TT) total de la fracción tallo (suma del último y penúltimo entrenudos y resto del tallo) y (TP) tallo principal (suma de las diferentes partes). ns, sin significación estadística.

En el estadio de grano lechoso medio, el déficit hídrico no tuvo efecto en el peso seco de la espiga y del resto de hojas (Tabla 4.57), aunque condujo, en comparación con las plantas de control hídrico, a un descenso del peso seco de las hojas, resto y total del tallo y tallo principal en un 23.81%, 31.66%, 27.66% y 17.35%, respectivamente (Tabla 4.57). El peso de las hojas aumentó en el resto de genotipos en comparación con la línea 76 (Tabla 4.57). El peso de la espiga fue mayor en la línea 89 que en el cv. Harrington y las otras líneas RCSL, y el del resto de hojas aumentó en la línea 89 en comparación con la línea 76 (Tabla 4.57). El peso del resto del tallo, del total de la fracción tallo y del tallo principal aumentó en la línea 89 en comparación con Harrington y las demás líneas RCSL, y el del total de la fracción tallo y del tallo principal fue mayor en Harrington que en la línea 76, y en la línea 8 tendió a aumentar, sin llegar a alcanzar significación estadística, con respecto a la línea 76 (Tabla 4.57).

Tabla 4.57. Peso seco (g) de las diferentes partes del tallo principal en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	E	Hojas	RH	UE	PE	RT	TT	TP
Tratamientos								
Control	0.924	0.063a	0.271	0.293	0.300	0.875a	1.468a	2.726a
Sequía	0.849	0.048b	0.294	0.242	0.222	0.598b	1.062b	2.253b
$P_{.05}$	ns	0.010	ns	<.001	<.001	<.001	<.001	0.002
SED		0.006		0.008	0.009	0.072	0.083	0.137
Genotipos								
cv. HA	0.875a	0.065a	0.281ab	0.267	0.241	0.626a	1.133a	2.354a
RCSL-76	0.720a	0.034b	0.247a	0.187	0.161	0.434a	0.781b	1.782b
RCSL-8	0.785a	0.059a	0.282ab	0.223	0.216	0.580a	1.019ab	2.144ab
RCSL-89	1.167b	0.064a	0.319b	0.395	0.425	1.307b	2.127c	3.677c
$P_{.05}$	<.001	0.002	0.010	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	0.088	0.008	0.019	0.011	0.012	0.101	0.117	0.194
Interacción								
GxT ($P_{.05}$)	ns	ns	ns	0.001	<.001	ns	ns	ns
SED				0.016	0.017			

(E) espiga, (Hojas) bandera y penúltima, (RH) resto de hojas, (UE) último entrenudo del tallo, (PE) penúltimo entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo, (TT) total de la fracción tallo (suma del último y penúltimo entrenudos y resto del tallo) y (TP) tallo principal (suma de las diferentes partes). ns, sin significación estadística.

Las interacciones significativas genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.57) mostraron que el déficit hídrico redujo el peso seco del último y penúltimo entrenudos del tallo en el cv. Harrington y la línea 89 (Fig. 4.54), y el del penúltimo entrenudo del tallo también en la línea 8 (Fig. 4.54b). El peso seco del último y penúltimo entrenudos del tallo aumentó con ambos niveles de disponibilidad hídrica en la línea 89 en comparación con los otros genotipos y en el cv. Harrington y la línea 8 con respecto a la línea 76 (Fig. 4.54). Y el peso seco del último entrenudo del tallo fue también mayor en el cv. Harrington que en la línea 8 (Fig. 4.54a).

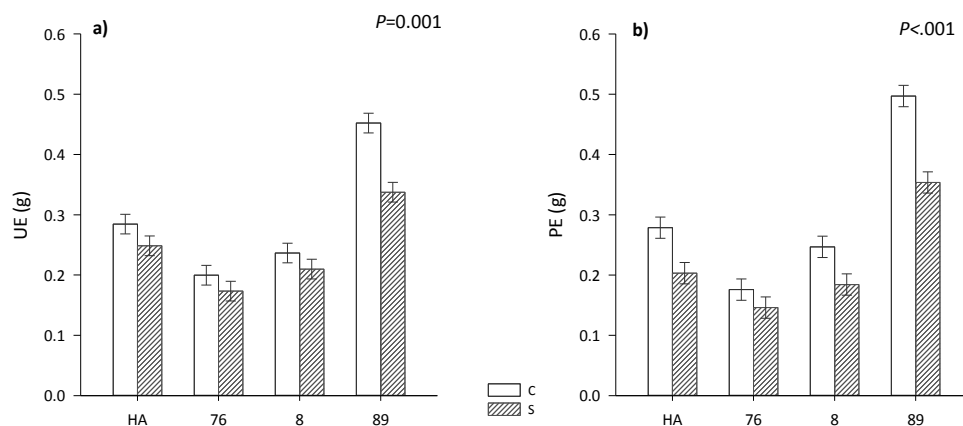


Figura 4.54. Peso seco de las partes del tallo principal en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.). **a)** Último entrenudo del tallo (UE) y **b)** penúltimo entrenudo del tallo (PE) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

En el estadio de grano lechoso tardío, el estrés hídrico no tuvo efecto significativo en el peso seco de la espiga y del resto de hojas (Tabla 4.58), al igual que en la anterior fase del desarrollo de la cebada, pero disminuyó, con respecto a las plantas control, el peso seco de las hojas, último y penúltimo entrenudos del tallo, resto y total del tallo y tallo principal en un 23.1%, 16.33%, 23.1%, 22%, 21.1% y 9.98%, respectivamente (Tabla 4.58). El peso de las hojas fue mayor en el resto de genotipos que en la línea 76, y mayor en la línea 8 que en la línea 89 (Tabla 4.58). El peso seco de la espiga aumentó en la línea 89 en comparación con Harrington y las demás líneas RCSL y en la línea 8 con respecto a la línea 76 (Tabla 4.58). El peso seco del último y penúltimo entrenudos del tallo, resto y total del tallo y tallo principal fue mayor en la línea 89 que en el cv. Harrington y las otras líneas RCSL, y mayor en Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Tabla 4.58).

Tabla 4.58. Peso seco (g) de las diferentes partes del tallo principal en el estadio de grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	E	Hojas	RH	UE	PE	RT	TT	TP
Tratamientos								
Control	1.345	0.065a	0.264	0.294a	0.299a	0.840a	1.433a	3.107a
Sequía	1.345	0.050b	0.271	0.246b	0.230b	0.655b	1.131b	2.797b
$P_{.05}$	ns	<.001	ns	0.001	<.001	0.002	<.001	0.024
SED				0.013	0.019	0.053	0.080	0.129
Genotipos								
cv. HA	1.227ab	0.068ac	0.286	0.262a	0.249a	0.624a	1.135a	2.716a
RCSL-76	1.152a	0.033b	0.245	0.193b	0.173b	0.446b	0.811b	2.241b
RCSL-8	1.332b	0.071a	0.278	0.275a	0.269a	0.763a	1.307a	2.989a
RCSL-89	1.668c	0.058c	0.260	0.350c	0.369c	1.156c	1.875c	3.862c
$P_{.05}$	<.001	<.001	ns	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	0.083	0.005		0.019	0.026	0.075	0.114	0.183
Interacción								
GxT ($P_{.05}$)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

(E) espiga, (Hojas) bandera y penúltima, (RH) resto de hojas, (UE) último entrenudo del tallo, (PE) penúltimo entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo, (TT) total de la fracción tallo (suma del último y penúltimo entrenudos y resto del tallo) y (TP) tallo principal (suma de las diferentes partes). ns, sin significación estadística.

4.2.5.1.6.- Longitud de las fracciones del tallo del tallo principal.

En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico disminuyó la longitud del último entrenudo del tallo y del total del tallo y no tuvo efecto significativo en la del penúltimo entrenudo y resto del tallo (Tabla 4.59). La longitud del total de la fracción tallo y cada una de las tres partes en las que fue fraccionado aumentó en la línea 89 en comparación con el resto de genotipos (Tabla 4.59), y la del penúltimo entrenudo y del total del tallo fue mayor en el cv. Harrington que en las líneas 76 y 8 (Tabla 4.59).

Tabla 4.59. Longitud (cm) de las fracciones del tallo del tallo principal en los estadios de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano (70 ± 1 d.d.s.), grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) y grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

d.d.s.	Tratamientos				Genotipos				GxT			
	C	S	<i>P</i> _{.05}	SED	HA	76	8	89	<i>P</i> _{.05}	SED	<i>P</i> _{.05}	SED
70 ± 1	UE	19.18a	16.86b	0.016	0.895	17.71a	16.68a	16.51a	21.18b	0.004	1.266	ns
	PE	13.38	12.79	ns		12.57a	11.19b	11.44b	17.14c	<.001	0.541	ns
	RT	31.82	30.94	ns		28.55a	25.21a	26.40a	45.36b	<.001	1.776	ns
	TT	64.38a	60.59b	0.004	1.196	58.84a	53.08b	54.35b	83.67c	<.001	1.691	ns
80 ± 2	UE	19.67a	17.74b	0.018	0.762	19.25a	18.48a	16.90b	20.19a	0.036	1.078	ns
	PE	13.52	12.48	<.001	0.254	12.85	11.61	11.51	16.04	<.001	0.359	0.009 0.508
	RT	31.78a	28.44b	0.035	1.490	28.65a	22.56b	28.65a	40.58c	<.001	2.107	ns
	TT	64.97a	58.66b	<.001	1.168	60.75a	52.65b	57.06c	76.80d	<.001	1.652	ns
91 ± 3	UE	19.85a	17.81b	0.003	0.624	18.38a	17.93a	17.49a	21.53b	<.001	0.882	ns
	PE	13.11	12.57	ns		12.39a	11.65a	11.76a	15.55b	<.001	0.678	ns
	RT	29.95	28.70	ns		27.77	21.21	28.11	40.20	<.001	1.427	0.036 2.018
	TT	62.91a	59.08b	0.030	1.658	58.54a	50.79b	57.36a	77.28c	<.001	2.345	ns

(UE) último entrenudo del tallo, (PE) penúltimo entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo y (TT) total de la fracción tallo (suma de la longitud del último y penúltimo entrenudos y resto del tallo). d.d.s. días después de la siembra. ns, sin significación estadística.



Figura 4.55. Genotipos de cebada a los 76 d.d.s. de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. Harrington) con déficit hídrico (S) izquierda o amplia disponibilidad hídrica (C) derecha, cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Cada maceta contiene 6 plantas.

En el estadio de grano lechoso medio, el estrés hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, la longitud del último entrenudo, resto del tallo y del total del tallo (Tabla 4.59). La longitud del último entrenudo del tallo fue mayor en el resto de genotipos que en la línea 8 (Tabla 4.59). La longitud del resto y del total del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con los otros genotipos, y en el cv. Harrington y la línea 8 con respecto a la línea 76, y la longitud del total del tallo fue mayor en Harrington que en la línea 8 (Tabla 4.59).

La interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.59) mostró que la limitación de la disponibilidad hídrica condujo a una reducción de la longitud del penúltimo entrenudo del tallo en Harrington y la línea 89 (Fig. 4.56). En condiciones de amplia disponibilidad hídrica, la longitud del penúltimo entrenudo del tallo fue mayor en la línea 89 que en Harrington y las otras líneas RCSL, y mayor a su vez en el cv. Harrington que en las líneas 8 y 76 (Fig. 4.56). En condiciones de escasa disponibilidad hídrica, la longitud del penúltimo entrenudo del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con los otros genotipos y en el cv. Harrington tendió a aumentar, sin llegar a alcanzar significación estadística, con respecto a la línea 8 (Fig. 4.56).

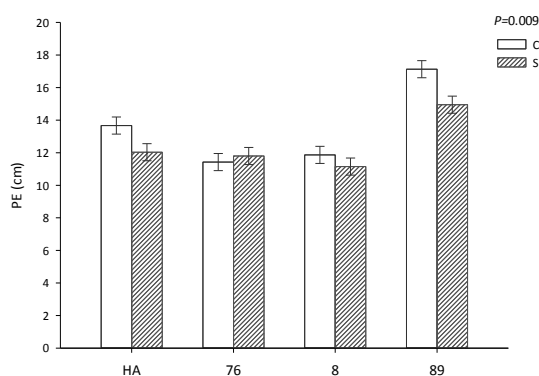


Figura 4.56. Longitud del penúltimo entrenudo del tallo (PE) en el estadio de grano lechoso medio (80 ± 2 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

En el estadio de grano lechoso tardío, el déficit hídrico disminuyó la longitud del último entrenudo y del total del tallo, y no tuvo efecto en la longitud del penúltimo entrenudo del tallo (Tabla 4.59). Entre genotipos, la longitud del último y penúltimo entrenudos del tallo y del total del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con Harrington y las líneas 8 y 76, y la longitud del total del tallo fue mayor en Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Tabla 4.59).

El análisis de la varianza de la longitud del resto del tallo alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.59), mostrando que la sequía disminuyó la longitud del resto del tallo en el cv. Harrington y tendió a disminuir, sin llegar a alcanzar significación estadística, dicha fracción del tallo en la línea 8 (Fig. 4.57). En plantas de control hídrico, la longitud del resto del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con en el resto de genotipos y en el cv. Harrington y la línea 8 en comparación con la línea 76 (Fig. 4.57). En plantas de déficit hídrico, la longitud del resto de tallo fue mayor en la línea 89 que en Harrington y las otras líneas RCSL, y mayor en la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.57).

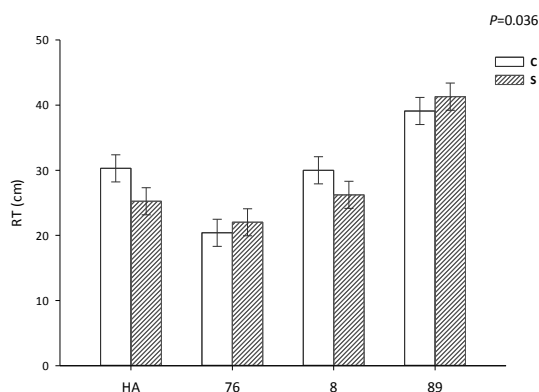


Figura 4.57. Longitud del resto del tallo (RT) en el estadio de grano lechoso tardío (91 ± 3 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

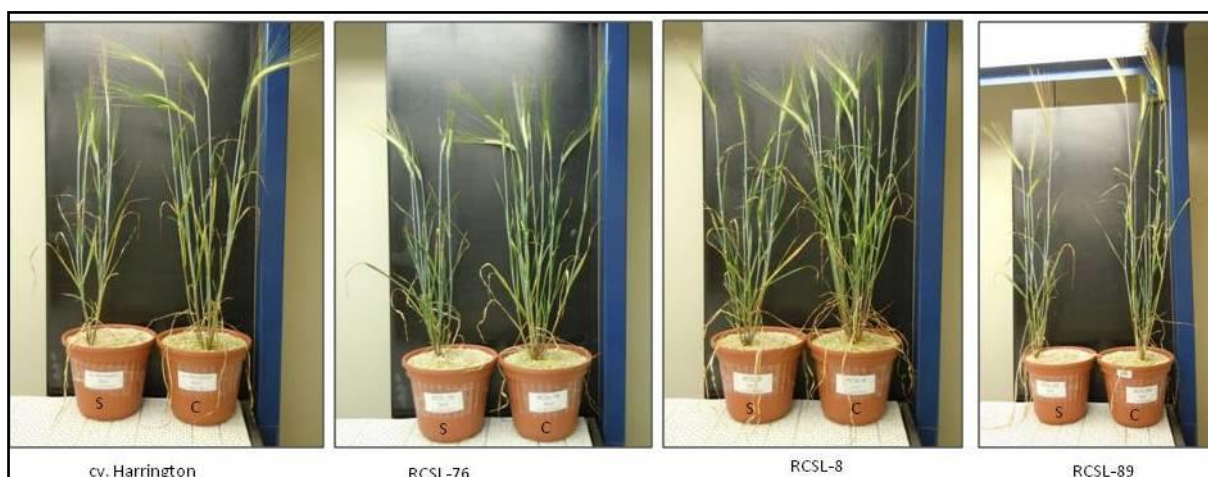


Figura 4.58. Genotipos de cebada a los 96 d.d.s. de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. Harrington) con déficit hídrico (S) izquierda o amplia disponibilidad hídrica (C) derecha, cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Cada maceta contiene 1 planta.

4.2.5.2.- Parámetros de crecimiento de las plantas de cebada en la madurez.

En la madurez de las plantas, se contaron el número de tallos hijos y de espigas por planta, se separó el tallo principal del resto de la planta y se fraccionó en las mismas partes que en las anteriores etapas del desarrollo de las plantas.

4.2.5.2.1.- Peso seco de las partes del tallo principal.

En la madurez, el déficit hídrico no tuvo efecto en el peso seco de las hojas, bandera y penúltima, de las plantas de cebada y condujo, en comparación con las plantas de control hídrico, a un descenso del peso seco del resto del tallo y tallo principal en un 15% y 12.7%, respectivamente (Tabla 4.60), junto a un aumento del peso del resto de las hojas, que se estimó en un 19.4% (Tabla 4.60). El peso

del resto del tallo y del tallo principal aumentó en la línea 89 en comparación con los otros genotipos, y en el cv. Harrington y la línea 8 con respecto a la línea 76 (Tabla 4.60). No se observaron diferencias significativas entre genotipos en el peso de las hojas (Tabla 4.60).

Tabla 4.60. Peso seco (g) de las diferentes partes del tallo principal en la madurez (161 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (cv. HA) con déficit hídrico (sequía) o amplia disponibilidad hídrica (control), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	E	Hojas	RH	UE	PE	RT	TT	TP
Tratamientos								
Control	1.771	0.076	0.237a	0.267	0.233	0.587a	1.087	3.171a
Sequía	1.560	0.042	0.294b	0.200	0.174	0.499b	0.873	2.768b
$P_{.05}$	<.001	ns	0.027	<.001	<.001	0.004	<.001	<.001
SED	0.039		0.024	0.008	0.009	0.028	0.033	0.082
Genotipos								
cv. HA	1.654	0.055	0.264	0.215	0.176	0.452a	0.844	2.871a
RCSL-76	1.457	0.028	0.285	0.169	0.136	0.371b	0.676	2.446b
RCSL-8	1.597	0.061	0.242	0.224	0.180	0.473a	0.876	2.776a
RCSL-89	1.952	0.093	0.271	0.327	0.321	0.876c	1.524	3.841c
$P_{.05}$	<.001	ns	ns	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
SED	0.055			0.011	0.012	0.040	0.046	0.116
Interacción								
GxT ($P_{.05}$)	0.025	ns	ns	0.002	0.002	ns	0.003	ns
SED	0.077			0.016	0.017		0.066	

(E) espiga, (Hojas) bandera y penúltima, (RH) resto de hojas, (UE) último entrenudo del tallo, (PE) penúltimo entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo, (TT) total de la fracción tallo (suma del último y penúltimo entrenudos y resto del tallo) y (TP) tallo principal (suma de las diferentes partes). ns, sin significación estadística.

Los análisis de la varianza del peso de la espiga, último y penúltimo entrenudos del tallo y total del tallo mostraron significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.60), que pusieron de manifiesto que el estrés hídrico redujo el peso seco de la espiga en todos los genotipos de cebada, exceptuando la línea 89 (Fig. 4.59a), y el del último y penúltimo entrenudos del tallo y del total del tallo en Harrington y las líneas 8 y 89 (Fig. 4.59bcd). En plantas de control hídrico, el peso seco de la espiga, del último y penúltimo entrenudos del tallo y del total del tallo aumentó en el resto de genotipos en comparación con la línea 76 (Fig. 4.59), el del último y penúltimo entrenudos del tallo y total del tallo fue mayor en la línea 89 que en el cv. Harrington y la línea 8 (Fig. 4.59bcd), y el de la espiga fue mayor en la línea 89 que en la línea 8, y fue similar al del cv. Harrington (Fig. 4.59a). En plantas de déficit hídrico, el peso seco de la espiga, último y penúltimo entrenudos del tallo y total del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con el resto de genotipos, y el del último entrenudo del tallo fue mayor en el cv. Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.59).

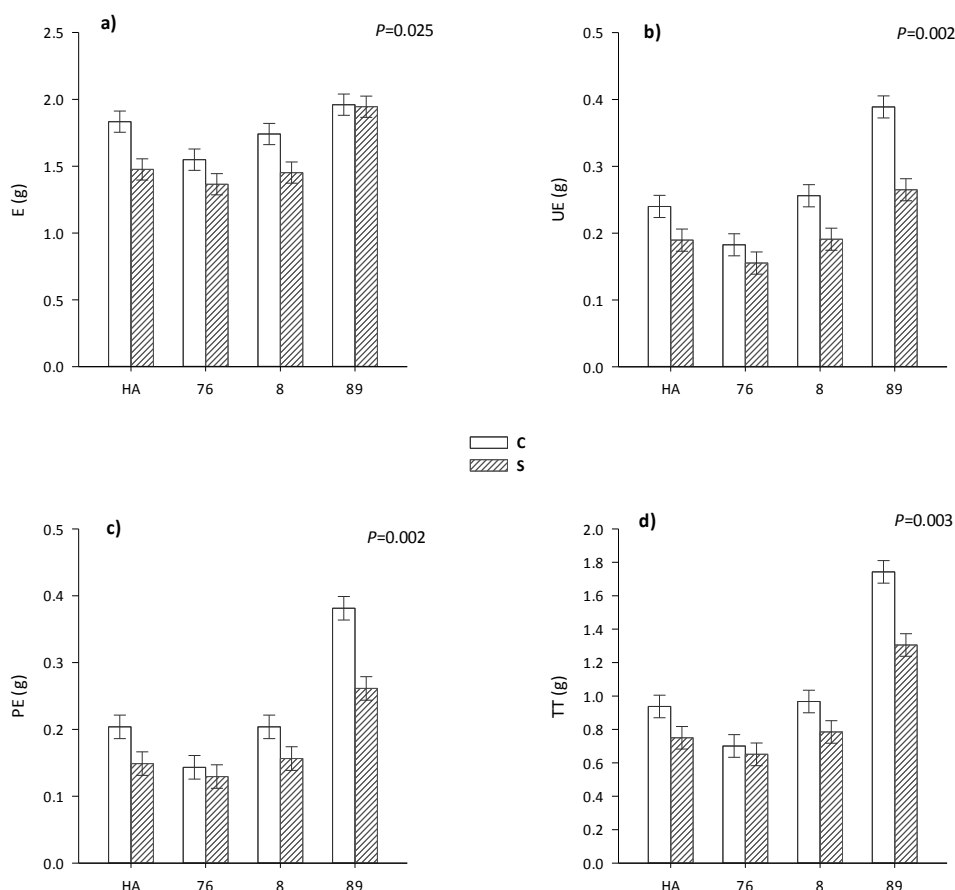


Figura 4.59. Peso seco de las partes del tallo principal en la madurez (161 ± 1 d.d.s.). **a)** Espiga (E), **b)** último entrenudo del tallo (UE), **c)** penúltimo entrenudo del tallo (PE) y **d)** total de la fracción tallo (TT) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Isd.

4.2.5.2.2.- Longitud de las fracciones del tallo del tallo principal.

El déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, la longitud del total del tallo en un 8.79% y no tuvo efecto en la longitud del resto del tallo (Tabla 4.61). La longitud del resto y del total del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con los otros genotipos, y en el cv. Harrington y la línea 8 con respecto a la línea 76 (Tabla 4.61).

Tabla 4.61. Longitud (cm) de las fracciones del tallo del tallo principal en la madurez (161 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	Tratamientos		<i>P</i> . ₀₅	SED	Genotipos				<i>P</i> . ₀₅	SED	GxT	
	C	S			HA	76	8	89			<i>P</i> . ₀₅	SED
UE	20.91	17.16	<.001	0.504	18.89	18.21	17.76	21.27	<.001	0.713	0.045	1.001
PE	14.02	12.63	<.001	0.343	12.91	11.32	12.35	16.71	<.001	0.485	0.022	0.686
RT	30.23	29.63	ns		28.06a	24.12b	28.35a	39.19c	<.001	1.666	ns	
TT	65.16a	59.43b	<.001	1.149	59.86a	53.66b	58.46a	77.17c	<.001	1.625	ns	

(UE) último entrenudo del tallo, (PE) penúltimo entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo y (TT) total de la fracción tallo (suma de la longitud del último y penúltimo entrenudos y resto del tallo). ns, sin significación estadística.

Las interacciones significativas genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.61) mostraron que la escasez en la disponibilidad hídrica redujo la longitud del último y penúltimo entrenudos del tallo en la línea 89 y Harrington (Fig. 4.60), y la del último entrenudo del tallo en la línea 8 (Fig. 4.60a). En

plantas de control hídrico, la longitud del último y penúltimo entrenudos del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con las otras líneas RCSL y Harrington (Fig. 4.60), y la del penúltimo entrenudo fue mayor en el cv. Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.60b). En plantas de déficit hídrico, la longitud del último entrenudo del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con la línea 8, y fue similar a la de Harrington y la línea 76 (Fig. 4.60a). La longitud del penúltimo entrenudo del tallo fue mayor en la línea 89 que en el cv. Harrington y las otras líneas RCSL (Fig. 4.60b).

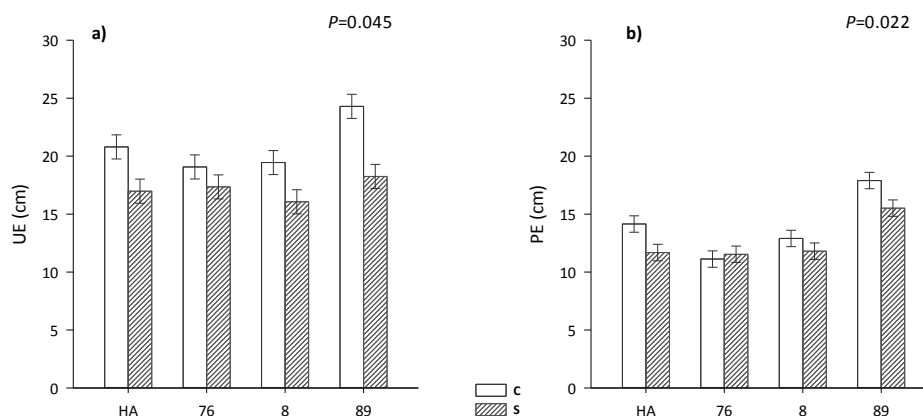


Figura 4.60. Longitud de las fracciones del tallo del tallo principal en la madurez (161 ± 1 d.d.s.). **a)** Último entrenudo del tallo (UE) y **b)** penúltimo entrenudo del tallo (PE) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

4.2.5.2.3.- Peso específico de las fracciones del tallo del tallo principal.

El déficit hídrico disminuyó el peso específico del último entrenudo del tallo (Tabla 4.62). El peso específico del último entrenudo del tallo fue mayor en la línea 89 que en el resto de genotipos, mayor en el cv. Harrington y la línea 8 que en la línea 76, y mayor a su vez en la línea 8 que en Harrington (Tabla 4.62).

Tabla 4.62. Peso específico ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-1}$) de las fracciones del tallo del tallo principal en la madurez (160 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	Tratamientos		<i>P</i> .05	SED	Genotipos				<i>P</i> .05	SED	GxT	
	C	S			HA	76	8	89			<i>P</i> .05	SED
UE	12.57 a	11.66 b	<.001	0.237	11.40 a	9.27 b	12.53 c	15.26 d	<.001	0.335	ns	
PE	16.10	13.50	<.010	0.336	13.57	12.06	14.52	19.05	<.001	0.475	0.024	0.671
RT	18.87	16.49	<.001	0.595	16.07	15.38	16.63	22.64	<.001	0.842	0.001	1.191
TT	16.21	14.41	<.001	0.340	14.06	12.59	14.94	19.67	<.001	0.481	0.002	0.680

(UE) último entrenudo del tallo, (PE) penúltimo entrenudo del tallo, (RT) resto del tallo y (TT) total de la fracción tallo (suma de la longitud del último y penúltimo entrenudos y resto del tallo). ns, sin significación estadística.

Las interacciones significativas genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.62) mostraron que el estrés hídrico condujo a un descenso del peso específico del penúltimo entrenudo del tallo en todos los genotipos de cebada (Fig. 4.61a), del peso específico del resto del tallo en la línea 89 (Fig. 4.61b), y del total del tallo en las líneas 8 y 89 (Fig. 4.61c). En plantas de control hídrico, el peso específico del penúltimo entrenudo y resto del tallo y del total del tallo aumentó en la línea 89 en comparación

con los otros genotipos, y en Harrington y la línea 8 con respecto a la línea 76 (Fig. 4.61), a excepción del peso específico del resto del tallo que fue similar al del cv. Harrington (Fig. 4.61b). En plantas de déficit hídrico, el peso específico del penúltimo entrenudo y del resto del tallo y del total del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con los otros genotipos (Fig. 4.61), el del penúltimo entrenudo del tallo fue mayor en Harrington y la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.61a) y el del total del tallo fue mayor en la línea 8 que en la línea 76 (Fig. 4.61c).

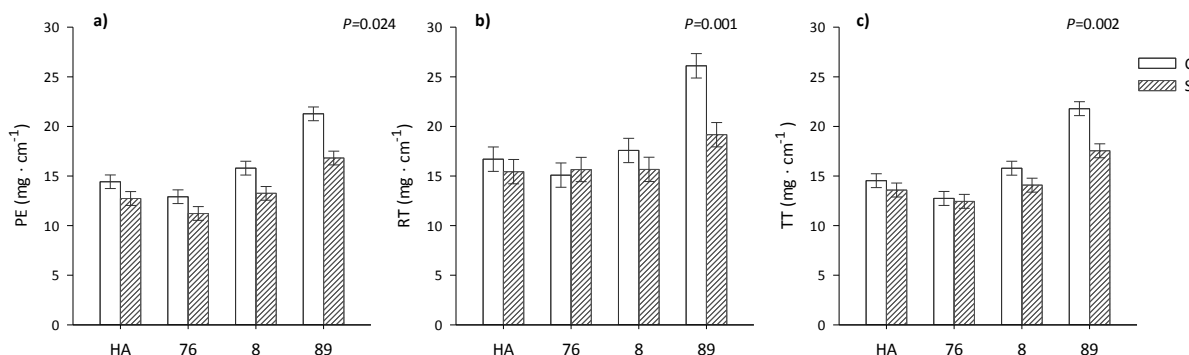


Figura 4.61. Peso específico del **a)** penúltimo entrenudo del tallo (PE), **b)** resto del tallo (RT) y **c)** total de la fracción tallo (TT) en la madurez (161 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

4.2.5.2.4.- Biomasa total.

En la madurez del cultivo, el análisis de la varianza de la biomasa de las plantas alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica, mostrando que el déficit hídrico condujo, en comparación con las plantas control, a un descenso de la biomasa en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, que se estimó en un 42.14%, 53.72%, 45.60% y 43.68%, respectivamente (Fig. 4.62). En condiciones de control hídrico, la acumulación de biomasa aumentó en la línea 8 en comparación con el cv. Harrington y las otras líneas RCSL, y en la línea 89 con respecto al cv. Harrington (Fig. 4.62). En condiciones de déficit hídrico, la biomasa no varió significativamente entre genotipos (Fig. 4.62).

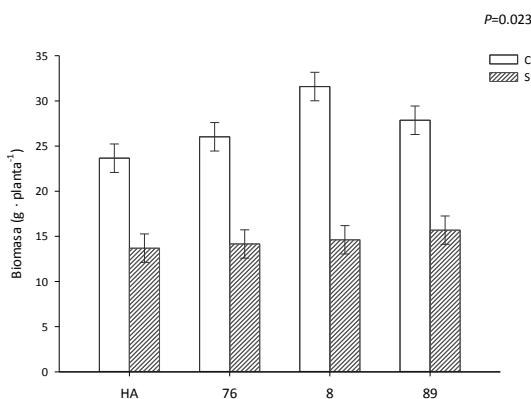


Figura 4.62. Biomasa total en la madurez (161 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

4.2.5.2.5.- Número de tallos y espigas por planta.

En la madurez, la escasez en la disponibilidad hídrica disminuyó, con respecto a las plantas control, el número de espigas por planta en un 55.93% (Tabla 4.63). El número de espigas por planta aumentó en el resto de genotipos en comparación con la línea 89 (Tabla 4.63).

Tabla 4.63. Número de tallos (NT) y número de espigas (NE) por planta y porcentaje de tallos con espigas (%E) en la madurez (161 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones ($n=4$); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	Tratamientos				Genotipos				GxT			
	C	S	<i>P</i> . ₀₅	SED	HA	76	8	89	<i>P</i> . ₀₅	SED	<i>P</i> . ₀₅	SED
NT	20.06	12.06	<.001	0.554	16.62	15.25	15.62	16.75	ns		<.001	0.784
NE	13.75a	6.06b	<.001	0.469	10.12a	11.25a	10.25a	8.00b	<.001	0.663	ns	
%E	68.8	54.1	<.001	2.80	59.0	73.0	67.7	46.3	<.001	3.96	<.001	5.60

ns, sin significación estadística.

Las interacciones significativas genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.63) pusieron de manifiesto que el déficit hídrico redujo notablemente el número de tallos por planta en todos los genotipos de cebada, más aún en las líneas 8 y 76 (Fig. 4.63a), y redujo también el porcentaje de tallos con espiga en la línea 89 y el cv. Harrington (Fig. 4.63b). En condiciones de control hídrico, el número de tallos por planta aumentó en la línea 8 en comparación con la línea 89 y el cv. Harrington, y fue similar al de la línea 76 (Fig. 4.63a). El porcentaje de tallos con espiga fue mayor en el cv. Harrington y la línea 76 que en las otras líneas RCSL (Fig. 4.63b). En condiciones de déficit hídrico, el número de tallos por planta aumentó en la línea 89 y el cv. Harrington en comparación con las líneas 8 y 76 (Fig. 4.63a). Por el contrario, el porcentaje de espigas fue mayor en las líneas 8 y 76 que en la línea 89 y Harrington (Fig. 4.63b).

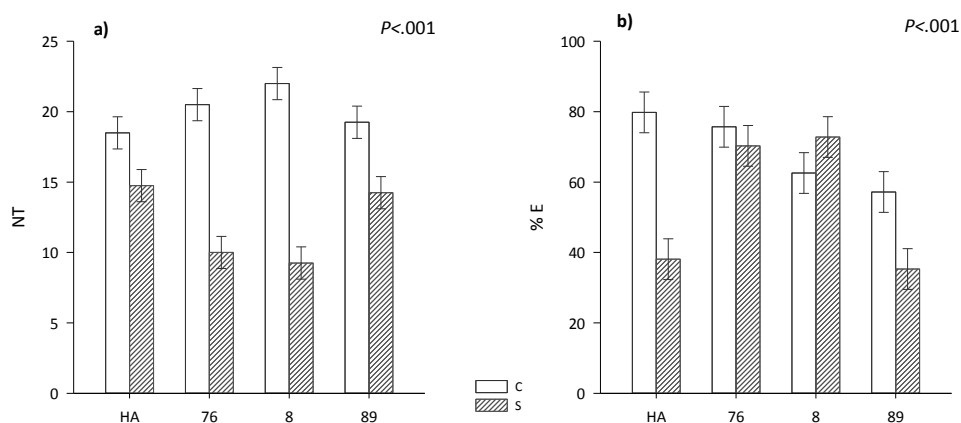


Figura 4.63. a) Número de tallos por planta (NT) y **b)** porcentaje de tallos con espigas (%E) en la madurez (161 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, lsd.

4.2.6.- Efecto del déficit hídrico en la producción de grano de los genotipos de cebada.

Como en la anterior experimentación, en la madurez de las plantas se separó la espiga del tallo principal del resto de espigas de la planta. Esto facilitó la estimación del número de granos y el peso del grano por espiga y el peso por grano tanto de la espiga del tallo principal como del resto de espigas de la planta, y la suma de ambos permitió la determinación de los parámetros indicados por planta.

4.2.6.1.- Espiga del tallo principal.

El déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, el número de granos, el peso del grano y el peso por grano de la espiga del tallo principal en un 7.41%, 13.57% y 6.55%, respectivamente (Tabla 4.64). El número de granos por espiga aumentó en la línea 8 en comparación con el resto de genotipos (Tabla 4.64). El peso del grano por espiga y el peso por grano fue mayor en la línea 89 que en los otros genotipos, y el peso por grano mayor en Harrington que en las líneas 8 y 76, y mayor a su vez en la línea 76 que en la 8 (Tabla 4.64).

Tabla 4.64. Número de granos (NG, nº granos·E⁻¹), peso del grano (PGE, g·E⁻¹) por espiga y peso por grano (PG, mg) de la espiga del tallo principal en la madurez (161 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones (n=4); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	Tratamientos		P. ₀₅	SED	Genotipos				P. ₀₅	SED	GxT
	C	S			HA	76	8	89			P. ₀₅
NG	27.00a	25.00b	0.008	0.688	24.50a	25.50a	27.75b	26.25a	0.020	0.974	ns
PGE	1.40a	1.21b	<.001	0.034	1.275a	1.232a	1.258a	1.464b	<.001	0.048	ns
PG	52.03a	48.62b	<.001	0.656	52.01a	48.24b	45.26c	55.79d	<.001	0.928	ns

ns, sin significación estadística.

4.2.6.2.- Espigas por planta.

El déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, el peso del grano por planta en un 56.07% y no tuvo efecto en el peso por grano (Tabla 4.65). El peso del grano por planta fue mayor en las líneas 8 y 76 que en la línea 89 y el cv. Harrington (Tabla 4.65). El peso por grano aumentó en la línea 89 en comparación con los otros genotipos, y en la línea 76 en comparación con la línea 8 y fue similar al del cv. Harrington (Tabla 4.65).

Tabla 4.65. Número de granos (NG, nº granos·P⁻¹), peso del grano (PGE, g·P⁻¹) por planta y peso por grano (PG, mg) de las espigas en la madurez (161 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Los efectos significativos se muestran en negrita. Los valores son medias de cuatro repeticiones (n=4); SED, error estándar de la diferencia. Valores con la misma letra carecen de significación estadística.

	Tratamientos		P. ₀₅	SED	Genotipos				P. ₀₅	SED	GxT	
	C	S			HA	76	8	89			P. ₀₅	SED
NG	274.1	120.4	<.001	8.15	188.8	221.9	221.8	156.6	<.001	11.52	0.048	16.29
PGP	11.94a	5.32b	<.001	0.29	7.88a	9.74b	9.04b	7.87a	<.001	0.415	ns	
PG	44.19	44.57	ns		42.62ab	43.94a	40.74b	50.21c	<.001	1.172	ns	

ns, sin significación estadística.

La interacción significativa genotipo x disponibilidad hídrica (Tabla 4.65) mostró que el déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas control, el número de granos por planta en el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (59.14%, 55.54%, 56.28% y 52.77%) (Fig. 4.64). En plantas de control hídrico, el número de granos por planta fue mayor en las otras líneas RCSL y el cv. Harrington que en la línea 89, y mayor a su vez en las líneas 8 y 76 que en Harrington (Fig. 4.64). En plantas de déficit hídrico, el número de granos por planta aumentó en las líneas 76 y 8 en comparación con la línea 89 y fue similar al del cv. Harrington (Fig. 4.64).

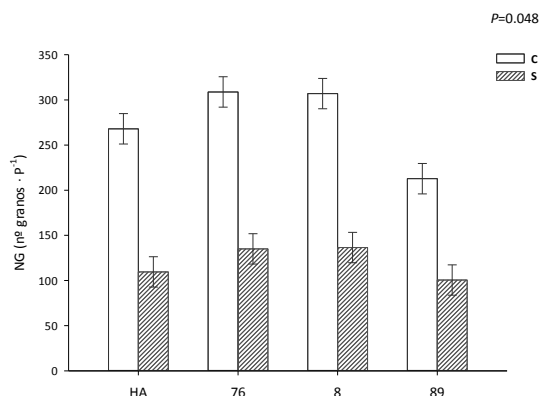


Figura 4.64. Número de granos (NG) por planta en la madurez (161 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd.

4.2.6.3.- Índice de Cosecha (IC).

El análisis de la varianza del índice de cosecha alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica, y puso de manifiesto que el déficit hídrico redujo el índice de cosecha en la línea 76 y el cv. Harrington y no tuvo efecto en las otras líneas RCSL (Fig. 4.65). En condiciones de control hídrico, el índice de cosecha fue mayor en la línea 76 que en los otros genotipos, mayor en el cv. Harrington que en las otras líneas RCSL, y mayor a su vez en la línea 8 que en la línea 89 (Fig. 4.65). En condiciones de déficit hídrico, el índice de cosecha aumentó en la línea 76 con respecto al resto de genotipos, y en el cv Harrington y la línea 8 en comparación con la línea 89 (Fig. 4.65).

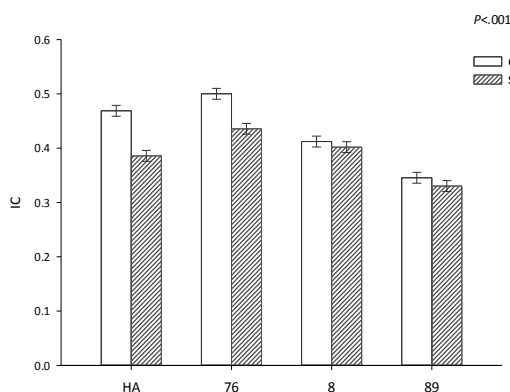


Figura 4.65. Índice de cosecha (IC) en la madurez (161 ± 1 d.d.s.) de plantas de cebada de las líneas RCSL 76, 8 y 89, y del cultivar Harrington controlado. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa, Lsd. (HA) con déficit hídrico (S) o amplia disponibilidad hídrica (C), cultivadas en una cámara de crecimiento con ambiente

5.- Discusión

5.1.- EXPERIMENTO 1.

5.1.1.- El déficit hídrico moderado afecta a la asimilación fotosintética del CO₂ en la post-antes de la cebada.

Las plantas perciben y responden rápidamente a alteraciones en el estado hídrico induciendo una serie de cambios fisiológicos, celulares y moleculares que se desarrollan en paralelo y modulan según la intensidad, duración y velocidad de evolución de la limitación hídrica impuesta (Chaves *et al.*, 2009). La fotosíntesis es uno de los procesos claves afectados por el déficit hídrico, vía limitaciones en la difusión del CO₂ al cloroplasto y/o restricciones metabólicas, cuyo impacto relativo varía con la intensidad del estrés y la especie vegetal (Pinheiro and Chaves, 2011).

En este primer experimento se impuso un déficit hídrico moderado a las plantas de cebada que indujo, en todos los genotipos, un acusado descenso de la asimilación fotosintética del CO₂ (con luz saturante y concentración de CO₂ de crecimiento, 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), tanto en el estadio de desarrollo correspondiente al inicio del desarrollo del grano como en el de grano lechoso tardío (Fig. 4.1a, Fig. 4.3a). Además, la fotosíntesis de la penúltima hoja de las plantas de cebada fue menor en el estadio de grano lechoso tardío que en el inicio del desarrollo del grano, con ambos niveles de disponibilidad hídrica e independientemente del nivel de CO₂ de medida, lo que sugiere que en estadios avanzados del desarrollo foliar tuvo lugar un descenso de la asimilación del carbono. Una disminución de la fotosíntesis con el progreso el desarrollo de las plantas se ha encontrado en trigo (Gutiérrez *et al.*, 2009) como consecuencia de la senescencia foliar. El descenso de fotosíntesis inducido por la sequía se acompañó de una notable disminución de la conductancia de los estomas que fue mayor que las apreciadas en la A y en el contenido de clorofilas, que se ha asociado con la actividad fotosintética en la cebada (González *et al.*, 2010) y fue también disminuido con el déficit hídrico en el inicio del desarrollo del grano y en el estadio de grano lechoso tardío, un 10% y 15.8%, respectivamente (Tabla 4.12). Se ha indicado que la primera de las respuestas de las plantas al estrés hídrico es el descenso de la conductancia de los estomas (Sharkey, 1990; Chaves, 1991; Cornic, 2000) como consecuencia de su cierre. Dicha respuesta parece ser mediada por el ácido abscísico (ABA) sintetizado en las raíces, que es transportado a las hojas y al alcanzar las células oclusivas de los estomas modifica su apertura. Esto disminuye la pérdida de agua y ralentiza la deshidratación (Chaves and Oliveira, 2004; Wilkinson and Davies, 2010), y ejerce también un efecto similar, limitando el desarrollo foliar (Van Volkenburgh and Davies, 1983) y manteniendo el desarrollo radicular (Sharp *et al.*, 1994).

El efecto del estrés hídrico en los parámetros de intercambio gaseoso varió entre genotipos en función de la superficie verde de las hojas bandera y penúltima, que fue mayor en la línea 8 y el cv. Harrington que en las líneas 76 y 89 (Tabla 4.14). La disminución de la g_s inducida por la sequía fue más acusada en los genotipos con mayor superficie verde foliar, especialmente en la línea 8, probablemente porque consumieron antes el agua en el medio de la raíz. El cierre de los estomas con el estrés hídrico limita la pérdida de agua por transpiración y permite mantener la turgencia celular (Souza *et al.*, 2004; Hamidou *et al.*, 2007). En consonancia con dicha apreciación, el déficit hídrico condujo, en comparación con las plantas control, a un aumento del porcentaje de humedad de las hojas en el estadio de desarrollo correspondiente al inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.15), que podría derivarse de una mayor capacidad de ajuste osmótico (Hamidou *et al.*, 2007).

Con 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO₂ en la medida, el déficit hídrico redujo en el inicio del desarrollo del grano la concentración de CO₂ en los espacios intercelulares en todos los genotipos, a excepción de

la línea 89 (Fig. 4.1c), mientras que en el estadio de grano lechoso tardío sólo disminuyó la C_i en la línea 76 y el cv. Harrington (Fig. 4.3c). Se ha sugerido que la apertura no uniforme de los estomas en estrés hídrico conduce a una estimación errónea del CO_2 intercelular (Farquhar *et al.*, 1987) y sobreestima la concentración interna de CO_2 (Terashima, 1992), lo que podría enmascarar cualquier efecto estomático en la reducción de la asimilación del CO_2 (Cornic, 2000). Para poder distinguir entre los efectos estomáticos y no estomáticos de la sequía sobre la fotosíntesis, se realizaron medidas con concentraciones altas de CO_2 , $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, que pueden aumentar la concentración de este gas en los espacios intercelulares aunque los estomas estén cerrados. Se sabe que la exposición de los estomas (en aislados de epidermis, discos foliares, hojas separadas de la planta o la planta entera) a concentraciones elevadas de CO_2 generalmente disminuye su apertura (Morison, 1987; Mansfield *et al.*, 1990), aunque esta no es una respuesta universal (Morison, 1998), ya que se han mostrado incrementos de la g_s con $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 e incluso a concentraciones superiores (Wheeler *et al.*, 1999) y también variaciones a lo largo del desarrollo. La variabilidad en la respuesta de la g_s al CO_2 parece depender de la especie vegetal y de las condiciones de crecimiento (Bunce, 2004). En nuestro experimento, con concentraciones altas de CO_2 en la medida, la g_s en plantas de control hídrico fue ligeramente menor que la encontrada a concentraciones ambientales de CO_2 , en todos los genotipos y en ambos estadios de desarrollo, y el descenso de la g_s inducido por la sequía, con respecto a las plantas control, fue mayor. Este resultado es coherente con la apreciación de que la sensibilidad del estoma al CO_2 es muy dependiente del estado hídrico de la planta (Vavasseur and Raghavendra, 2005). La concentración intercelular de CO_2 en la hoja de todos los genotipos de cebada aumentó al elevar la concentración de CO_2 en la medida (Fig. 4.2c, Fig. 4.4c), pero el porcentaje de pérdida respecto a las plantas control inducido por el estrés hídrico fue mayor que cuando la medida se realizó a la concentración de CO_2 de crecimiento (Fig. 4.1c, Fig. 4.3c). Más aún, con $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 se atenuó la disminución de la fotosíntesis inducida por el déficit hídrico en aquellos genotipos en los que el efecto de la sequía fue más acusado con $390 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 en la medida. El agotamiento relativamente mayor del CO_2 intercelular, acompañado de menor disminución de la fotosíntesis por el déficit hídrico, sugieren que la restricción de la difusión del CO_2 pudo ser la causa principal de la limitación de la asimilación de CO_2 con la sequía de larga duración, con independencia de cualquier trastorno metabólico (Flexas and Medrano, 2002), en consonancia con otros estudios (Cornic, 1994; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 1999; Cornic, 2000; Chaves *et al.*, 2004). Esta disminución de la difusión del CO_2 es resultado del cierre de los estomas y, posiblemente, de una reducción de la conductancia del mesófilo (Cornic, 2000; Chaves and Oliveira, 2004; Flexas *et al.*, 2004; Grassi and Magnani, 2005).

Los genotipos de cebada tuvieron una influencia significativa en los parámetros de intercambio gaseoso según la disponibilidad hídrica, ya que en plantas de control hídrico, la fotosíntesis aumentó en el cv. Harrington y en las líneas 89 y 8 en comparación con la línea 76, con ambos niveles de CO_2 en la medida y en los dos estadios de desarrollo investigados. En el inicio del desarrollo del grano, el contenido hídrico relativo foliar, que es el parámetro más comúnmente empleado para la estimación del estado hídrico de la planta (Teulat *et al.*, 2001), fue menor en las líneas 76 y 8 que en el cv. Harrington y la línea 89, siendo significativa la diferencia de la primera con las dos últimas y de la línea 8 con la última (Fig. 4.14). Estas diferencias posiblemente se mantuvieron en el estadio de grano lechoso tardío, con el progreso del desarrollo de la planta y la evolución del estrés hídrico, lo que sugiere que las líneas 76 y 8 podrían mostrar una mayor sensibilidad a cualquier alteración en el estado hídrico. Y se ha indicado que la fijación fotosintética del CO_2 disminuye cuando desciende el contenido hídrico relativo foliar (Lawlor and Cornic, 2002). Por su parte, el mayor contenido hídrico relativo foliar del cv. Harrington en condiciones de control hídrico fue acompañado en ambos

estadios de desarrollo de mayor g_s que las líneas RCSL, lo que facilitó una mayor transpiración, difusión del CO_2 desde la atmósfera, C_i , y como se ha indicado, fotosíntesis (Fig. 4.1). En las plantas de control de la línea 89, aunque el contenido hídrico relativo fue comparativamente alto, la g_s fue menor que en los demás genotipos, y la menor apertura estomática redujo la transpiración y la C_i (Fig. 4.1). Pero con respecto al cv. Harrington y la línea 8, la fotosíntesis de la línea 89 no disminuyó en el inicio del desarrollo del grano (Fig. 4.1a), aunque sí lo hizo en el estadio de grano lechoso tardío (Fig. 4.3a), independientemente del nivel de CO_2 utilizado en la medida. La línea 89 fue uno de los genotipos con mayor biomasa, altura y velocidad de desarrollo. Sin embargo, su consumo de agua por planta a lo largo del experimento, en comparación con los demás genotipos, disminuyó en condiciones de control hídrico, mientras que fue similar en condiciones de déficit hídrico. Estas características podrían relacionarse con el cierre de estomas y la menor transpiración en la línea 89 en condiciones de control hídrico, que evitarían la pérdida de agua (Hamidou *et al.*, 2007). Más aún, en el inicio del desarrollo del grano la A y la g_s aumentaron en la línea 89 en comparación con los demás genotipos en condiciones de déficit hídrico (Fig. 4.1a, Fig. 4.1b). La capacidad de ajuste osmótico puede favorecer la fotosíntesis en condiciones de déficit hídrico (Shangguan *et al.*, 1999). En plantas de trigo que acumulan mayores contenidos de carbohidratos, se ha observado que el estado hídrico mejora y la capacidad de osmoregulación es mayor (Nayyar and Walia, 2004). En líneas de cebada con gran capacidad de acumulación de solutos, ello facilita el mantenimiento de la turgencia celular y las funciones metabólicas a bajos niveles de hidratación, atenúa los efectos del déficit hídrico en la apertura de los estomas y mantiene la fotosíntesis (Hamidou *et al.*, 2007; González *et al.*, 2008). Ciertos metabolitos pueden estar involucrados en la protección del fotosistema II contra alteraciones durante el estrés hídrico y ayudarían al mantenimiento de la integridad del PSII (Lu and Zhang, 1999). En relación con dichas apreciaciones, es de interés señalar que la acumulación de carbohidratos solubles foliares en la línea 89 fue mayor que en los demás genotipos y el contenido hídrico relativo foliar aumentó con respecto al de las otras líneas RCSL aunque no varió en comparación con el cv. Harrington. La línea 89 mostró además una mayor masa específica foliar (0.763, 0.774, 0.736 y 0.926 $g \cdot cm^{-2}$ en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente, $P < 0.001$, lsd 0.0791), lo que sugiere que la acumulación de solutos prevendría de una disminución del potencial hídrico foliar, evitaría un daño metabólico (Souza *et al.*, 2004), y facilitaría el mantenimiento de la actividad fotosintética en déficit hídrico.

En condiciones de estrés hídrico, la línea 8 mostró la menor g_s y E de todos los genotipos de cebada cuando la medida se realizó a la concentración de CO_2 de crecimiento, tanto en el inicio del desarrollo del grano como en el estadio de grano lechoso tardío (Fig. 4.1bd, Fig. 4.3bd). Su fotosíntesis fue menor que en la línea 89 y tendió a serlo con respecto al cv. Harrington y la línea 76 en el inicio del desarrollo del grano (Fig. 4.1a), mientras que disminuyó en comparación con el cv. Harrington y la línea 89 en el estadio de grano lechoso tardío (Fig. 4.3a). Se ha descrito anteriormente que la línea 8 mostró una mayor superficie verde de las hojas bandera y penúltima y el contenido hídrico relativo fue menor que el de la línea 89 y tendió a ser menor con respecto al cv. Harrington. Además, fue el genotipo en el que los descensos inducidos por la sequía en la A , g_s , C_i y E fueron más acusados, independientemente de la concentración de CO_2 en la medida. Todo lo anterior indica que cualquier alteración en el estado hídrico al poseer mayor superficie foliar facilita que se intensifiquen los efectos en los parámetros de intercambio gaseoso. El descenso observado en la g_s sugiere que el cierre de estomas limitó la transpiración y redujo la C_i , efectos que no fueron superados con CO_2 alto en la medida. Parece, por tanto, que un descenso de la difusión del CO_2 disminuyó la fotosíntesis en la línea 8 en comparación con las otras líneas RCSL y el cv. Harrington. Finalmente, los genotipos con un mayor contenido hídrico relativo foliar, la línea 89 y el cv.

Harrington, fueron los que mostraron la mayor A y g_s en condiciones de déficit hídrico, la línea 89 en el inicio del desarrollo del grano, y fue superada por el cv. Harrington en el estadio de grano lechoso tardío. En un estudio con trigo, se ha mostrado que los genotipos más resistentes a la sequía tenían una mayor capacidad fotosintética y conductancia de los estomas en déficit hídrico que aquellos más susceptibles (Ritchie *et al.*, 1990), lo que sugiere que el cv. Harrington y la línea 89 fueron los genotipos más resistentes a la sequía moderada de larga duración impuesta en nuestras condiciones experimentales.

5.1.2.- El déficit hídrico altera la partición del C y N en las hojas y el último entrenudo del tallo. Relación con el contenido y grado de polimerización de los fructanos.

La fotosíntesis, como proceso clave del metabolismo primario, desempeña una función importante en la respuesta de las plantas a la sequía (Flexas *et al.*, 2004). Puesto que la productividad de los cultivos depende de los fotoasimilados generados a nivel de planta entera, cualquier alteración en la fijación fotosintética del CO_2 inducida por el déficit hídrico irá acompañada de cambios en el contenido de carbohidratos y compuestos nitrogenados en los diferentes órganos (Pinheiro *et al.*, 2001; Antonio *et al.*, 2008) y modificará la partición de fotoasimilados en la planta, lo que redundará en la producción de biomasa y el rendimiento de grano en los cereales (Schnyder, 1993). Los carbohidratos desempeñan un papel clave en la integración a nivel de planta entera de las respuestas a perturbaciones internas y ambientales, actúan como sustratos y moduladores de la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo del carbono y del nitrógeno, y regulan la expresión de genes relacionados con dichos metabolismos (Rolland *et al.*, 2006; Osuna *et al.*, 2007). En cereales, como el trigo y la cebada, el principal producto de la fotosíntesis en las hojas es la sacarosa (Koroleva *et al.*, 1998), que bien es acumulada, convertida en fructanos (el principal carbohidrato de reserva en tejidos vegetativos), o exportada a otras partes de la planta a través del floema (Pollock and Cairns, 1991; Vijn and Smeekens, 1999; Müller *et al.*, 2000). Este grupo de plantas generalmente almacena sacarosa y fructanos en las hojas en mayor medida que el almidón (Koroleva *et al.*, 1997). Los fructanos son polímeros de fructosa sintetizados a partir de la sacarosa y desempeñan un papel importante en la partición de carbohidratos durante el crecimiento y la diferenciación de órganos (Hendry, 1993). El llenado del grano depende de dos fuentes principales de carbono, la fotosíntesis de las hojas y de la espiga, y de la movilización de los carbohidratos solubles en agua desde el tallo a los granos en crecimiento (Ehdaie *et al.*, 2008). Cuando la provisión de carbono fotosintético es disminuida por la sequía, el llenado del grano depende aún más de la removilización de los recursos del tallo (Schnyder, 1993; Blum *et al.*, 1994; Ehdaie *et al.*, 2008). Por ello, se ha propuesto que el tallo puede contribuir a la supervivencia de la planta actuando como un órgano de almacenaje temporal (Rodrigues *et al.*, 1995) y los cambios inducidos por el déficit hídrico en el contenido de carbohidratos y compuestos nitrogenados de la hoja y el tallo parecen constituir una estrategia general de adaptación a la sequía (Pinheiro *et al.*, 2001), que repercutirá en el llenado y rendimiento de grano. En consonancia con dicha apreciación, se ha evaluado la variabilidad genotípica en la acumulación de carbohidratos solubles e insolubles en las hojas y el tallo del tallo principal, y su contribución al llenado del grano bajo sequía de larga duración y su dependencia de la intensidad de la limitación en la disponibilidad hídrica del suelo y el estadio de desarrollo de la planta.

5.1.2.1.- Partición del C y N en las hojas.

A los **49 días después de la siembra**, los carbohidratos acumulados en el momento de máxima fotosíntesis, entre las 4–6 horas después del comienzo del fotoperiodo, en la sexta hoja de las plantas de cebada fueron los fructanos, la sacarosa y el almidón, junto a la glucosa y fructosa en mucha menor proporción (Tabla 4.3). Los fructanos son el principal carbohidrato de reserva en las hojas y otros órganos vegetativos de los cereales (Pollock and Cairns, 1991; Koroleva *et al.*, 1997; Koroleva *et al.*, 1998) y aunque se acumularon mayoritariamente en la hoja más joven completamente extendida de las plantas de cebada, los niveles de almidón fueron también elevados. Cambios similares en el patrón de acumulación de azúcares foliares se han encontrado en la tercera hoja de plantas de cebada a las dos horas después del comienzo del fotoperiodo (Morcuende *et al.*, 2004), las ligeras diferencias contempladas en la cuantía de cada uno de los carbohidratos descritos entre ambos estudios se atribuyeron a la fase del desarrollo foliar, a la progresión del fotoperiodo y/o a las condiciones de crecimiento.

La limitación en la disponibilidad hídrica del suelo condujo a un aumento de los niveles foliares de almidón y no modificó significativamente el contenido de fructanos, glucosa, sacarosa y carbohidratos solubles totales de la sexta hoja de las plantas de cebada (Tabla 4.3). Una característica comúnmente observada en plantas sometidas a sequía es que la demanda de carbono para el crecimiento de la parte aérea de la planta y la expansión foliar disminuye antes de que la provisión de carbono por la fotosíntesis pueda ser alterada por el déficit hídrico (Müller *et al.*, 2001; Hummel *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2011). Por ello, a diferencia del mayor aumento de sacarosa y de otros carbohidratos solubles en agua frecuentemente encontrados en las hojas de diferentes especies vegetales con la sequía (Quick *et al.*, 1992; Pilon-Smits *et al.*, 1995; Hare *et al.*, 1998; De Roover *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000), la mayor acumulación de almidón en plantas de déficit hídrico sugiere que en ausencia de colectores de fotoasimilados potentes, como previsiblemente ocurre en etapas tempranas del desarrollo foliar de la cebada, pudo tener lugar un desacoplamiento entre el suministro y la demanda de carbono por la limitación del crecimiento con respecto a las plantas de control hídrico, lo que atenuaría la exportación de carbono y el excedente de asimilados favorecería la partición del carbono hacia la síntesis de almidón (Wagner, 1986; Müller *et al.*, 2000). Recientemente, se ha mostrado que el almidón es un importante integrador del metabolismo de las plantas y el crecimiento en respuesta a cambios ambientales y del desarrollo, y equilibra el crecimiento con la provisión de carbono (Sulpice *et al.*, 2009). Las hojas acumularon mayoritariamente polisacáridos solubles en agua, fructanos, los cuales se clasifican en varios tipos dependiendo de sus uniones glucosídicas (Vijn and Smeekens, 1999; Lasseur *et al.*, 2011) y en cereales predominan los del tipo gramíneas compuestos de unidades de fructosa con uniones $\beta(2-6)$ y ramificaciones con uniones $\beta(2-1)$ que difieren en el grado de polimerización (Kawakami and Yoshida, 2005). La variabilidad en la cantidad de fructanos de grado de polimerización 3 y 4 en las hojas de distintas especies herbáceas muestra la complejidad de las enzimas involucradas en la síntesis de fructanos, las fructosiltransferasas, o los efectos de las condiciones ambientales (Cairns and Pollock, 1988; Bancal *et al.*, 1991; Chatterton and Harrison, 1997). La evaluación del grado de polimerización de dichos azúcares en la sexta hoja de las plantas de cebada mostró un predominio de fructanos con un grado de polimerización no superior a 10, agrupados en las fracciones de fructanos de bajo DP (trímeros, tetrámeros y pentámeros) y medio DP (hexámeros hasta DP 10), con respecto a aquellos con un alto grado de polimerización (DP > 10) (Tabla 4.7). Un perfil similar de acumulación de fructanos se ha mostrado en experimentos con hojas de cebada cortadas e iluminadas para inducir la biosíntesis de fructanos (Wagner and Wiemken, 1989; Bancal *et al.*, 1992) y difiere del

patrón encontrado en otras especies vegetales como *Lolium* que acumulan fructanos de alto DP entre 25-30 (Sims *et al.*, 1992; Bonnett *et al.*, 1994) y de algunos microorganismos, que también pueden sintetizar fructanos, en los que el peso molecular supera a los de las plantas y el grado de polimerización puede llegar a alcanzar hasta 100000 unidades de fructosa (Turk *et al.*, 1997). Bancal *et al.* (1992) compararon la composición de los fructanos acumulados en hojas cortadas iluminadas durante 24 y 60 horas con la de los tallos de plantas de cebada cultivadas en el campo unos 10 días después de la antesis y observaron el mismo tipo de fructanos en los extractos de hojas inducidas o de los tallos, aunque las cantidades de cada uno de ellos diferían ampliamente. Las hojas iluminadas durante 60 horas mostraron una mayor fracción de fructanos con un alto grado de polimerización, junto a un incremento de algunos otros fructanos con un grado de polimerización inferior que aquellas iluminadas durante 24 horas, ello sugiere que la inducción de la biosíntesis de fructanos a más largo plazo se acompaña de una mayor acumulación de fructanos con alto DP. Esto podría justificar que las hojas jóvenes fotosintéticamente activas acumulen más fructanos de alto DP, junto a fructanos de menor grado de polimerización, que las hojas bandera y penúltima en el inicio del desarrollo del grano y etapas posteriores del desarrollo de las plantas de cebada como se describirá más adelante (Tabla 4.7). Se ha mostrado que la principal diferencia entre los tipos de fructanos que se acumulan a corto y a largo plazo es la abundancia de uniones entre los fructosilos, predominando en el primer caso las uniones $\beta(2-1)$ y en el segundo las $\beta(2-6)$ (Carpita *et al.*, 1991). El déficit hídrico no modificó significativamente las fracciones foliares de fructanos de bajo, medio o alto grado de polimerización (Tabla 4.7), al igual que ocurrió con el contenido foliar de fructanos antes indicado (Tabla 4.3). Esto contrasta con el incremento de fructanos de $DP \geq 8$ inducido por la sequía en *Lolium perenne* (Thomas and James, 1999).

En este estadio del desarrollo foliar de la cebada, el déficit hídrico redujo también el contenido foliar de fructosa en la línea 89 (Tabla 4.3, Fig. 4.5), posiblemente como consecuencia de una inducción de la biosíntesis de fructanos (Morcuende *et al.*, 2004), lo que facilitaría la incorporación de la fructosa a la síntesis de fructanos y la liberación de la glucosa de la sacarosa (Koroleva *et al.*, 1998; Morcuende *et al.*, 2004). En consonancia con dicha apreciación, el contenido de glucosa aumentó en la línea 89 en comparación con los otros genotipos de cebada (Tabla 4.3). Las mayores concentraciones de glucosa a menudo se correlacionan con una elevada división y expansión celular (Weber *et al.*, 2005; Rolland *et al.*, 2006) y precisamente la línea 89 mostró un crecimiento ligeramente más acelerado y una mayor biomasa y altura que los demás genotipos (Tabla 4.17). Por otra parte, el contenido de proteínas foliares de la línea 89 fue también mayor que en las otras líneas RCSL, y tendió a aumentar con respecto al cv. Harrington (Tabla 4.12). La síntesis de proteínas representa un sumidero importante de energía (Penning de Vries, 1975) y se ha propuesto que es necesaria una estrecha interrelación entre el metabolismo del carbono y la síntesis de proteínas para prevenir la deficiencia en carbono (Smith and Stitt, 2007), especialmente en tejidos en crecimiento en los que la mayoría de la síntesis de proteínas contribuye a la generación de nueva biomasa (Piques *et al.*, 2009). Y se sabe que los carbohidratos aumentan la expresión (Cheng *et al.*, 1992), la actividad y el estado de activación de la nitrato reductasa (Kaiser and Huber, 1994; Scheible *et al.*, 1997a; Morcuende *et al.*, 1998) e incrementan el flujo del carbono desde la glicólisis hacia la biosíntesis de ácidos orgánicos y aminoácidos y posterior síntesis de proteínas (Morcuende *et al.*, 1998; Osuna *et al.*, 2007). En relación con dichas argumentaciones, los resultados sugieren que la mejora del estado de carbono de la línea 89 pudo facilitar la asimilación del nitrógeno y la inducción de la síntesis de proteínas foliares, al igual que en el cv. Harrington.

Las plantas usan el carbono fijado fotosintéticamente para el crecimiento y el almacenaje (Turk *et al.*, 1997). Los carbohidratos no estructurales desempeñan un papel central en el metabolismo de las plantas como fuentes de carbono y energía en las células, y sus niveles se ajustan continuamente como resultado del balance entre el suministro y la demanda de carbono a nivel de planta entera, por lo que el metabolismo de los azúcares es enormemente dinámico y varía con el estado de desarrollo de las plantas y en respuesta al ambiente (Rolland *et al.*, 2006; Ramel *et al.*, 2009). En el **inicio del desarrollo del grano**, con la progresión del desarrollo de las plantas, la acumulación de carbohidratos foliares, con la excepción de la sacarosa (Tabla 4.4), fue menor que en la anterior etapa del crecimiento. El descenso de carbohidratos de reserva se relacionó con la exportación del carbono para la diferenciación de órganos (Hendry, 1993). La sacarosa es el compuesto de transporte preferencial de esqueletos carbonados (Komor, 2000) y es temporalmente polimerizada en fructanos en el tallo (Van den Ende *et al.*, 2003). El menor almacenaje de carbono en las hojas de cebada sugiere la existencia de un fuerte gradiente de sacarosa entre las hojas, bandera y penúltima, y otros órganos para mantener el desequilibrio temporal entre el suministro de carbono fotosintético y la demanda de carbono por los colectores de asimilados (Roth *et al.*, 1997). En conformidad con la disminución del contenido de fructanos, las fracciones de fructanos foliares, independientemente de su grado de polimerización, fueron menores que en la sexta hoja de las plantas de cebada como se anticipó anteriormente (Tabla 4.7). Además, con la progresión de la sequía, el déficit hídrico condujo a una mayor acumulación de carbohidratos solubles en las hojas de las plantas de cebada, como resultado del aumento del contenido de sacarosa, fructanos, glucosa y fructosa y no modificó significativamente el contenido foliar de almidón (Tabla 4.4), aminoácidos y proteínas (Tabla 4.12). Aun cuando el déficit hídrico condujo a un descenso de la asimilación fotosintética del CO₂ en el inicio del desarrollo del grano (Fig. 4.1a), los carbohidratos solubles en agua se acumularon en las hojas, particularmente la sacarosa (Tabla 4.4). La inhibición del desarrollo de la parte aérea disminuiría la demanda metabólica de la planta y facilitaría la acumulación en las hojas de compuestos osmóticamente activos aun cuando la fotosíntesis se encontraba limitada (Chaves and Oliveira, 2004), como evidencia la reducción de la superficie verde y del peso seco de las distintas partes del tallo principal de la planta (Tabla 4.14, Tabla 4.16). Un aumento de los niveles de sacarosa y de otros azúcares no estructurales se ha encontrado frecuentemente en condiciones de estrés hídrico (Pilon-Smits *et al.*, 1995; Hare *et al.*, 1998) y se ha propuesto que contribuyen al ajuste osmótico y al mantenimiento de la turgencia celular (Hare *et al.*, 1998), al sostenimiento de la fotosíntesis y el crecimiento (Cattivelli *et al.*, 2008), a la protección de la integridad de las membranas (Hincha *et al.*, 2002) y a la prevención de la desnaturalización de las proteínas (Bartels and Sunkar, 2005). La alteración de la partición de fotosintatos en favor de la síntesis de sacarosa con el déficit hídrico se ha atribuido principalmente a la activación de la sacarosa fosfato sintasa por fosforilación reversible de la proteína (Toroser and Huber, 1997). En un estudio de expresión génica global con plantas de trigo, el incremento de carbohidratos foliares inducido por la sequía se acompañó de una reducción de la expresión de la mayoría de los genes que codifican enzimas cloroplásticas involucradas en la fijación del CO₂ y de un aumento de los niveles de transcritos de los genes que codifican enzimas citoplasmáticas y vacuolares de las rutas metabólicas que producen glucosa, fructosa y fructanos (Xue *et al.*, 2008a), lo que sugiere una coordinación en la regulación de la expresión de genes claves involucrados en la asimilación del carbono y la acumulación de carbohidratos. El déficit hídrico condujo a un aumento del contenido foliar de fructanos en la línea 89 y tendió a aumentarlos en los demás genotipos (Fig. 4.6), y en dichas condiciones, la acumulación de fructanos fue notablemente mayor en la línea 89 que en las otras líneas RCSL y el cv. Harrington, mientras que en condiciones de control hídrico no hubo diferencias significativas entre ellos (Fig. 4.6). Estos resultados están de acuerdo con estudios previos que muestran que el tipo de

carbohidrato acumulado en la hoja depende del genotipo y la especie vegetal (Pelleschi *et al.*, 1997; Pinheiro *et al.*, 2001; Villadsen *et al.*, 2005) y aquellos que relacionan los cambios en la partición del carbono con la tolerancia a la deshidratación (Ingram and Bartels, 1996). Los fructanos, junto a su papel como carbohidrato de reserva (Pollock and Cairns, 1991), confieren tolerancia a la sequía y al frío (Vijn and Smeekens, 1999; Pérez *et al.*, 2011). Se ha encontrado una correlación positiva entre el contenido de fructanos y la resistencia a la sequía (Volaire *et al.*, 1998). La acumulación de fructanos en condiciones de escasa disponibilidad hídrica se ha relacionado con un aumento de transcritos del gen que codifica la sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST), que se acompaña de un aumento de la actividad del enzima y consiguiente inducción de la biosíntesis de fructanos (De Roover *et al.*, 2000). En nuestras condiciones, el aumento del contenido de fructanos inducido por el déficit hídrico se acompañó de un incremento de la fracción de fructanos de grado de polimerización bajo y alto, y en menor medida de aquellos de DP medio (Tabla 4.7). En consonancia con estudios previos de inducción de la biosíntesis de fructanos en hojas de cebada iluminadas durante periodos prolongados (Bancal *et al.*, 1992) y aquellos que mostraron una mayor acumulación de fructanos de alto peso molecular inducida por la sequía en *Porella Platyphylla* (Marschall *et al.*, 1998). Se ha sugerido que en condiciones de estrés hídrico los genotipos tolerantes acumulan mayores cantidades de fructanos que los sensibles (Volaire and Lelièvre, 1997; Kerepesi and Galiba, 1998). Plantas transgénicas de tabaco y remolacha azucarera que acumulan fructanos muestran una elevada tolerancia a la sequía (Pilon-Smits *et al.*, 1995; Pilon-Smits *et al.*, 1999). Y se ha mostrado que la acumulación de solutos osmóticamente activos facilita la entrada de agua dentro de la célula y limita la salida, proporcionando la turgencia necesaria para la expansión celular (Hare *et al.*, 1998), a la vez que contribuyen al sostenimiento de la fotosíntesis y el crecimiento (Cattivelli *et al.*, 2008). En sintonía con dichas apreciaciones, cabe señalar que la línea 89, en comparación con los demás genotipos de cebada, no sólo mostró un mayor contenido foliar de fructanos y una mayor fracción de fructanos de DP bajo y alto, junto a una mayor altura y una ligera aceleración del desarrollo, sino que también la fotosíntesis fue mayor en condiciones de déficit hídrico en el inicio del desarrollo del grano (Fig. 1a).

En el **estadio de grano lechoso tardío**, el déficit hídrico condujo a un aumento del contenido foliar de fructosa, sacarosa y almidón, mientras que la glucosa y los fructanos, la fracción de fructanos de DP medio y alto, y el total de carbohidratos solubles variaron en interacción con el genotipo (Tabla 4.5), reflejando la diferente sensibilidad a la sequía de los genotipos de cebada, lo que posiblemente dependa del estado de desarrollo y de la capacidad intrínseca de cada uno de ellos (Reymond *et al.*, 2003). La persistencia en el tiempo de la limitación hídrica del suelo condujo a un aumento de la acumulación de carbohidratos en las hojas de las plantas de cebada en este estadio del desarrollo, en consonancia con los cambios metabólicos previamente observados en el inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.4). Con el avance del desarrollo de las plantas, la asimilación fotosintética del carbono disminuyó ligeramente en comparación con la anterior fase del desarrollo (Tabla 4.2, Tabla 4.1), y se asoció con un descenso del contenido de clorofilas (Tabla 4.12) como consecuencia de la senescencia foliar. Sin embargo, la disminución de la fotosíntesis pareció ser más acusada en plantas con amplia disponibilidad hídrica que en aquellas con escasa disponibilidad hídrica con respecto al inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.2, Tabla 4.1), lo que se tradujo en que los efectos de la sequía en la fotosíntesis de los distintos genotipos fuesen más atenuados, particularmente en el cv. Harrington (Fig. 4.3a). Sin embargo, la provisión de carbono fotosintético posiblemente pudo ser suficiente, con independencia de la disponibilidad hídrica, para satisfacer los requerimientos de carbono de otros órganos, y el excedente pudo acumularse. Lo cual permitió la mejora del estado de carbono de las hojas de las plantas de cebada en esta fase del desarrollo en comparación con el inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.5, Tabla 4.4). La alteración de la fotosíntesis y el crecimiento con la sequía se ha

observado en diferentes especies vegetales (Tardieu *et al.*, 1999; Chaves *et al.*, 2002). En un estudio con *Arabidopsis* sobre los cambios en el uso del carbono bajo sequía de diferente intensidad se ha mostrado una fuerte reducción en la expansión foliar durante el día, que se acompañó de un aumento de azúcares, mientras que el crecimiento durante la noche fue menos afectado (Hummel *et al.*, 2010), y la fotosíntesis se mantuvo bastante estable incluso con un déficit hídrico más severo. Además, se ha mostrado que en cereales la acumulación de carbohidratos solubles en agua en el tallo tiene lugar en etapas reproductivas tempranas, alcanzando un máximo entre las dos y cuatro semanas después de la antesis, coincidiendo con el mantenimiento de la fotosíntesis foliar (Schnyder, 1993). En conformidad con dicha apreciación se encuentran los cambios observados en el patrón de acumulación de azúcares en el último entrenudo del tallo de las plantas de cebada, los cuales se discutirán más adelante. Por otra parte, la estabilidad encontrada en el contenido foliar de sacarosa es un aspecto interesante digno de resaltar (Tabla 4.5), ya que corrobora el mantenimiento de la fotosíntesis en el estadio de grano lechoso tardío. El contenido de sacarosa se mantuvo bastante constante tanto cuando se estimó la concentración de sacarosa en la sexta hoja brevemente después de la imposición de la sequía (Tabla 4.3), o en las hojas bandera y penúltima a más largo plazo desde la imposición de la sequía, en los estadios de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.4) y grano lechoso tardío (Tabla 4.5). No obstante, el déficit hídrico condujo a una mayor acumulación de sacarosa en fases reproductivas, cuando aumentó el tiempo de exposición a la sequía. La síntesis de fructanos es dependiente de la acumulación de sacarosa, y la sacarosa es no sólo el sustrato para la síntesis de dichos carbohidratos sino también un efector para la inducción de la actividad (Wagner, 1986; Pollock and Cairns, 1991) y la expresión génica de las fructosiltransferasas (Müller *et al.*, 2000; Nagaraj *et al.*, 2001). Se han mostrado evidencias de que la regulación de la síntesis de fructanos en las hojas de cebada es independiente de la hexoquinasa y parece depender de la sensibilización por sacarosa (Müller *et al.*, 2000). Y se ha propuesto que es necesaria la existencia de una concentración umbral de sacarosa para la inducción de la síntesis de fructanos, como evidencian ciertos estudios con hojas cortadas de *Lolium temulentum* (Cairns and Pollock, 1988), de hojas de cebada incubadas en agua bajo iluminación (Simmen *et al.*, 1993) y/o incubadas con sacarosa en la oscuridad (Wagner *et al.*, 1986) para inducir la biosíntesis de fructanos.

Las alteraciones inducidas por el déficit hídrico en la partición del carbono a nivel foliar en este estadio del desarrollo se acompañaron de un descenso del contenido de aminoácidos y proteínas foliares solubles (Tabla 4.12), lo cual podría derivar de una menor síntesis de proteínas, o bien de una mayor degradación y/o exportación a otros órganos. Una disminución de proteínas se ha encontrado en hojas de *Lupinus albus*, que fue más acusada con la progresión de la sequía (Pinheiro *et al.*, 2001), y en otras especies vegetales (Bray, 1993; Chen *et al.*, 1994; Riccardi *et al.*, 1998). La pérdida de proteínas foliares se ha relacionado con un descenso de la actividad nitrato reductasa, enzima clave en la regulación de la asimilación de nitrógeno (Ferrario-Méry *et al.*, 1998; Foyer *et al.*, 1998; Correia *et al.*, 2005; Hummel *et al.*, 2010). Correia *et al.* (2005) asociaron el descenso de actividad NR inducido por la sequía en plantas de girasol y *Lupinus* con un agotamiento de nitrato, que es un potente inductor de la expresión del enzima (Lin *et al.*, 1994; Scheible *et al.*, 1997a). Un descenso en los niveles de transcritos de los genes que codifican la NR con la sequía se ha encontrado en plantas de maíz y tabaco (Ferrario-Méry *et al.*, 1998; Foyer *et al.*, 1998). Sin embargo, en un estudio con *Arabidopsis*, los niveles de nitrato se mantuvieron con el establecimiento de la sequía y relacionaron la disminución de la NR con la menor concentración intercelular de CO₂ por el descenso de la conductancia de los estomas, lo que contribuyó a la inactivación post-traducciona de la NR (Kaiser and Brendle-Behnisch, 1991), al igual que en un estudio con plantas de espinaca (Kaiser and Förster, 1989). Se ha propuesto también que el cierre de estomas inducido por la sequía no sólo podría

disminuir la concentración de CO₂ intercelular sino que podría limitar la absorción de nutrientes por la raíz al disminuir la transpiración, lo que afectaría a la toma de nitrato y a la asimilación del nitrógeno (Larsson *et al.*, 1989).

El contenido de fructanos y de carbohidratos solubles en agua varió entre genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.5), y la pauta de cambio de dichos carbohidratos fue similar. Así, en plantas de control hídrico el cv. Harrington tuvo un mayor contenido de fructanos y WSC que los demás genotipos, con contenidos similares entre ellos, pero el déficit hídrico aumentó los niveles de fructanos y, por tanto, de WSC en la línea 8 y tendió a hacerlo en las líneas 76 y 89, no así en Harrington, hasta el punto de que la línea 8 tuvo un mayor contenido de dichos carbohidratos que las otras líneas RCSL, mientras que Harrington tuvo contenidos similares a los de las líneas RCSL (Fig. 4.7ab). Además, el contenido foliar de almidón aumentó en la línea 89 con respecto a la línea 76 y el cv. Harrington y tendió a aumentar en comparación con la línea 8 (Tabla 4.5). La variabilidad entre los genotipos en la partición del carbono en los carbohidratos de reserva podría derivar presumiblemente de la velocidad de asimilación del CO₂ (Ruuska *et al.*, 2006) y podrían reflejar también variaciones entre la acumulación y la removilización del carbono derivadas de la velocidad de desarrollo de cada uno de ellos. En relación con este último aspecto, los resultados parecen mostrar que la línea 76 y el cv. Harrington tuvieron una pauta de desarrollo ligeramente más lenta que las líneas 8 y 89, ya que el contenido de clorofilas en los primeros genotipos fue mayor que en los segundos, y podría inferirse una mejora del estado nitrogenado no sólo por el aumento de clorofilas sino también del contenido foliar de proteínas (Tabla 4.12) como consecuencia de una senescencia más tardía. Del mismo modo, aunque en las líneas 8 y 89 la senescencia fuese más rápida, la segunda fue aún más acelerada que la primera. Por ello, en la línea 89 esa ligera aceleración del desarrollo con respecto a los demás genotipos pudo propiciar una mayor exportación de los carbohidratos solubles foliares a otros órganos, no así del almidón que sería posteriormente degradado como se aprecia en el estadio de grano pastoso temprano (Tabla 4.5, Tabla 4.6). En consonancia con esa mayor exportación, la línea 89 tuvo el mayor contenido de fructanos y carbohidratos solubles en el último entrenudo del tallo en esta misma fase del desarrollo (Tabla 4.9). En el cv. Harrington, la fotosíntesis disminuyó menos que en el resto de genotipos, lo que facilitaría que la concentración de fructanos y carbohidratos solubles en agua en condiciones de control hídrico fuese mayor que en las líneas RCSL (Fig. 4.7ab). Mientras que en la línea 8 el efecto del déficit hídrico en la fotosíntesis fue más acusado que en ningún otro genotipo de cebada (Fig. 4.3a), lo que pudo facilitar la acumulación de compuestos con capacidad osmótica como los fructanos y, por consiguiente, del total de carbohidratos solubles en agua (Fig. 4.7ab), junto a un aumento de las fracciones de fructanos de DP medio y alto (Tabla 4.7).

En el **estadio de grano pastoso temprano**, independientemente de la disponibilidad hídrica estudiada, los niveles foliares de fructanos, sacarosa y almidón fueron menores que aquellos observados en el estadio de grano lechoso tardío (Tabla 4.6, Tabla 4.5). El descenso de fotosíntesis podría explicar la disminución del contenido de carbohidratos foliares en esta fase más avanzada del desarrollo del grano. Considerando la estrecha relación existente entre el contenido foliar de clorofilas y la asimilación fotosintética del carbono (González *et al.*, 2010), aún en ausencia de información relacionada con los parámetros de intercambio gaseoso, podría inferirse por el descenso del contenido de clorofilas (Tabla 4.12) que pudo tener lugar una importante reducción de la fotosíntesis como consecuencia de la senescencia foliar. El contenido de clorofilas disminuyó un 30.8% en plantas de control hídrico y un 48.2% en plantas con escasa disponibilidad hídrica con respecto a la anterior fase del desarrollo de las plantas (Tabla 4.12). Además, el déficit hídrico

condujo a un aumento del contenido foliar de carbohidratos solubles en agua y de fructanos (Tabla 4.6), y el incremento de estos últimos se reflejó en un aumento de las fracciones de fructanos cualquiera que fuera su grado de polimerización, bajo, medio y alto (Tabla 4.7). No obstante, cabe señalar que la acumulación de fructanos fue menor que en el estadio de grano lechoso tardío (Tabla 4.5), y por ello también disminuyeron las fracciones de DP bajo y medio dependiendo de la disponibilidad hídrica (Tabla 4.7). El menor contenido de sacarosa observado en esta fase del desarrollo podría constituir otra evidencia de la disminución de la fotosíntesis, particularmente en la línea 89 (Tabla 4.5, Tabla 4.6), en la que muy posiblemente no se logró alcanzar el umbral mínimo de sacarosa para mantener la síntesis de fructanos y disminuyeron notablemente. En conjunto, estos resultados podrían indicar que predominó la removilización de asimilados por la menor provisión de carbono fotosintético, por lo que la degradación de sacarosa y fructanos condujo a un aumento del contenido hexosas con respecto a la anterior fase del desarrollo, que fue más acusada en los genotipos que mostraron una senescencia más rápida, de acuerdo con estudios previos (Joudi *et al.*, 2012). La removilización de los carbohidratos foliares ayudaría a mantener el gradiente de sacarosa necesario para satisfacer la demanda de otros órganos, en particular de la espiga para el llenado del grano (Li *et al.*, 2013). En conformidad con esa mayor redistribución de asimilados, los compuestos nitrogenados también disminuyeron, aunque se mantuvo el efecto del déficit hídrico en el contenido de proteínas foliares y aminoácidos observado en el anterior estadio del desarrollo (Tabla 4.12). Si bien no sólo pudo aumentar la exportación sino también la degradación de proteínas, con independencia de la disponibilidad hídrica, lo que muy posiblemente propició la acumulación de aminoácidos, en sintonía con los cambios observados en anteriores fases de la post-antesis de la cebada. Por otra parte, la variabilidad genotípica en el contenido foliar de metabolitos del carbono y del nitrógeno podría derivar de las diferencias observadas en la pérdida de capacidad fotosintética y en la velocidad de desarrollo entre los genotipos como se anticipó anteriormente. La senescencia foliar fue más acelerada en las líneas 8 y 89 que en la línea 76 y el cv. Harrington, ya que la pérdida de clorofilas fue más intensa en las primeras líneas RCSL (Tabla 4.12). En el cv. Harrington y la línea 76, la limitación de la fotosíntesis pudo ser menos acusada, y menor aún en el cv. Harrington como podría inferirse por la menor pérdida de clorofila (Tabla 4.12), el mayor contenido de sacarosa y la menor acumulación de glucosa y fructosa (Tabla 4.6), junto al mayor contenido de proteínas foliares que en los demás genotipos (Tabla 4.12). Entre las líneas 8 y 89, la mayor velocidad de desarrollo de la línea 89 con respecto a la línea 8 condujo a una mayor pérdida de clorofilas en la primera línea RCSL (Tabla 4.12). En la línea 89, la senescencia más temprana se acompañó de una mayor removilización del carbono foliar, que condujo a un notable descenso del contenido de sacarosa, almidón y fructanos, junto a un aumento de hexosas (Tabla 4.6). El descenso de fructanos según el grado de polimerización fue mayor para aquellos de DP medio y alto (Tabla 4.7), los cuales disminuyeron notablemente en la línea 89 en comparación con los otros genotipos de cebada, y generarían fructanos de menor grado de polimerización más fácilmente metabolizables, lo que podría explicar que no hubiera diferencias en la fracción de fructanos de DP bajo entre los genotipos (Tabla 4.7). La degradación de fructanos de peso molecular elevado a fructanos de menor peso molecular, y compuestos más osmóticamente activos, se ha encontrado en plantas de trigo sometidas a estrés hídrico durante el periodo de llenado del grano (Virgona and Barlow, 1991). La mayor removilización de asimilados foliares en la línea 89 se acompañó también de un descenso del contenido de proteínas solubles, lo que sugiere una mayor exportación a otros órganos y/o degradación. Una mayor degradación o velocidad de recambio de proteínas pudo conducir a un aumento del contenido de aminoácidos foliares (Tabla 4.12). Cambios similares a los descritos en la línea 89, aunque más tenues, pudieron apreciarse en la línea 8 tanto en el contenido de carbohidratos como de proteínas (Tabla 4.6, Tabla 4.12).

5.1.2.2.- Partición del C y N en el último entrenudo del tallo.

Como se ha descrito anteriormente, el estrés hídrico aumentó el contenido de carbohidratos solubles en agua en las hojas de los genotipos de cebada, al igual que en otros estudios con cebada (Teulat *et al.*, 2001) y otras especies vegetales (Kim *et al.*, 2000; Cramer *et al.*, 2007). El aumento de la concentración foliar de carbohidratos pareció ser consecuencia del desacoplamiento entre la provisión de carbono por la fotosíntesis y la demanda de carbono para el crecimiento inducido por la sequía (Müller *et al.*, 2011), que a menudo se acompaña de un aumento del contenido de carbohidratos en otros órganos, como las raíces, tallos, flores y frutos (Jiang and Huang, 2001; Bogeat-Triboulot *et al.*, 2007; Mercier *et al.*, 2009). Se sabe que el tallo es el principal órgano para el almacenaje de las reservas de carbohidratos (Ehdaie *et al.*, 2006b; Li *et al.*, 2013) y actúa como reservorio transitorio de nutrientes, proporcionando el sustrato necesario para mantener el transporte y el suministro de asimilados al grano durante el periodo oscuro del ciclo diurno y en las etapas tardías del llenado del grano, cuando el aparato fotosintético comienza la senescencia y la velocidad de producción de fotoasimilados es inferior a las necesidades del grano (Schnyder, 1993). Durante la fase reproductiva de la cebada, en la línea 89, la acumulación de carbohidratos solubles en agua en el último entrenudo del tallo fue mayor en el inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.8) que en el estadio de grano pastoso temprano (Tabla 4.10), mientras que en el resto de genotipos fue mayor en el estadio de grano pastoso temprano. La línea 89 alcanzó el máximo contenido de carbohidratos solubles en el estadio de grano lechoso tardío (Tabla 4.9), al igual que la línea 8, aunque en menor cuantía que la anterior línea RCSL, y en la línea 76 y el cv. Harrington, el contenido de azúcares solubles fue menor que en el estadio de grano pastoso temprano (Tabla 4.9, Tabla 4.10). Se ha indicado que la acumulación de carbohidratos solubles en el tallo de cereales tiene lugar durante etapas reproductivas tempranas, alcanzando un máximo entre las 2–4 semanas después de la antesis, con posterioridad los WSC son degradados y translocados al grano para mantener la síntesis de almidón en etapas tardías del llenado del grano (Wardlaw and Willenbrink, 1994). En el presente estudio, los carbohidratos solubles en la línea 89 se acumularon aproximadamente desde el inicio del desarrollo del grano hasta el estadio de grano lechoso tardío y después disminuyeron, mientras que en la línea 76 y el cv. Harrington se prolongó desde el inicio del desarrollo del grano hasta el estadio de grano pastoso temprano, y en la línea 8 comenzaron a disminuir en este último estadio de desarrollo o brevemente antes. Ello evidencia la existencia de cierta variabilidad en el patrón de acumulación de carbohidratos solubles entre los distintos genotipos de cebada durante las fases de desarrollo. En cereales de grano pequeño, la acumulación de carbohidratos solubles en el tallo se considera una característica importante que contribuye a la plasticidad fenotípica (Dreccer *et al.*, 2013).

En el **inicio del desarrollo del grano**, los carbohidratos se almacenaron en el último entrenudo del tallo principalmente como fructanos, seguidos de la sacarosa y las hexosas, mientras que el almidón se acumuló en mucha menor cuantía (Tabla 4.8). Los fructanos fueron el principal componente de los carbohidratos solubles en agua almacenados en el último entrenudo del tallo de las plantas de cebada, al igual que en otros estudios con trigo (Virgona and Barlow, 1991; Ruuska *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2008b; Joudi *et al.*, 2012; Khoshro *et al.*, 2014), lo que sugiere que la síntesis de fructanos se indujo en los tallos cuando la disponibilidad de carbono fue superior a la demanda de otros colectores de asimilados (Ruuska *et al.*, 2008). El déficit hídrico condujo a una mayor acumulación de carbohidratos solubles en el último entrenudo del tallo como consecuencia del aumento de glucosa, sacarosa y fructanos (Tabla 4.8), mientras que no tuvo efecto en la acumulación de carbohidratos insolubles como el almidón, cambios similares a los observados en el contenido foliar de

carbohidratos en esta fase del desarrollo de las plantas de cebada, como se ha indicado con anterioridad (Tabla 4.4). Estos resultados están de acuerdo con nuestros estudios previos con cebada cultivada en el campo en dos ambientes chilenos con diferente disponibilidad hídrica, los cuales mostraron un aumento de carbohidratos solubles en el tallo de las plantas en condiciones de escasez hídrica (Méndez *et al.*, 2011; Del Pozo *et al.*, 2012), y con otros estudios con trigo (McIntyre *et al.*, 2011; Joudi *et al.*, 2012; Khoshro *et al.*, 2014), y difieren de aquellos reportados por Ehdai *et al.* (2006b) en los que la sequía redujo el contenido de carbohidratos solubles en los entrenudos inferiores del tallo de distintos genotipos de trigo, con la excepción del último entrenudo del tallo en los que no varió significativamente. El aumento del contenido de carbohidratos solubles en agua en el último entrenudo del tallo con la limitación en la disponibilidad hídrica se acompañó de un incremento de los niveles de proteínas y aminoácidos (Tabla 4.13). Un aumento de la concentración de proteínas en el tallo se ha encontrado en plantas de *Lupinus albus* sometidas a sequía (Pinheiro *et al.*, 2001), lo que refuerza el papel que desempeña el tallo como reserva temporal de asimilados y la labor que ejerce en la estrategia de adaptación de las plantas a la sequía (Rodrigues *et al.*, 1995; Pinheiro *et al.*, 2001). Las plantas sometidas a estrés hídrico frecuentemente desarrollan ajuste osmótico por aumento del contenido de azúcares y aminoácidos (Plaut *et al.*, 2004). La mayor acumulación de fructanos inducida por la sequía se acompañó también de un incremento de la fracción de fructanos cualquiera que fuese su grado de polimerización con respecto a las plantas control (Tabla 4.11), en especial los fructanos de grado de polimerización medio que aumentaron un 54.2% con respecto a las plantas control, mientras que los fructanos de DP bajo y alto aumentaron en menor medida (41% y 33.3%, respectivamente). En consonancia con aquellos estudios que mostraron un descenso de la fracción de fructanos de DP alto en el tallo de plantas de cebada en comparación con la composición de fructanos en hojas en las que se indujo la biosíntesis de fructanos (Bancal *et al.*, 1992) y en el tallo de plantas de trigo (Ruuska *et al.*, 2008) y con la apreciación de un predominio de fructanos de DP 4–10 en los tallos de plantas de trigo (Wardlaw and Willenbrink, 1994).

Entre genotipos varió el patrón de acumulación de azúcares solubles, la línea 89 tuvo el mayor contenido de fructanos y carbohidratos solubles y la línea 76 el menor, y Harrington y la línea 8 tuvieron contenidos similares (Tabla 4.8). Los fructanos representaron el 52.7% y el 12.3% del total de carbohidratos solubles en las líneas 89 y 76, respectivamente, y un 24.2% y 30.7% en la línea 8 y el cv. Harrington, lo que sugiere una mayor partición del carbono hacia los fructanos en el último entrenudo del tallo en la línea 89. El contenido de glucosa de las líneas 8 y 89 fue mayor que el de la línea 76 y Harrington. La sequía redujo el contenido de fructosa del último entrenudo del tallo de la línea 89 (Fig. 4.9), posiblemente como consecuencia de una mayor biosíntesis de fructanos. En condiciones de control hídrico, el contenido de fructosa fue mayor en la línea 89 que en el resto de genotipos de cebada, y en la línea 8 mayor que en la línea 76. Sin embargo, en condiciones de déficit hídrico, las líneas 8 y 89 tuvieron un mayor contenido de fructosa que la línea 76 y el cv. Harrington (Fig. 4.9). Los mayores niveles de hexosas en las líneas 8 y 89 podrían relacionarse posiblemente con una mayor velocidad de importación de sacarosa o posiblemente con diferencias en la actividad invertasa y fructosiltransferasa en el tallo de estas líneas RCSL con respecto a los restantes genotipos de cebada (Esmailpour-Jahromi *et al.*, 2012). Se ha encontrado frecuentemente mayores niveles de hexosas en el tallo de plantas de trigo en condiciones de déficit hídrico, en congruencia con una mayor actividad invertasa ácida soluble (Joudi *et al.*, 2012), lo que contribuiría al ajuste osmótico y al mantenimiento de la turgencia celular como mecanismo de protección frente a la sequía (Trouverie *et al.*, 2003; Joudi *et al.*, 2012; Khoshro *et al.*, 2014). Estos resultados parecen mostrar una amplia variabilidad genotípica en el contenido de carbohidratos solubles en el último entrenudo del tallo en

el inicio del desarrollo del grano tanto en condiciones de amplia como escasa disponibilidad hídrica. El mayor contenido de carbohidratos solubles en agua lo tuvo la línea 89 y el menor la línea 76, mientras que la línea 8 y Harrington tuvieron contenidos similares (Tabla 4.8). En conformidad con otros estudios que mostraron que el contenido de WSC en el tallo depende del genotipo y el ambiente (Goggin and Setter, 2004; Ruuska *et al.*, 2006; Ehdai *et al.*, 2008; McIntyre *et al.*, 2011; Esmaeilpour-Jahromi *et al.*, 2012; Joudi *et al.*, 2012; Khoshro *et al.*, 2014).

El contenido de fructanos y carbohidratos solubles en el último entrenudo del tallo disminuyó notablemente en la línea 76 en comparación con la línea 89, al igual que las fracciones de fructanos agrupadas según el grado de polimerización, y en mayor extensión la fracción correspondiente a los fructanos de alto DP (Tabla 4.11). En un estudio comparativo entre dos genotipos de trigo, uno con alto (Westonia) y otro con bajo (Janz) contenido de WSC en el tallo, los niveles de cada uno de los fructanos separados según su grado de polimerización fueron sistemáticamente menores en Janz, y únicamente se detectaron trazas de fructanos de DP alto > 13 en comparación con Westonia (Ruuska *et al.*, 2006). La mayor concentración de fructanos se asoció con mayores proporciones de fructanos con alto grado de polimerización, un patrón similar al encontrado en este estudio entre las líneas que mostraron el mayor y menor contenido de WSC, líneas 89 y 76, y en algún otro (Wardlaw and Willenbrink, 2000; Ruuska *et al.*, 2008). En el inicio del desarrollo del grano, los fructanos que predominaron en el último entrenudo del tallo de las plantas de cebada fueron aquellos con DP de 6–10 y pudo observarse que las cantidades relativas de algunas de las fracciones de fructanos agrupadas según el DP en la línea 8 y el cv. Harrington fueron semejantes a las encontradas en la línea 76, aunque variaron cuantitativamente con respecto a la línea 89 (Tabla 4.11). La apreciación de perfiles similares en la composición de fructanos entre los genotipos sugiere que la biosíntesis de los polímeros de fructosa tuvo lugar por un mecanismo secuencial semejante, por el que la formación de fructanos de mayor DP depende de componentes de menor DP que aumentan gradualmente el grado de polimerización en cada genotipo. En cereales, la síntesis de fructanos del tipo gramíneas a partir de la sacarosa en la vacuola involucra la actividad de varias fructosiltransferasas, la 1-SST, 6-SFT, 1-FFT, junto a la actividad de las enzimas involucradas en la hidrólisis de dichos carbohidratos, las fructano exohidrolasas (Vijn and Smeekens, 1999; Van den Ende *et al.*, 2003). En el tallo de plantas de trigo se ha propuesto que la acumulación de fructanos comporta la incorporación de residuos fructosilos vía uniones $\beta(2-6)$, que conducen a un incremento gradual del grado de polimerización, con ramificaciones con uniones $\beta(2-1)$. Las uniones $\beta(2-6)$ de los fructanos son generadas por la acción consecutiva de las enzimas 1-SST y 6-SFT (Chalmers *et al.*, 2005) y las uniones $\beta(2-1)$ por la actividad de las enzimas 1-SST y 1-FFT (Xue *et al.*, 2008b). El predominio de uniones $\beta(2-6)$ en los polímeros de fructosa del tallo parece relacionarse con la degradación de las ramificaciones por la acción simultánea de las fructano exohidrolasas durante la biosíntesis de fructanos (Van den Ende *et al.*, 2003). En nuestro estudio, los perfiles de la composición de fructanos son similares a aquellos previamente mostrados en los tallos de trigo, consistentes con dicho mecanismo de síntesis (Bancal and Triboi, 1993; Ruuska *et al.*, 2006; 2008). Esto sugiere que las diferencias genotípicas en la composición de fructanos según su grado de polimerización podrían depender posiblemente de la disponibilidad de sacarosa para la acumulación de reservas y de su capacidad de transformación, de acuerdo con las apreciaciones indicadas por (Ruuska *et al.*, 2006).

Xue *et al.* (2008b) asociaron las diferencias genotípicas en la acumulación de WSC en el tallo con la regulación diferencial de algunos genes del metabolismo de los carbohidratos a nivel transcripcional. El análisis comparativo a nivel molecular, por técnicas de expresión génica global, de genotipos de trigo con diferente contenido de WSC en el tallo mostró una fuerte correlación positiva

entre el nivel de expresión de genes que codifican las fructosiltransferasas y el contenido de fructanos y carbohidratos solubles en agua en el tallo, y una correlación negativa entre los niveles de transcritos de genes involucrados en la hidrólisis de sacarosa y la concentración de WSC. Además, se observó un descenso de transcritos de genes que codifican proteínas involucradas en la desviación de la UDP-glucosa a la síntesis de pared celular, que se acompañó de una disminución del contenido de polisacáridos de pared celular en el tallo, principalmente hemicelulosas. Por lo que el alto contenido de WSC en el tallo se relacionó con una mayor acumulación de fructanos, una reducción de la hidrólisis de sacarosa y una menor partición del carbono a los polisacáridos de pared celular. Y se observó también un descenso de transcritos de los genes que codifican la fructoquinasa y la piruvato deshidrogenasa, indicativo de una disminución del flujo del carbono al ciclo de los ácidos tricarbónicos, lo que podría contribuir positivamente a la acumulación de carbohidratos solubles en el tallo. Con posterioridad, Khoshro *et al.* (2014) mostraron también un aumento de expresión de algunos de los genes que codifican fructosiltransferasas, la 1-SST y la 6-SFT, en los diferentes entrenudos del tallo de cultivares de trigo con un alto contenido de fructanos con respecto a aquellos con un menor contenido, en consonancia con los resultados de Xue *et al.* (2008b). En ambos estudios, la fuerte correlación positiva entre la expresión génica de la 1-SST y la 6-SFT y las concentraciones de WSC del tallo sugiere que ambas enzimas están relacionadas con la variación genotípica en la acumulación de fructanos (Xue *et al.*, 2008b; Khoshro *et al.*, 2014) y evidencia el predominio de fructanos con uniones $\beta(2-6)$ en los tallos (Carpita *et al.*, 1991; Bancal *et al.*, 1992; Bancal and Triboi, 1993), que se engloban en la fracción de fructanos de DP medio, como podría también inferirse en nuestro estudio con cebada.

Por otra parte, se ha mostrado que la asimilación del nitrógeno en aminoácidos es un importante factor que influye en los niveles de carbohidratos solubles en agua en los tallos de cereales. McIntyre *et al.* (2011) observaron una represión de genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de aminoácidos, como la fenilalanina, metionina, serina y glicina, y proteínas, junto a una inducción de algunos genes que codifican enzimas involucradas en la degradación de proteínas, como las proteasas, proteínas quinasas y peptidasas, en genotipos de trigo con un alto contenido de WSC en el tallo. Un incremento de transcritos para varias proteínas quinasas y proteasas en plantas de trigo deficientes en nitrógeno fue también encontrado por Ruuska *et al.* (2008). Por lo que McIntyre *et al.* (2011) relacionaron, las observaciones antes indicadas, con una menor concentración de nitrógeno expresado en materia seca en las líneas con un alto contenido de WSC en el tallo con respecto a aquellas con un bajo contenido de WSC, de acuerdo con algún otro estudio (Van Herwaarden *et al.*, 1998; Ruuska *et al.*, 2008). Lo cual podría reflejar una relación inversa entre WSC y anabolismo del nitrógeno en los tallos del trigo alrededor de la antesis, y sugiere que la asimilación del nitrógeno en aminoácidos controla los niveles de carbohidratos solubles en agua en los tallos (McIntyre *et al.*, 2011). En sintonía con dichas argumentaciones, en la línea 76, el genotipo que tuvo el menor contenido de WSC (Tabla 4.8), el contenido de proteínas en el último entrenudo del tallo aumentó en comparación con los otros genotipos de cebada, aunque con respecto a la línea 8 estuvo próximo a la significación (Tabla 4.13). Por lo que la eficiente translocación del nitrógeno al grano en las líneas con alto contenido de carbohidratos tuvo lugar por removilización de proteínas, en sintonía con las apreciaciones previas de Ruuska *et al.* (2008). Además, dada la estrecha interrelación entre el metabolismo del C y N en plantas, cabe resaltar que la sacarosa es no sólo el sustrato para la síntesis de fructanos sino que también actúa como inductor de la actividad y la expresión de las fructosiltransferasas (Pollock and Cairns, 1991; Müller *et al.*, 2000). Y por su parte, el nitrato es no sólo el sustrato en la asimilación de nitrógeno en plantas sino que también actúa como molécula señal que regula la expresión de genes involucrados en el metabolismo del C y N (Scheible *et al.*,

2004). En hojas de cebada, el nitrato condujo a un descenso del contenido de fructanos y de la proteína 6-SFT, y no alteró los niveles de sacarosa y otros carbohidratos, indicativo de que el nitrato, y no metabolitos posteriores en la ruta de asimilación de nitrógeno, es una señal negativa para la expresión de la 6-SFT, independiente de la señalización positiva mediada por carbohidratos (Morcuende *et al.*, 2004). En plantas deficientes en nitrógeno, el aumento de fructanos se relacionó con una inducción de la expresión de la 6-SFT (Wang *et al.*, 2000). Y se ha mostrado que la acumulación de fructanos en los tallos de plantas de trigo deficientes en nitrógeno se acompañó de un incremento de transcritos de los genes que codifican las fructosiltransferasas, mientras que los transcritos de las fructano exohidrolasas no variaron (Ruuska *et al.*, 2008). En nuestro estudio, la línea 76 mostró un mayor contenido de proteínas, por lo que previsiblemente podría también tener un mayor contenido de nitrato que los demás genotipos, lo que podría inducir un descenso de la expresión de al menos una de las fructosiltransferasas, la 6-SFT, conduciendo a una menor acumulación de fructanos y, por tanto, también de WSC, en conformidad con nuestros resultados y con los estudios previos antes indicados.

En el **estadio de grano lechoso tardío**, el contenido de carbohidratos solubles en agua en el último entrenudo del tallo de las plantas de cebada aumentó tanto con amplia como con escasa disponibilidad hídrica del suelo con respecto a los niveles observados al inicio del llenado del grano (Tabla 4.9). El aumento del contenido de sacarosa pudo derivar posiblemente del incremento de la provisión de fotoasimilados al tallo como consecuencia del mantenimiento de la fotosíntesis y el incremento de la demanda de carbono de otros órganos y/o el aumento de la exportación de los entrenudos inferiores del tallo, lo que pudo facilitar la acumulación de fructanos, al igual que ocurrió en las hojas (Tabla 4.5). Una cierta concentración umbral de sacarosa induce la síntesis de fructanos, como se anticipó con anterioridad, la cual parece ser específica de la especie y del tipo de tejido vegetal como indicó Ritsema *et al.* (2009). Los niveles de hexosas, glucosa y fructosa, disminuyeron con respecto a los niveles observados al inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.9, Tabla 4.8), lo que sugiere que estos azúcares fueron metabolizados, y bien fueron exportados al grano en desarrollo, presumiblemente como sacarosa, o bien fueron utilizados en la síntesis de sacarosa y fructanos, almacenándose temporalmente en el tallo. La mayor acumulación de fructanos se acompañó de un importante incremento de las fracciones de fructanos cualquiera que fuese su grado de polimerización (Tabla 4.11), particularmente aquellos que parecen ser los mayoritarios en tallos, los de grado de polimerización medio (Carpita *et al.*, 1991; Bancal *et al.*, 1992). Además, el déficit hídrico condujo a un incremento de sacarosa y carbohidratos solubles en agua, y a un aumento próximo a la significación de fructanos (Tabla 4.9). Goggin and Setter (2004) en un estudio con tres cultivares de trigo en dos ambientes con diferente disponibilidad hídrica también encontraron una mayor acumulación de carbohidratos en el tallo de las plantas de trigo en el ambiente de escasa disponibilidad hídrica. En esta fase del desarrollo, el contenido de sacarosa en el último entrenudo del tallo fue mayor en el cv. Harrington y la línea 89 que en la línea 76 (Tabla 4.9), indicativo de una mayor partición del carbono hacia la sacarosa en el último entrenudo del tallo en los dos primeros genotipos en los que el efecto del déficit hídrico en la fotosíntesis fue más atenuado (Fig. 4.3a). En las líneas 76 y 8, genotipos en los que el efecto de la sequía en la fotosíntesis fue más acusado, el déficit hídrico condujo, con respecto a las plantas control, a una mayor acumulación de almidón y de hexosas (Fig. 4.10), y a un aumento de las fracciones de fructanos de DP bajo y alto únicamente en la línea 76 (Fig. 4.12), como consecuencia posiblemente de una limitación en la demanda de los colectores de asimilados en plantas con escasa disponibilidad hídrica. El contenido de fructanos y la fracción de fructanos de DP medio aumentó en la línea 89 en comparación con las otras líneas RCSL y el cv. Harrington (Tabla 4.9, Tabla 4.11), de acuerdo con una inducción de la síntesis de fructanos.

Además, el contenido de almidón en plantas de control hídrico fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, aunque con déficit hídrico únicamente aumentó con respecto a Harrington (Fig. 4.10c). Estos resultados parecen confirmar la mayor capacidad de acumulación de asimilados en el tallo de la línea 89, y reflejan que en esta fase del desarrollo alcanzó el máximo contenido de carbohidratos en el último entrenudo del tallo (Fig. 4.10c). En relación con los compuestos nitrogenados, el contenido de proteínas disminuyó un 9.5% con respecto a la anterior fase del desarrollo en plantas con escasa disponibilidad hídrica, mientras que en plantas de control hídrico apenas varió el contenido proteico del último entrenudo del tallo (Tabla 4.13). Esto sugiere que la sequía posiblemente indujo una importante removilización de nitrógeno al grano desde las reservas almacenadas en órganos vegetativos, y la translocación del nitrógeno fue mayor en la línea 89 que en ningún otro genotipo, ya que mostró una mayor pérdida de proteínas con respecto al inicio del desarrollo del grano.

En el **estadio de grano pastoso temprano**, con la progresión de la senescencia foliar y la mayor limitación de la fotosíntesis, el contenido de sacarosa, fructanos y el total de carbohidratos solubles disminuyó, con ambos niveles de disponibilidad hídrica en el suelo, en comparación con el estadio de grano lechoso tardío (Tabla 4.10, Tabla 4.9). El descenso de fructanos en etapas avanzadas de la post-antesis de la cebada se acompañó de una disminución generalizada de las fracciones de fructanos cualquiera que fuera su grado de polimerización, principalmente aquellas de grado de polimerización medio (Tabla 4.11). Schnyder (1993) propuso que la pérdida de fructanos del tallo requiere la inducción de las fructano exohidrolasas. El tallo de los cereales contiene fructanos con uniones $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$, y la hidrólisis de los fructanos requiere la acción combinada de la fructano 1-exohidrolasa y 6-exohidrolasa, 1-FEH y 6-FEH (Van den Ende *et al.*, 2005; Joudi *et al.*, 2012). En un estudio con trigo en etapas avanzadas del desarrollo del grano se ha observado un aumento de la actividad fructano exohidrolasa, junto a un aumento de la razón fructosa/glucosa y a una disminución de la concentración de fructanos en el tallo (Van den Ende *et al.*, 2003). El drástico descenso del contenido de carbohidratos solubles en agua en la línea 89 sugiere una inducción de la removilización de las reservas de carbono (Tabla 4.10). Del mismo modo, el importante descenso de los niveles de almidón en la línea 89 en comparación con el resto de genotipos parece indicar que fue hidrolizado a glucosa. El aumento de la razón fructosa/glucosa en la línea 89 (1.47, 2.38, 1.19, 3.87 en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente, lsd 0.651) podría explicarse por la acumulación de fructosa como consecuencia de la hidrólisis de fructanos por las fructano exohidrolasas (Van den Ende *et al.*, 2003; Morcuende *et al.*, 2004; Joudi *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren un aumento de la degradación de los fructanos almacenados en el último entrenudo del tallo en dicho genotipo para mantener la exportación de sacarosa al grano en crecimiento (Van den Ende *et al.*, 2003; Joudi *et al.*, 2012). Además, el descenso del contenido de fructanos en la línea 89 se acompañó de una disminución de la sacarosa y de la fracción de fructanos de bajo DP con respecto a los demás genotipos (Tabla 4.10, Tabla 4.11) y, en condiciones de escasa disponibilidad hídrica, de los fructanos de grado de polimerización medio y alto (Fig. 4.13). Lo cual parece indicar que la contribución de los fructanos del último entrenudo del tallo al llenado del grano fue posiblemente mayor en condiciones de escasa disponibilidad hídrica. En la línea 89 no sólo aumentó la removilización de carbono sino también de nitrógeno, como puede inferirse por el descenso de proteínas con respecto al estadio de grano lechoso tardío, que se estimó en un 39.8% (Tabla 4.13). Esto condujo a que fuese el genotipo que tuviera el menor contenido de proteínas en el último entrenudo del tallo en esta fase del desarrollo. La mayor utilización de las reservas de almacenaje en la línea 89 contrasta con la inducción de la biosíntesis de fructanos en el cv. Harrington y la línea 76 con respecto a las etapas más tempranas de la post-antesis de la cebada (Tabla 4.10). Harrington tuvo, en comparación con el resto de genotipos,

el mayor contenido de fructanos y carbohidratos solubles en agua en condiciones de control hídrico (Fig. 4.11), posiblemente como consecuencia de una menor disminución de la fotosíntesis. En condiciones de escasa disponibilidad hídrica, la fotosíntesis pudo estar más limitada y, por ello, el contenido de WSC y de fructanos tendió a disminuir, lo que condujo a un ligero descenso de las fracciones de fructanos de DP medio y alto con respecto a las plantas control (Fig. 4.13). En las líneas 8 y 76, por el contrario, la sequía indujo la acumulación de fructanos (Fig. 4.11), que se acompañó de un aumento de aquellos de DP alto y tendieron a aumentar los de DP medio (Fig. 4.13), en conformidad con el papel de los fructanos en conferir tolerancia a la sequía (Volaire and Lelièvre, 1997). La mayor acumulación de fructanos en estas dos líneas RCSL en condiciones de sequía podría derivarse de una menor demanda de los colectores de asimilados, o bien de una mayor removilización de carbono de los entrenudos inferiores. Aún a pesar de que no se ha determinado el contenido de carbohidratos en el resto del tallo, podría ser posible, puesto que el efecto de la sequía en la fotosíntesis en el estadio de grano lechoso tardío fue más acusado que en Harrington y la línea 89.

En conjunto, los resultados muestran una elevada variabilidad en la capacidad de acumulación de reservas en el tallo y su utilización entre las líneas recombinantes y el cv. Harrington durante la post-antesis, de acuerdo con estudios previos (Ehdaie *et al.*, 2006b; Ruuska *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2009; Joudi *et al.*, 2012).

5.1.3.- El déficit hídrico afecta al crecimiento del tallo principal durante la post-antesis de la cebada.

5.1.3.1.- Crecimiento en el inicio del desarrollo del grano.

El crecimiento celular es uno de los procesos fisiológicos más sensibles a la sequía (Taiz and Zeiger, 2006b). El crecimiento está intrínsecamente relacionado con la transpiración, de manera que cualquier factor que disminuya la transpiración puede potencialmente reducir la acumulación de biomasa de las plantas (Davies and Wilkinson, 2012). La sequía induce el cierre de los estomas para preservar la pérdida de agua por transpiración y mantener la turgencia celular (Chaves, 1991), lo cual puede limitar la fotosíntesis y la producción de fotoasimilados y, finalmente, la acumulación de biomasa (Bhargava and Sawant, 2013). Entre las respuestas más tempranas de las plantas al déficit hídrico se encuentra la reducción de la expansión foliar y del desarrollo de la parte aérea de la planta (Tardieu *et al.*, 2000). Dicha limitación se relaciona con un descenso de la turgencia celular (Benešová *et al.*, 2012) por inhibición del flujo de agua desde el xilema a los alrededores de las células en crecimiento (Nonami, 1998), disminuyendo el volumen celular y la turgencia de la célula. El metabolismo de las plantas depende del contenido hídrico de las hojas (Sinclair and Ludlow, 1985), y para evaluar el estado hídrico y la turgencia de las plantas se utiliza frecuentemente el contenido hídrico relativo foliar (Teulat *et al.*, 2001), que además se considera un indicador del volumen celular (Teulat *et al.*, 2003). La limitación en la disponibilidad hídrica no modificó el contenido hídrico relativo de las hojas, bandera y penúltima, en el estadio correspondiente al inicio del desarrollo del grano (Fig. 4.14). Resultados similares a los obtenidos en nuestros estudios previos sobre el efecto de la sequía terminal en la hoja bandera de un grupo de 80 líneas RCSL de cebada cultivadas en el campo (Del Pozo *et al.*, 2012) y aquellos con trigo crecido en el campo y en invernadero con diferentes regímenes hídricos durante la fase de ahijamiento de las plantas (Blum *et al.*, 1990). El RWC fue mayor en la línea 89 y el cv. Harrington que en la línea 76 (Fig. 4.14), lo que

evidencia la existencia de cierta variabilidad genotípica en el RWC en nuestras condiciones experimentales. En un estudio con cebada cultivada en cinco ambientes Mediterráneos, áridos y semiáridos, en los que la pluviosidad osciló entre 255–458 mm, el RWC fue significativamente diferente entre los genotipos en tres de los cinco ambientes estudiados (Teulat *et al.*, 2003), al igual que en nuestro experimento de campo con un amplio grupo de líneas RCSL de cebada (Del Pozo *et al.*, 2012). El contenido hídrico relativo foliar se ha propuesto como una característica para la selección de genotipos tolerantes a la sequía (Teulat *et al.*, 2001), por lo que en base a este criterio la línea 89 y el cv. Harrington podrían considerarse más tolerantes a la sequía que las otras líneas RCSL. En esta etapa temprana del desarrollo del grano, el contenido foliar de carbohidratos solubles en agua en la línea 89 y el cv. Harrington tendió a aumentar con respecto a las otras líneas RCSL (Tabla 4.4), y se ha propuesto que los genotipos tolerantes al déficit hídrico acumulan más carbohidratos solubles que los sensibles (Volaire and Lelièvre, 1997). La mayor acumulación de solutos osmóticamente activos muy posiblemente pudo facilitar el mantenimiento de la turgencia celular por ajuste osmótico en dichos genotipos (Teulat *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999; Hamidou *et al.*, 2007) y limitar los efectos adversos del estrés hídrico en la fotosíntesis y el crecimiento (Tahara *et al.*, 1990). La limitación en la disponibilidad hídrica del suelo no sólo no modificó el RWC de las hojas, sino que tampoco alteró su superficie verde (Tabla 4.14) y el área específica foliar (SLA, 126 y 127 cm²·g⁻¹ en plantas control y sequía, respectivamente), aunque redujo su peso seco (Tabla 4.16). La carencia de efecto de la sequía en el área específica foliar contrasta con la reducción inducida por la sequía en plantas de cebada cultivadas en el campo (Del Pozo *et al.*, 2012) y en condiciones de invernadero (Chen *et al.*, 2010). No obstante, se encontró cierta variabilidad genotípica en dicho parámetro, puesto que el área específica foliar fue mayor en el cv. Harrington y las líneas 8 y 76 que en la línea 89 (131.2, 130.1, 136.4, 109.3 cm²·g⁻¹ en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente, $P < 0.001$), en conformidad con estudios previos reportados por Giunta *et al.* (2002) y Del Pozo *et al.* (2012). Un mayor SLA se ha relacionado con una mayor eficiencia en el uso del nitrógeno fotosintético (Poorter and Evans, 1998). La variabilidad genotípica también se observó en los otros dos parámetros foliares evaluados, ya que tanto la superficie verde como el peso seco foliar aumentaron en la línea 8 y el cv. Harrington en comparación con las líneas 76 y 89 (Tabla 4.14, Tabla 4.16), y a su vez el peso seco foliar fue mayor en la línea 89 que en la 76 (Tabla 4.16), como consecuencia posiblemente de la mayor acumulación de carbohidratos (Tabla 4.4).

Aun cuando el déficit hídrico no tuvo efecto en el área verde de las hojas bandera y penúltima, sí que redujo la superficie verde del resto de hojas del tallo principal en las líneas RCSL y tendió a hacerlo en el cv. Harrington (Fig. 4.15b). Esto sugiere que la sequía moderada de larga duración muy posiblemente indujo un ajuste del área foliar a nivel del tallo principal y redujo la expansión foliar de las hojas inferiores del tallo principal, de mayor tamaño que las hojas más jóvenes, bandera y penúltima, de mucho menor tamaño, fotosintéticamente más activas y, por tanto, principales exportadoras de fotoasimilados en la fase reproductiva de las plantas de cebada. Son varios los estudios que indican que la expansión foliar es fuertemente reducida por una limitación en la disponibilidad hídrica (Hummel *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2011) y que han mostrado evidencias de la elevada susceptibilidad de la expansión de las hojas al déficit hídrico (Schonfeld *et al.*, 1988; Teulat *et al.*, 1997; Tardieu *et al.*, 2000). Se ha propuesto que la reducción de la dimensión del follaje podría disminuir el área de transpiración, lo que evitaría la pérdida de agua y podría contribuir al mantenimiento de la turgencia celular (Chaves and Oliveira, 2004; Farooq *et al.*, 2009). En nuestro experimento, el porcentaje de humedad de las hojas y del resto de hojas no varió entre los genotipos de cebada (Tabla 4.15), posiblemente la modificación de la superficie de las hojas del tallo principal pudo facilitar el mantenimiento de un estado hídrico similar. Los resultados podrían revelar una

posible estrategia de adaptación del crecimiento y la turgencia de las células para mantener el estado hídrico de las hojas (Munns *et al.*, 2000) por descenso del área de evapotranspiración (Rizza *et al.*, 2004). Se ha descrito que en plantas expuestas a estrés hídrico la reducción del área foliar en el dosel vegetal disminuye el consumo de agua después de la anthesis y limita el impacto negativo previsible de la sequía en el índice de cosecha y el rendimiento de grano (Richards and Townley-Smith, 1987). Además, Yang *et al.* (2000) propusieron que el llenado del grano está estrechamente unido al proceso de senescencia a nivel de planta entera, y que el estrés hídrico durante el llenado del grano induce la senescencia temprana de la planta (Plaut *et al.*, 2004). En este estudio, la reducción de la superficie verde del resto de hojas inducida por la sequía pudo derivarse de una aceleración de la senescencia con respecto a las plantas de control hídrico.

Con relación a los parámetros de crecimiento de otras partes importantes del tallo principal durante la fase reproductiva de la cebada, como son la espiga y el último entrenudo del tallo, el déficit hídrico redujo el peso de la espiga y no modificó la superficie verde del último entrenudo del tallo, aunque el peso de esta fracción del tallo y el área verde de la espiga variaron entre los genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.16, Tabla 4.14). En la línea 76, la superficie verde del último entrenudo del tallo fue menor que la de los demás genotipos (Tabla 4.14), y el peso seco de dicha fracción del tallo, con ambos niveles de disponibilidad hídrica, disminuyó en comparación con las otras líneas RCSL y el cv. Harrington (Fig. 4.16b). Sin embargo, su longitud fue similar a la del cv. Harrington, y mayor a su vez que la de la línea 8, aunque menor que la de la línea 89 (Tabla 4.17). Estos resultados sugieren que el último entrenudo del tallo de la línea 76 tuvo un menor diámetro que el del resto de genotipos. Además, en esta línea 76, la superficie verde de la espiga, con ambos niveles de disponibilidad hídrica, fue menor que en los otros genotipos (Fig. 4.15a), y el peso de la espiga también disminuyó en comparación con las otras líneas RCSL y tendió a disminuir con respecto al cv. Harrington (Tabla 4.16). En Harrington y las líneas 8 y 89, la superficie verde del último entrenudo del tallo fue similar (Tabla 4.14), pero la longitud de dicha fracción del tallo aumentó en la línea 89 en comparación con dichos genotipos (Tabla 4.17). Mientras que el peso seco, con ambos niveles de disponibilidad hídrica, fue también mayor que en Harrington y la línea 8, con valores similares entre ellos (Fig. 4.16b), al igual que la superficie verde de la espiga (Fig. 4.15a), aún a pesar de que el déficit hídrico redujo ambos parámetros en la línea 89. El efecto de la sequía tanto en el peso del último entrenudo del tallo como en el área verde de la espiga de la línea 89 fue similar, ya que redujo, con respecto a las plantas de control hídrico, el peso seco del último entrenudo del tallo un 26.2% (0.332 y 0.245 g del último entrenudo del tallo en plantas control y sequía, respectivamente, Fig. 4.16b) y la superficie verde de la espiga un 25.7% (46.82 y 34.77 cm² de la espiga en plantas control y sequía, respectivamente, Fig. 4.15a), mientras que el peso de la espiga fue también mayor en la línea 89 que en los demás genotipos (Tabla 4.16). Estudios previos con trigo han mostrado que la sequía antes de la anthesis influye en el tamaño de las espigas (Ehdaie *et al.*, 2008), de acuerdo con las variaciones observadas en la superficie verde de la espiga en la línea 89. Estos resultados parecen indicar cierta relación entre el peso seco del último entrenudo del tallo y la superficie verde de la espiga (Fig. 4.16b, Fig. 4.15a) en este estadio del desarrollo de las plantas de cebada, puesto que la pauta de cambio de ambos parámetros fue similar para los distintos genotipos con la disponibilidad hídrica (Fig. 4.16b, Fig. 4.15a). Y el descenso del peso seco del último entrenudo del tallo y del área verde de la espiga en la línea 89 inducido por la sequía muy posiblemente pudo derivarse de la aceleración del crecimiento con respecto a los demás genotipos, ya que en la madurez se observó un descenso del peso de dicha fracción del tallo en todos ellos (Fig. 4.19b), más acusado aún en la línea 89 en la que dicho efecto se observó en esta etapa más temprana del desarrollo. En conformidad con estos resultados, se ha mostrado que los efectos del déficit hídrico en

el crecimiento de los distintos órganos de la planta dependen del genotipo y de la etapa de desarrollo del cultivo (González *et al.*, 2008), y que los diferentes órganos o tejidos durante el crecimiento responden específicamente y de forma dinámica a la sequía (Claeys and Inzé, 2013).

En las líneas 76 y 89, genotipos en los que la sequía redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, el área verde del resto de hojas más intensamente, un 65.2% y 63.4%, respectivamente (Fig. 4.15b), la superficie verde del tallo principal fue también disminuida (Fig. 4.15e), más aún en la línea 89 como consecuencia del descenso del área verde de la espiga y del resto del tallo (Fig. 4.15a, Fig. 4.15c). En la línea 8 y el cv. Harrington, genotipos en los que el área verde del resto de hojas fue afectado por la sequía más levemente que en las otras líneas RCSL, un 33.3% y 21.5%, respectivamente (Fig. 4.15b), la superficie verde del tallo principal no fue modificada por la sequía con respecto a las plantas de control hídrico (Fig. 4.15e). Un patrón de cambios bastante similar se observó en los pesos, ya que la sequía redujo el peso seco del resto de las hojas en las líneas 76 y 89 (Fig. 4.16a), más aún en esta última línea RCSL, y el peso del tallo principal en la línea 89, y tendió a disminuirlo en la línea 76 (Fig. 4.16e). La reducción tan notable del peso seco del tallo principal de la línea 89, inducida por la sequía, se atribuyó no sólo a la pérdida de peso del resto de las hojas sino también de la fracción tallo, por descensos del peso del último entrenudo y del resto del tallo, más acentuado el de este último (Fig. 4.16d, Fig. 4.16b, Fig. 4.16c). En la línea 89, el porcentaje de humedad de las partes en las que fue dividido el tallo principal de la planta, con la excepción de las hojas, fue menor que en los otros genotipos (Tabla 4.15), si bien mostró un contenido hídrico relativo elevado, lo que indica una mayor capacidad de ajuste osmótico por acumulación de carbohidratos solubles en agua y posiblemente de otros solutos osmóticamente activos, los cuales podrían contribuir al mantenimiento de la integridad celular y a la protección de membranas (Blum, 2005; Sanders and Arndt, 2012) y conferir tolerancia a la sequía (Arnau *et al.*, 1998). En conjunto, estos resultados muestran una amplia variabilidad genotípica en la acumulación de biomasa en el tallo principal en respuesta a la sequía y parecen indicar que los genotipos con una mayor superficie verde del resto de las hojas del tallo principal en condiciones de control hídrico fueron más susceptibles a una reducción de la expansión foliar y de la acumulación de biomasa inducida por la sequía. Sería plausible suponer que la imposición del déficit hídrico pudo inducir una acusada limitación en la expansión foliar con la progresión del desarrollo del tallo principal, lo cual no sólo limitaría la transpiración sino que dificultaría posiblemente la interceptación de la radiación solar durante el periodo de crecimiento (Pereira and Chaves, 1993), lo que se traduciría en una menor acumulación de biomasa a nivel del tallo principal. Teulat *et al.* (1997) en ensayos realizados con una población de líneas recombinantes puras (RIL) sometidas a estrés hídrico en etapas tempranas del desarrollo observaron una disminución del RWC y de los parámetros de crecimiento, y en otros estudios con cereales (Schonfeld *et al.*, 1988), leguminosas (Lecoeur *et al.*, 1995) y *Arabidopsis* (Hummel *et al.*, 2010) se ha encontrado también una reducción del crecimiento con la sequía.

En cereales, los tallos son el principal órgano de almacenaje de carbohidratos (Bonnett and Incoll, 1992; Blum *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2013; Noorka and Noorka, 2013) y las reservas acumuladas en el tallo pueden contribuir al desarrollo y llenado del grano, particularmente bajo condiciones ambientales adversas como la sequía (Schnyder, 1993; Wardlaw and Willenbrink, 1994). La acumulación y removilización de reservas en el tallo puede estimarse por monitorización de los cambios en el peso seco del tallo durante el periodo de llenado del grano (Hunt, 1979; Borrell *et al.*, 1993; Cruz-Aguado *et al.*, 2000; Ehdai *et al.*, 2006a), lo que constituye una estimación indirecta a la determinación exacta del contenido de carbohidratos solubles en agua en el tallo directamente,

mucho más precisa. En plantas de trigo se ha mostrado que la capacidad de acumulación potencial de reservas en el tallo y su posterior movilización dependen de la longitud y del peso específico (proporción de peso seco/longitud) del tallo (Ehdaie *et al.*, 2008). Por ello, en esta etapa del desarrollo del grano se evaluaron varias características, tales como longitud, peso y peso específico, en las partes en las que se dividió la fracción tallo del tallo principal, último entrenudo y resto del tallo y en el total de la fracción tallo, de los distintos genotipos con ambos niveles de disponibilidad hídrica. La sequía redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, la longitud del último entrenudo del tallo un 3.7% (Tabla 4.17). La longitud del último entrenudo del tallo fue mayor en la línea 89 que en los otros genotipos de cebada, y mayor en el cv. Harrington y la línea 76 que en la línea 8 (Tabla 4.17), lo que indica que la longitud del último entrenudo del tallo fue mayor en el genotipo que tuvo la mayor longitud del total del tallo o una mayor altura de planta. En la línea 89, el déficit hídrico redujo el peso específico del último entrenudo del tallo un 22.6% (13.93 y 10.78 mg·cm⁻¹ en plantas control y sequía, respectivamente, Fig. 4.18a), atribuible al descenso del peso de dicha fracción del tallo inducido por la sequía, anteriormente indicado, que se estimó en un 26.2% (0.332 y 0.245 g en plantas control y sequía, respectivamente, Fig. 4.16b). El peso específico del último entrenudo del tallo varió entre genotipos con la disponibilidad hídrica (Fig. 4.18a). Así, en control hídrico el mayor peso específico lo tuvo la línea 89 y el menor la línea 76, y el de Harrington y la línea 8 fue similar, pero la sequía disminuyó el peso específico en la línea 89 hasta el punto de que las diferencias entre genotipos se atenuaron, excepto por el valor todavía menor en la línea 76 (Fig. 4.18a). Blum *et al.* (1997) propusieron que el almacenaje de reservas aumenta en tallos más largos y con mayor peso específico. En conformidad con dichas apreciaciones, la línea 89 tuvo una mayor longitud y contenido de carbohidratos solubles en agua en el último entrenudo del tallo que los demás genotipos (Tabla 4.8), y un mayor peso específico con respecto a la línea 76 con ambos niveles de disponibilidad hídrica, no así con respecto a Harrington y la línea 8 que únicamente tuvo lugar en plantas de control hídrico (Fig. 4.18a). No obstante, el peso de dicha fracción del tallo sí que aumentó en la línea 89 en comparación con Harrington y la línea 8 en plantas control y en déficit (Fig. 4.16b). Por el contrario, la línea 76 tuvo el menor peso y peso específico del último entrenudo del tallo, independientemente del nivel de disponibilidad hídrica (Fig. 4.16b, Fig. 4.18a), y el menor contenido de carbohidratos solubles en agua (Tabla 4.8). En relación con la propuesta de Blum *et al.* (1997), la línea 76 concuerda en lo relacionado con el peso específico y difiere en la característica relacionada con la longitud, ya que la longitud del último entrenudo del tallo en la línea 76 no fue la menor (Tabla 4.17). Estudios previos de Blum *et al.* (1994) presentaron evidencias de la existencia de una buena asociación entre el peso seco y el contenido de carbohidratos solubles del tallo entre genotipos, tratamientos y muestreos, y propusieron que las variaciones en el peso seco del tallo después de la antesis reflejarían las variaciones en el contenido de carbohidratos solubles en el tallo de las plantas de trigo. En conformidad con el menor peso seco y contenido de carbohidratos solubles encontrado en el último entrenudo del tallo de la línea 76 (Fig. 4.16b, Tabla 4.8), y de modo similar, con el mayor peso y contenido de carbohidratos solubles en dicha fracción del tallo en la línea 89 (Fig. 4.16b, Tabla 4.8). Además, el mayor peso seco de la espiga lo tuvo la línea 89 y la línea 76 el menor (Tabla 4.16), de acuerdo con la propuesta de que el peso de las espigas fue mayor en genotipos de trigo con alto contenido de carbohidratos solubles que en aquellos con un menor contenido (Dreccer *et al.*, 2009).

La longitud del resto del tallo, la otra parte en la que se dividió la fracción tallo del tallo principal, no varió con la disponibilidad hídrica en Harrington y las líneas 8 y 76 (Fig. 4.17a), al igual que la longitud del total del tallo (Fig. 4.17b). Sin embargo, el déficit hídrico redujo, con respecto a las plantas de control hídrico, la longitud del resto y del total del tallo en la línea 89, un 33.6% (54.80 y 36.40 cm en plantas control y sequía, Fig. 4.17a) y 24.8% (78.67 y 59.13 cm en plantas control y

sequía, Fig. 4.17b), respectivamente. Estos resultados sugieren que el resto del tallo fue más susceptible a la sequía que el último entrenudo del tallo en la línea 89, condicionando la altura de la planta y alterando la contribución de las distintas fracciones a la longitud total del tallo según la disponibilidad hídrica en dicha línea RCL. Por ello, la contribución de la longitud de cada uno de los segmentos en los que se dividió la fracción tallo del tallo principal a la longitud total del tallo fue similar con la disponibilidad hídrica en el cv Harrington y las líneas 8 y 76, estimándose, como promedio, la contribución de la longitud del último entrenudo y del resto del tallo a la longitud total en un 42.4% y 57.6% en Harrington, un 52.3% y 47.7% en la línea 76, y un 41.7% y 58.3% en la línea 8, respectivamente (Tabla 4.17). Sin embargo, en la línea 89 varió con la disponibilidad hídrica, mientras que en condiciones de control hídrico, la contribución del último entrenudo del tallo a la longitud total fue de un 30.3% (23.87 y 78.67 cm, longitud del último entrenudo y del total del tallo, respectivamente) y del resto del tallo un 69.7% (54.80 y 78.67 cm, longitud del resto y del total del tallo, respectivamente). En condiciones de escasa disponibilidad hídrica, la contribución de la longitud del último entrenudo del tallo al total aumentó, estimándose en un 38.4% (22.73 y 59.13 cm, longitud del último entrenudo y del total del tallo, respectivamente), en detrimento de la contribución del resto del tallo que se estimó en un 61.6% (36.4 y 59.13 cm, longitud del resto y del total del tallo, respectivamente).

El déficit hídrico no sólo redujo la longitud del resto del tallo en la línea 89 (Fig. 4.17a) sino que disminuyó notablemente su peso seco, que se estimó en un 52.2% de descenso con respecto a las plantas de control hídrico (1.59 y 0.76 g en plantas control y sequía, respectivamente, Fig. 4.16c), por lo que sería previsible esperar una reducción del peso específico de dicha fracción del tallo (Tabla 4.17). En el análisis de la varianza del peso específico del resto del tallo, la interacción genotipo x disponibilidad hídrica no alcanzó el umbral establecido para la significación de los resultados, pero mostró una $P=0.059$ indicativa de que el estrés hídrico disminuyó el peso específico del resto del tallo en la línea 89 un 28.7% (29.24 y 20.84 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-1}$ en plantas control y sequía, respectivamente, Lsd 6.968) y en la línea 76 un 38.6% (23.94 y 14.69 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-1}$ en plantas control y sequía, respectivamente, Lsd 6.968), y apenas tuvo efecto en el peso específico del resto del tallo de la línea 8 y Harrington. El descenso del peso específico del resto del tallo en la línea 76 se relacionó con la pérdida de peso inducida por la sequía en dicha fracción del tallo, que sin llegar a ser significativa, se estimó en un 27.1% (0.436 y 0.318 g en plantas control y sequía, respectivamente, Fig. 4.16c), de acuerdo con la propuesta de Ehdaie *et al.* (2006a) de que el peso seco es el determinante del peso específico de los entrenudos del tallo. Los cambios descritos en el peso específico del resto del tallo repercutieron en el peso específico del total del tallo (Fig. 4.18b), ya que el déficit hídrico condujo, en comparación con las plantas control, a un descenso del peso específico del total del tallo en la línea 89, que se estimó en un 31.18% (24.56 y 16.90 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-1}$ en plantas control y sequía, respectivamente, Fig. 4.18b), bajada superior a la observada en el peso específico del último entrenudo del tallo (Fig. 4.18a), y a un descenso próximo a la significación en la línea 76 (Fig. 4.18b), en la que el peso específico del último entrenudo del tallo no varió con la disponibilidad hídrica (Fig. 4.18a). Los resultados reflejan una considerable variabilidad genotípica para las características de los entrenudos del tallo en el inicio del desarrollo del grano tanto con amplia como con escasa disponibilidad hídrica, principalmente en el peso, en conformidad con un estudio con un amplio grupo de genotipos de trigo, en el que ninguno de ellos mostró pesos similares para el último, penúltimo y resto de entrenudos del tallo (Ehdaie *et al.*, 2006a). Si bien, la longitud del resto del tallo también varió entre los genotipos, y ambos parámetros influyeron en la longitud y el peso específico del total del tallo.

5.1.3.2.- Crecimiento en la madurez. Contribución de reservas en el tallo al rendimiento de grano. Repercusiones en el contenido de C y N en el grano.

En la madurez, al igual que al inicio del desarrollo del grano, se estimó la materia seca de cada una de las partes en las que fue fraccionado el tallo principal y la biomasa total del tallo principal, y se evaluó también el rendimiento de grano de los genotipos según la disponibilidad hídrica. Como era previsible, con respecto a la anterior etapa del desarrollo, el peso de la espiga aumentó en la madurez, una vez completada la fase de llenado del grano, y a diferencia de lo ocurrido en el inicio del desarrollo del grano varió en las líneas RCSL y Harrington con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.19). En comparación con las plantas de control, el déficit hídrico condujo en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente, a un descenso del peso de la espiga (13.1%, 21.9%, 35.3% y 28.2%) (Fig. 4.19a). En plantas de control hídrico el mayor peso de la espiga lo tuvo la línea 89 y el menor la línea 76, y Harrington y la línea 8 tuvieron pesos similares, y aun cuando la sequía disminuyó el peso de la espiga de manera más acusada en las líneas 76 y 89 se mantuvieron las diferencias entre genotipos, con la excepción de que el peso de la espiga de la línea 89 fue similar al del cv. Harrington (Fig. 4.19a). La biomasa del tallo principal también varió entre los genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.19). El déficit hídrico redujo, con respecto a las plantas control, la acumulación de biomasa del tallo principal en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (18.4%, 28.2%, 33.4% y 32.5%) (Fig. 4.19d). Con ambos niveles de disponibilidad hídrica, las líneas 89 y 76 tuvieron el mayor y menor peso del tallo principal, respectivamente, mientras que Harrington y la línea 8 tuvieron pesos similares entre ellos. El descenso inducido por la sequía en el peso seco del tallo principal fue mayor que en el de la espiga en todos los genotipos, exceptuando la línea 76 cuyo descenso fue levemente atenuado. Y la contribución del peso de la espiga a la biomasa del tallo principal representó para Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente, en condiciones de control hídrico (57.2%, 56.5%, 63.5% y 54.7%) y en condiciones de déficit hídrico (60.9%, 61.5%, 61.7% y 58.2%). Estos resultados evidencian que en plantas de control hídrico, la contribución del peso de la espiga al total del tallo principal fue mayor en la línea 76 que en los demás genotipos, y algo mayor en Harrington y la línea 8 que en la línea 89. Sin embargo, en plantas con escasa disponibilidad hídrica, la contribución del peso de la espiga al total del tallo principal fue similar entre Harrington y las líneas 8 y 76, y ligeramente menor en la línea 89. En relación con el otro componente importante a la biomasa total del tallo principal, la fracción tallo, el peso seco del último entrenudo del tallo también varió en las líneas RCSL y Harrington con la disponibilidad hídrica del suelo (Tabla 4.19, Fig. 4.19b). Así, la sequía disminuyó, con respecto a las plantas control, el peso del último entrenudo del tallo en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (20.4%, 36.8%, 25.6% y 30.7%) (Fig. 4.19b). El descenso del peso del último entrenudo del tallo inducido por la sequía en todos los genotipos en la madurez contrasta con el observado al inicio del desarrollo del grano, que tuvo lugar únicamente en la línea 89 (Fig. 4.16b), el genotipo más precoz. En plantas de control hídrico la mayor biomasa del último entrenudo del tallo la tuvo la línea 89 y la de la línea 8 fue mayor que la de la línea 76, y la de Harrington similar a la de ambas líneas RCSL, pero la sequía redujo la biomasa de dicha fracción del tallo hasta el punto de que las diferencias entre genotipos se atenuaron, excepto por el peso todavía mayor en la línea 89 (Fig. 4.16b). Con relación al resto del tallo, la interacción no alcanzó el umbral de significación establecido ($P=0.087$), pero sí que pudo observarse que el déficit hídrico redujo en un 35.5% el peso del resto del tallo con respecto a las plantas de control hídrico (Tabla 4.19). Dicho descenso fue más drástico que el inducido en el del último entrenudo del tallo, que en promedio se estimó en un 28.8%, con la variabilidad entre genotipos antes indicada (Fig. 4.19b). No obstante, las líneas 76 y 89 tuvieron el menor y mayor peso del resto del tallo, respectivamente, y Harrington y la línea 8 tuvieron pesos similares entre ellas (Tabla 4.19). La pauta de cambio entre genotipos en el

peso del resto del tallo fue similar para la longitud de dicha fracción del tallo (Tabla 4.20), ya que las líneas 76 y 89 tuvieron, con ambos regímenes hídricos, la menor y mayor longitud del resto del tallo, respectivamente, y Harrington y la línea 8 tuvieron longitudes similares (Fig. 4.20a). Estos resultados parecen evidenciar la existencia de una correlación positiva entre el peso y la longitud del tallo como indicaron Hunt (1979) y Ehdaie *et al.* (2006a). La variabilidad descrita en la acumulación de materia seca en las fracciones del tallo entre genotipos con la disponibilidad hídrica se reflejó también en el total de la fracción tallo (Tabla 4.19). De manera que la pérdida de materia seca inducida por el déficit hídrico, con respecto a las plantas control, en el total de la fracción tallo se estimó en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (27.5%, 35.8%, 30.5% y 38.2%) (Fig. 4.19c). Estos resultados muestran que el descenso inducido por la sequía del peso seco del resto del tallo en comparación con el del último entrenudo del tallo fue mayor en Harrington y las líneas 76 y 89, y levemente inferior en la línea 8. En dichos genotipos, esa mayor pérdida de materia seca del resto del tallo que del último entrenudo del tallo podría indicar una mayor contribución del resto del tallo al llenado del grano con la escasez de agua. Además, la contribución del peso de la fracción tallo a la biomasa total del tallo principal en condiciones de control hídrico representó en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (34.2%, 33%, 28.5% y 38.3%) y en déficit hídrico (30.4%, 29.5%, 29.7% y 35.1%). Todo lo anterior parece indicar que mientras que el tallo era el órgano predominante en peso en el inicio del desarrollo del grano, como suele ocurrir en etapas tempranas reproductivas (Bonnett and Incoll, 1992), en la madurez, una vez completado el ciclo reproductivo de la cebada, lo fue la espiga, y constatan que tuvo lugar una mayor pérdida de materia seca del tallo con déficit hídrico que con amplia disponibilidad hídrica. Se sabe que los carbohidratos se movilizan desde el tallo durante la última fase del llenado del grano (Willenbrink *et al.*, 1998) y pueden potencialmente contribuir hasta en un 20% al rendimiento de grano tanto en el trigo (Schnyder, 1993; Wardlaw and Willenbrink, 2000) como en la cebada (Bingham *et al.*, 2007b) en ausencia de estrés, y su contribución puede ser notablemente incrementada bajo condiciones ambientales adversas, como la sequía (Schnyder, 1993; Wardlaw and Willenbrink, 2000; Yang and Zhang, 2006), según el genotipo y la duración e intensidad del déficit hídrico impuesto (Blum, 1998). En conformidad con dichas argumentaciones, la variabilidad genotípica en la contribución del peso seco de la fracción tallo al total del tallo principal con la disponibilidad hídrica parece revelar que muy posiblemente tuvo lugar una mayor movilización de materia seca del tallo al grano con la sequía, indicativo de una mayor translocación de los carbohidratos solubles desde las reservas almacenadas en el tallo (Beheshti, 2013).

En la madurez, la fracción tallo y la espiga fueron las fracciones predominantes en peso y su contribución a la biomasa del tallo principal en plantas de control hídrico representó en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (91.4%, 89.5%, 91.9% y 93%) y en déficit hídrico (91.3%, 91%, 91.3% y 93.3%). Estos resultados muestran que la contribución del total de las hojas a la biomasa del tallo principal osciló entre un 7%–10.5% en plantas de control hídrico, mientras que en condiciones de escasa disponibilidad hídrica varió entre un 6.7%–9%, lo que parece indicar que fue ligeramente menor con déficit hídrico que con amplia disponibilidad hídrica. En consonancia con dicha apreciación, la sequía tendió a disminuir el peso de las hojas bandera y penúltima y redujo en un 35.1% el peso del resto de las hojas con respecto a las plantas de control hídrico (Tabla 4.19). Entre los genotipos, el peso de las hojas y del resto de hojas fue menor en la línea 76 que en Harrington y las líneas 8 y 89, con pesos similares entre ellos (Tabla 4.19). Cabe resaltar que las líneas 89 y 8 mostraron, en comparación con los demás genotipos, la mínima y máxima contribución del peso de las hojas a la biomasa total del tallo principal con independencia de la disponibilidad hídrica. Aun cuando para el peso del resto de las hojas, la interacción genotipo x disponibilidad hídrica no alcanzó

el umbral de significación establecido, las líneas 8 y 89 tuvieron un mayor peso seco del resto de las hojas en condiciones de control hídrico en la madurez, y el efecto de la sequía fue más acentuado que en los otros genotipos, que se estimó en la línea 8 en un 44.5% (0.2443 y 0.1356 g en plantas control y sequía, respectivamente, *Isd* 0.0179) y en la línea 89 en un 37.3% (0.1973 y 0.1237 g en plantas control y sequía, respectivamente, *Isd* 0.0179), frente al 34.8% y 20.6% apreciado en la línea 76 y Harrington, respectivamente. Singh and Stoskopf (1971) señalaron que en el peso seco de plantas de trigo, el tallo y las hojas incidieron en un 33% y un 9%, respectivamente. En este estudio, al realizar la extrapolación a nivel del tallo principal completo, los resultados concuerdan con dichas apreciaciones con cierta variabilidad atribuible al genotipo y la disponibilidad hídrica. En condiciones de control hídrico, la contribución de la fracción tallo y las hojas a la biomasa del tallo principal, promediado entre genotipos, representó un 33.5% y 8.5%, respectivamente, y en condiciones de escasa disponibilidad hídrica llegó a representar un 31.2% y 7.8%, respectivamente. Estos resultados sugieren que en ausencia de estrés hídrico la contribución de ambas fracciones fue similar a la indicada por Singh and Stoskopf (1971), y disminuyó ligeramente con déficit hídrico.

Con respecto a la longitud de las fracciones del tallo, la sequía redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, la longitud del último entrenudo del tallo un 10.7% (Tabla 4.20), reducción mayor que la observada al inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.17), que se estimó en un 3.7%, lo que sugiere que muy posiblemente los genotipos no hubieran logrado la longitud máxima de esta fracción del tallo en las fases tempranas del desarrollo del grano. Estos resultados difieren de aquellos observados con un amplio grupo de genotipos de trigo cultivado en el campo con diferentes niveles de disponibilidad hídrica en el suelo, en los que la reducción de la longitud del último entrenudo del tallo se estimó en un 15% (Ehdaie *et al.*, 2006a). La longitud de dicha fracción del tallo fue mayor en las líneas 76 y 89 que en Harrington y la línea 8, lo que parece indicar que los genotipos con la menor y mayor altura de planta tuvieron una mayor longitud del último entrenudo del tallo que los genotipos con una altura de planta intermedia (Tabla 4.20). Al igual que al inicio del desarrollo del grano, la longitud del resto del tallo varió entre genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.20). La sequía redujo, con respecto a las plantas control, la longitud del resto del tallo en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (15.6%, 19.2%, 32.7% y 34%) (Fig. 4.20a), el efecto de la sequía en todos los genotipos difiere del observado en la anterior fase del crecimiento, en la que la sequía únicamente redujo la longitud del resto del tallo en la línea 89 (Fig. 4.17a). Dicho descenso se estimó en un 33.6%, similar al encontrado en la madurez, indicativo de que dicha fracción del tallo en la línea 89 pudiera haber logrado la longitud máxima al inicio del desarrollo del grano. En la madurez, en plantas de control hídrico la mayor longitud del resto del tallo la tuvo la línea 89 y la menor la línea 76, con longitudes similares entre Harrington y la línea 8, y aun cuando el efecto de la sequía fue más acusado en las líneas 89 y 76 se mantuvieron las diferencias entre genotipos (Fig. 4.20a). La pauta de cambio de la longitud total de la fracción tallo fue similar a la observada para el resto del tallo (Fig. 4.20b), únicamente varió la intensidad del efecto. Ya que el déficit hídrico redujo, con respecto a las plantas control, la longitud de la fracción tallo en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (14.6%, 16.1%, 22.7% y 25.9%), efecto más atenuado que el encontrado en el resto del tallo, como consecuencia de la repercusión del último entrenudo del tallo en el total, que fue más tenue. En la madurez, la sequía disminuyó la longitud de las fracciones del tallo en todos los genotipos, a diferencia de lo ocurrido en el inicio del desarrollo del grano, ello podría derivarse de la ligera ralentización del desarrollo de los demás genotipos con respecto a la línea 89 y, por tanto, podría relacionarse con el tiempo que los diferentes genotipos necesitaron para lograr alcanzar su longitud máxima de acuerdo con la variabilidad encontrada en estudios previos con trigo (Borrell *et al.*, 1993; Ehdaie *et al.*, 2006a) y cebada (Bonnett and Incoll, 1992). La

contribución de la longitud del resto del tallo a la total varió con la disponibilidad hídrica en los genotipos de cebada, ya que en condiciones de control hídrico representó en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (60.4%, 62.3%, 52.8% y 69.5%), y con escasa disponibilidad hídrica (59.7%, 59.8%, 46% y 61.8%). Estos resultados parecen indicar que la contribución de la longitud del resto del tallo al total de la fracción tallo, o a la altura de la planta, en condiciones de control hídrico fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, y mayor a su vez en la línea 8 y Harrington que en la línea 76. Mientras que en condiciones de escasa disponibilidad hídrica, dicha contribución fue levemente disminuida en la línea 8, sensiblemente más disminuida en las líneas 76 y 89, y muy similar en Harrington. Y podría también inferirse que la contribución del último entrenudo del tallo al total fue mayor en la línea 76 que en los demás genotipos, y en condiciones de escasa disponibilidad hídrica la contribución del último entrenudo del tallo fue mayor que la del resto del tallo en la línea 76. Los resultados resaltan la variabilidad genotípica en la altura de la planta, ya que con independencia de la disponibilidad hídrica la línea 89 tuvo la mayor altura de planta y la línea 76 la menor, mientras que el cv. Harrington y la línea 8 presentaron una altura similar e intermedia entre las otras líneas RCSL. Una mayor altura de planta en la línea 89 se había observado en estudios previos en el campo (Inostroza *et al.*, 2007; 2009; Del Pozo *et al.*, 2012).

El peso específico del último entrenudo del tallo también varió entre genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.21). En comparación con las plantas de control, el déficit hídrico indujo un importante descenso del peso específico en las líneas 8 y 89 (28.9% y 25.3%, respectivamente), un descenso muy próximo a la significación en la línea 76 (15.8%), y en Harrington no logró alcanzar significación estadística (8.8%) (Fig. 4.21). Estos resultados difieren de los encontrados en el inicio del desarrollo del grano, en el que la sequía redujo el peso específico del último entrenudo del tallo únicamente en la línea 89 y no tuvo efecto en los restantes genotipos (Fig. 4.18a). Es importante resaltar que el descenso del peso específico del último entrenudo del tallo en la línea 89 fue un 2.7% mayor que en la anterior fase (22.6% y 25.3% descensos en el inicio del desarrollo del grano y en la madurez, respectivamente). Aun cuando el último entrenudo del tallo de la línea 89 no hubiera logrado alcanzar su longitud máxima en el inicio del desarrollo del grano, muy posiblemente su capacidad máxima potencial de acumulación de biomasa no la habría logrado, porque los carbohidratos en dicha fracción del tallo continuaron aumentando hasta el estadio de grano lechoso tardío (Tabla 4.9). Por ello, el descenso del peso específico del último entrenudo del tallo antes descrito podría representar la movilización o translocación de materia seca del último entrenudo del tallo al grano en la etapa final del llenado del grano, de acuerdo con las apreciaciones de Borrell *et al.* (1993). En conformidad con las argumentaciones anteriores, la disminución del peso específico del último entrenudo del tallo entre los genotipos podría relacionarse con la pérdida de peso inducida por la sequía en dicha fracción del tallo con respecto al control, que se estimó en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (20.4%, 36.8%, 25.6% y 30.7%), como ya se indicó anteriormente. Puesto que la pérdida de peso del último entrenudo del tallo fue más acusada en las líneas 8 y 89 muy posiblemente pudo disminuir el peso específico significativamente con la sequía, sin embargo, la pérdida de peso fue más tenue en la línea 76 y Harrington, 25.6% y 20.4%, respectivamente, y el peso específico o bien mostró un descenso próximo a la significación o tendió a disminuir (Fig. 4.21). En condiciones de control hídrico la línea 89 tuvo el mayor peso específico del último entrenudo del tallo y la línea 76 el menor, con valores similares entre Harrington y la línea 8, y a pesar de que la sequía indujo un mayor descenso en las líneas 8 y 89 se mantuvieron las diferencias entre genotipos, excepto que el peso específico de dicha fracción del tallo no varió en la línea 8 con respecto a la línea 76 (Fig. 4.21). A pesar de que la sequía indujo un ligero descenso de la longitud del último entrenudo del tallo, éste parámetro fue similar entre las líneas 89 y 76, y mayor a su vez en dichas líneas que en

Harrington y la línea 8 (Tabla 4.20). Por lo que la variabilidad genotípica descrita en el peso específico del último entrenudo del tallo sugiere que dichos entrenudos fueron mucho más gruesos en la línea 89 que en ningún otro genotipo y en la línea 76 más delgados. Esto explicaría que aunque el último entrenudo del tallo fuese más corto en Harrington y la línea 8 que en la línea 76, sus pesos específicos aumentasen con respecto a los de la línea 76 en condiciones de control hídrico, y que el peso específico del último entrenudo del tallo fuese mayor con ambos niveles de disponibilidad hídrica en la línea 89 que en los demás genotipos, aún a pesar de la importante reducción del peso de dicha fracción del tallo inducida por la sequía. Del mismo modo, la notable reducción del peso del último entrenudo del tallo en la línea 8 con déficit hídrico condujo a que el peso específico no mostrase diferencias significativas con respecto a la línea 76 en condiciones de escasa disponibilidad hídrica. Esta variabilidad descrita parece indicar que la movilización de materia seca desde el último entrenudo del tallo al grano pudo ser menor en la línea 76 y Harrington que en los otros genotipos de cebada.

Por otra parte, el déficit hídrico redujo, con respecto a las plantas control, el peso específico del resto del tallo y del total de la fracción tallo un 12.3% y un 16.7%, respectivamente. El peso específico del resto del tallo fue menor en la línea 76 que en los demás genotipos (Tabla 4.21), como sería previsible ya que fue el genotipo que tuvo con ambos niveles de disponibilidad hídrica, el menor peso y la menor longitud de dicha fracción del tallo de todos los genotipos de cebada (Tabla 4.19, Fig. 4.20). Resulta interesante comprobar que el peso específico del resto del tallo disminuyó tanto en plantas control como en sequía con respecto al inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.18, Tabla 4.21), lo que sugiere una importante contribución de dicha fracción del tallo en la movilización de materia seca. Esto concuerda con los estudios de Borrell *et al.* (1993) y Ehdaie *et al.* (2006a) que observaron que los pesos específicos de las fracciones del tallo disminuyeron progresivamente en todos los genotipos examinados, como consecuencia principalmente de una reducción del peso más que de la longitud de las fracciones. Generalmente, la longitud máxima de los entrenudos se alcanza antes que el máximo peso, y cuando las condiciones ambientales son favorables, una gran proporción de los fotoasimilados se acumulan en los entrenudos inferiores, los cuales alcanzan su longitud máxima durante la antesis o brevemente después (Davidson and Chevalier, 1992). Por tanto, los entrenudos inferiores deberían de tener la longitud apropiada para alcanzar su potencial de acumulación de materia seca entorno a esa fase del desarrollo y podrían contribuir a la movilización de materia seca en la post-antesis. Entre los genotipos, se observó un importante descenso del peso específico del resto del tallo, con respecto al inicio del desarrollo del grano, en las líneas 76 y 89 (Tabla 4.18, Tabla 4.21), lo cual podría indicar una importante translocación de materia seca desde esta fracción del tallo durante el proceso de llenado del grano (Borrell *et al.*, 1993; Cruz-Aguado *et al.*, 2000; Ehdaie *et al.*, 2006a). Estudios previos han mostrado que las reservas de carbohidratos almacenados en los entrenudos inferiores fueron removilizadas más tempranamente que las almacenadas en los entrenudos superiores tanto en trigo (Ehdaie *et al.*, 2006a; Li *et al.*, 2013) como en cebada (Bonnett and Incoll, 1993).

El llenado del grano y, por extensión, el rendimiento de grano depende de la asimilación y distribución del carbono y del nitrógeno, lo que influye también en la calidad del grano de los cereales (Zhang *et al.*, 2010). En relación con el rendimiento de grano de la espiga del tallo principal, el peso del grano por espiga varió entre genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.23). En comparación con las plantas de control, el déficit hídrico condujo a un descenso del peso del grano por espiga en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (12.7%, 18.8%, 35% y 32.5%) (Fig. 4.26). En condiciones de control hídrico el mayor peso del grano por espiga lo tuvo la línea 89 y el

menor la línea 76, con valores similares entre Harrington y la línea 8, pero la sequía disminuyó el peso del grano hasta el punto de que Harrington tuvo un mayor peso del grano que las líneas RCSL, y la línea 76 tuvo un menor peso que las líneas 8 y 89, con pesos similares entre ellas (Fig. 4.26). Además, el déficit hídrico redujo, con respecto a las plantas de control hídrico, el número de granos por espiga y el peso por grano en un 20% y 7%, respectivamente (Tabla 4.23), de acuerdo con estudios previos con escasa disponibilidad hídrica (Voltas *et al.*, 1998). Entre los genotipos, la línea 8 tuvo un mayor número de granos por espiga que los demás genotipos. Reynolds *et al.* (2005) y Rebetzke *et al.* (2008) asociaron un alto número de granos por espiga con una mejor partición de asimilados de las partes vegetativas a la espiga. El peso por grano fue mayor en la línea 89 y el cv. Harrington que en las líneas 8 y 76 (Tabla 4.23), lo que parece indicar que los genotipos con menor número de granos por espiga desarrollaron granos de mayor tamaño. A nivel de la espiga del tallo principal, el peso por grano mostró exactamente la misma tendencia que a nivel de planta entera, aunque en este último caso, el peso por grano de cada uno de los genotipos fue significativamente diferente (Tabla 4.24). El peso por grano se considera a menudo el parámetro más estable de los componentes del rendimiento de grano en la cebada (Bingham *et al.*, 2007b), aunque parece existir cierta variabilidad que depende del genotipo y del ambiente (Voltas *et al.*, 1998). Se han encontrado variaciones significativas en el peso por grano, en ausencia de estreses abióticos, en cultivos de una misma variedad que crecen en condiciones comparables en diferentes lugares y estaciones (Bingham *et al.*, 2007b). En cebada y trigo, las diferencias genotípicas en el peso por grano parecen relacionarse con el establecimiento del tamaño del sumidero en las etapas tempranas del desarrollo del grano, que es cuando tiene lugar la expansión y desarrollo del número de células del endospermo y se establece el número de gránulos de almidón (Calderini *et al.*, 1999). En trigo, se han mostrado evidencias de que aquellos genotipos con un alto contenido de carbohidratos solubles en el tallo suelen presentar espigas con un mayor peso y con un menor número de granos por unidad de peso de la espiga (Fischer, 2008). En un estudio con cuatro líneas recombinantes puras de trigo con diferente capacidad de acumulación de carbohidratos solubles, se ha mostrado que en aquellas líneas con un alto contenido de carbohidratos solubles disminuyó el número de granos y aumentó el peso por grano, y la contribución de los carbohidratos solubles al rendimiento de grano fue mayor que en aquellas con un menor contenido de carbohidratos solubles (Dreccer *et al.*, 2009). Dichas apreciaciones parecen estar de acuerdo con los resultados obtenidos en la línea 89, que fue el genotipo que tuvo el mayor contenido de carbohidratos solubles en agua en el último entrenudo del tallo en el estadio de grano lechoso tardío (Tabla 4.9), y en la madurez presentó un contenido de carbohidratos solubles en el grano y peso por grano similar al cv. Harrington y mayor que el de las líneas 8 y 76 (Tabla 4.25, Tabla 4.23), pero proporcionalmente utilizó más reservas del tallo en el llenado del grano que el cv. Harrington (Tabla 4.28).

El peso por grano es un importante componente tanto del rendimiento como de la calidad del grano en la cebada, ya que el peso por grano se relaciona con el tamaño del grano, y éste con el potencial para extraer malta (Lee *et al.*, 1989). Granos de mayor tamaño son preferibles para la industria porque presentan mejor potencial para la extracción de malta (Bingham *et al.*, 2007a; Zhang and Li, 2010), ya que mejoran la calidad maltera al aumentar el poder diastático (Li *et al.*, 2008). Sin embargo, granos muy grandes pueden llegar a tener un impacto negativo en la calidad maltera, particularmente en la tasa de hidratación con agua y la modificación durante el malteado (Zhang and Li, 2010). En nuestro estudio, en consonancia con dichas apreciaciones, la línea 89 y Harrington presentaron granos con mayor peso y, por ende, de mayor tamaño que las otras líneas RCSL (Tabla 4.23), por lo que potencialmente parecen reunir mejores características para el procesamiento en la industria de la cerveza (Peltonen-Sainio *et al.*, 2007).

Los usos potenciales de los granos de la cebada, bien para la producción de cerveza o para la alimentación humana o animal, dependen en gran medida de la calidad del grano, que puede ser influenciada por numerosos factores ambientales y genéticos (Fox *et al.*, 2003). El endospermo de la cebada está compuesto principalmente de carbohidratos, entre ellos el almidón, los azúcares simples y otros polisacáridos distintos del almidón (fructanos, celulosa y arabinosilanos). El almidón es el principal carbohidrato componente del endospermo, ya que puede llegar a representar entre un 38%–76% de los azúcares del grano según el cultivar, y se trata de uno de los factores más importantes que contribuye a la calidad del grano, junto con las proteínas (Gous *et al.*, 2013). En este estudio, con independencia de la celulosa y los arabinosilanos, el carbohidrato predominante en los granos de la espiga principal de la cebada fue el almidón (Tabla 4.25), que llegó a representar en el total de carbohidratos evaluados (solubles y almidón) en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (95.1%, 96.3%, 95.8% y 94.9%). El déficit hídrico no tuvo efecto en el contenido de almidón del grano y entre los genotipos de cebada no hubo diferencias en la acumulación de almidón en el grano (Tabla 4.25). Estos resultados fueron similares a los observados por Gous *et al.* (2013) con varios genotipos de cebada y difieren de aquellos que han mostrado que la sequía condujo a un descenso notable del contenido de almidón en los granos maduros (Jiang and Yu, 2007; Zhang and Li, 2010). Una reducción en la concentración de almidón en el grano se ha encontrado también en plantas de trigo cultivadas en una atmósfera enriquecida en CO₂ (Högy *et al.*, 2013a). Sin embargo, el déficit hídrico aumentó, con respecto a las plantas control, el contenido de carbohidratos solubles en agua en un 9.8% (Tabla 4.25). La línea 89 tuvo el mayor contenido de fructanos en el grano, y las líneas 8 y 76 tuvieron un contenido similar e inferior al del cv. Harrington (Tabla 4.25). Cierta variabilidad en el contenido de fructanos del grano se ha encontrado entre genotipos de trigo blando (Huynh *et al.*, 2008), y en el grano de plantas crecidas en CO₂ elevado se ha encontrado también un aumento del contenido de fructanos (Högy *et al.*, 2013a). El contenido de sacarosa fue mayor en Harrington y la línea 76 que en las otras líneas RCL, y mayor a su vez en la línea 89 que en la línea 8. La variabilidad genotípica descrita en el contenido de sacarosa y fructanos condujo a que Harrington y la línea 89 tuvieran el mayor contenido de carbohidratos solubles en el grano, y a que aumentasen en la línea 76 con respecto a la línea 8 (Tabla 4.25). En la madurez, se estudió también la relación entre la acumulación de carbohidratos en el grano y los carbohidratos en las hojas y el último entrenudo del tallo. En las hojas, la sequía redujo el contenido de almidón y aumentó el de carbohidratos solubles en agua, fructanos y glucosa (Tabla 4.27). En el último entrenudo del tallo, el déficit hídrico redujo el contenido de almidón y no tuvo efecto en el nivel de hexosas, sacarosa, fructanos y el total de carbohidratos solubles en agua (Tabla 4.28). El elevado contenido foliar de fructosa y glucosa, junto al escaso contenido de fructanos en ambas partes del tallo principal, sugiere que tuvo lugar un incremento de la degradación de fructanos (Morcuende *et al.*, 2004; Joudi *et al.*, 2012) y una importante removilización de carbono en las fases finales del llenado del grano (Wardlaw and Willenbrink, 2000). Estos resultados parecen mostrar una elevada variabilidad genotípica en el contenido de carbohidratos entre los órganos fuente (hojas y último entrenudo del tallo) y el grano con la disponibilidad hídrica.

Durante el llenado del grano, el dosel vegetal aumenta la tasa de respiración (McCullough and Hunt, 1989) y la fotosíntesis de la hoja bandera puede llegar a no ser suficiente para mantener la respiración y el crecimiento del grano bajo condiciones ambientales adversas como la sequía (Rawson *et al.*, 1983), por lo que el llenado del grano puede depender en mayor medida de los carbohidratos almacenados en el tallo (Johnson *et al.*, 1981; Gent, 1994). La fotosíntesis en el cv. Harrington muy posiblemente se mantuvo hasta fases más avanzadas del llenado del grano que en los demás genotipos como se ha indicado previamente, mientras que en la línea 89 disminuyó con

anterioridad, por lo que la provisión de fotoasimilados directamente transferidos al grano pudo ser mayor en Harrington que en los otros genotipos (Zhang *et al.*, 2006). Aún a pesar de que el cv. Harrington y la línea 89 tuvieron un mayor contenido de carbohidratos solubles en agua en el grano que las otras líneas RCSL (Tabla 4.25), sin embargo, el contenido foliar de carbohidratos solubles y de fructanos, promediado con la disponibilidad hídrica, fue mayor en Harrington que en las líneas RCSL (Tabla 4.27), y dicho incremento derivó principalmente de la mayor acumulación de fructanos en condiciones de escasa disponibilidad hídrica (Fig. 4.30b). La limitación en la capacidad sumidero del grano con respecto a las condiciones de control hídrico, pudo facilitar la acumulación de carbohidratos foliares con escasez de agua, en especial fructanos, por la menor demanda de carbono para el llenado del grano (Fig. 4.30a, Fig. 4.30b), de acuerdo con estudios previos (Foulkes *et al.*, 2007; Reynolds *et al.*, 2007). Además, el cv. Harrington tuvo, aún sin lograr significación estadística, un mayor contenido de carbohidratos solubles y fructanos en el último entrenudo del tallo que las líneas RCSL (Tabla 4.28). Estos resultados parecen indicar que proporcionalmente el cv. Harrington movilizó menos reservas almacenadas en el último entrenudo del tallo al grano. Por el contrario, la línea 89 tuvo un mayor contenido de fructanos en el grano que el cv. Harrington, mientras que el de carbohidratos solubles en agua fue similar entre ambos genotipos (Tabla 4.25), y el contenido de carbohidratos solubles cualquiera que fuera su naturaleza y el total de los mismos, tanto en las hojas como en el último entrenudo del tallo, fue menor en la línea 89 que en los demás genotipos de cebada (Tabla 4.27, Tabla 4.28). Los fructanos son la principal forma de almacenaje en los tallos, y sus niveles disminuyeron notablemente no sólo en el último entrenudo del tallo sino también en las hojas, y aumentaron en el grano, lo que parece indicar una mayor contribución de las reservas de carbohidratos en tejidos vegetativos al llenado del grano en dicha línea RCSL (Gent, 1994). Estos resultados parecen constatar que una mayor proporción del peso por grano en la línea 89 fue dependiente de los carbohidratos almacenados en el tallo con respecto a los otros genotipos de cebada, y más aún en comparación con el cv. Harrington que tuvo un contenido de carbohidratos solubles en el grano similar. Dreccer *et al.* (2009) propusieron que la contribución aparente de los carbohidratos solubles al rendimiento de grano fue mayor en las líneas con un alto contenido de carbohidratos solubles en agua en el tallo, de acuerdo con nuestros resultados en la línea 89.

Entre los principales componentes del grano destaca no sólo el almidón sino también las proteínas (Beltrano *et al.*, 2006). El contenido de proteínas es el otro atributo importante que condiciona la calidad del grano de la cebada según el uso al que se destine el grano. Concentraciones elevadas de proteínas son deseables en términos de calidad nutricional si se destina el grano de cebada para uso alimentario o pienso para animales. Sin embargo, un contenido proteico por encima de un 11.5% tiene un impacto adverso en el proceso de malteado y calidad final de la cerveza (Högy *et al.*, 2013b). En nuestro estudio, el déficit hídrico condujo a un incremento del contenido proteico del grano (Tabla 4.26). En cereales, son varios los estudios que han mostrado un aumento del contenido proteico en el grano bajo estrés hídrico terminal (Beltrano *et al.*, 1999; Gooding *et al.*, 2003; Gous *et al.*, 2013). El contenido de proteínas y de nitrógeno en el grano aumentó en las líneas RCSL en comparación con el cv. Harrington, y en la línea 89 con respecto a las líneas 8 y 76 (Tabla 4.26). Las proteínas del grano se sintetizan esencialmente a partir del nitrógeno asimilado antes de la antesis, que es translocado al grano, mientras que la contribución del nitrógeno tomado después de la antesis es menor (Dupont and Altenbach, 2003). De acuerdo con dicha apreciación, la mejora del contenido proteico del grano inducida por la sequía pudo deberse a la movilización de las proteínas del tallo, como evidencia el descenso de proteínas solubles observado en el último entrenudo del tallo, y muy posiblemente también de las hojas, aunque no logró alcanzar significación estadística (Tabla 4.29). En Harrington, el menor contenido de nitrógeno y proteínas en el grano pudo atribuirse

a una menor translocación del nitrógeno almacenado en el tallo, ya que el contenido de proteína soluble y nitrógeno en el último entrenudo del tallo fue mayor que en la línea 89 y 8, si bien no mostró diferencias significativas con respecto a la línea 76 (Tabla 4.29). Por el contrario, en la línea 89, el aumento del contenido proteico del grano pudo relacionarse con una mayor translocación del nitrógeno almacenado en el último entrenudo del tallo, puesto que el contenido de nitrógeno en dicha fracción del tallo disminuyó con respecto a los demás genotipos, y el contenido de proteínas solubles fue menor que en Harrington y la línea 76 y tendió a disminuir en comparación con la línea 8 (Tabla 4.29). Zhang and Li (2010) observaron que líneas de cebada con granos pequeños, generalmente, contienen menos almidón y altos niveles de proteína. En conformidad con dicha propuesta, la línea 8 presentó el menor peso por grano, un menor contenido de almidón y un alto contenido de proteína soluble, una tendencia relativamente similar se observó en la línea 76 (Tabla 4.26). Por el contrario, el contenido de almidón suele aumentar en los granos grandes, a la vez que disminuye el contenido de proteína (Zhang and Li, 2010), el cv. Harrington cumpliría dichas indicaciones. Sin embargo, la línea 89 tuvo el mayor contenido de proteínas en el grano y el peso por grano tendió a aumentar con respecto al cv. Harrington, lo cual difiere de dichas apreciaciones. Ehdai and Waines (1996) propusieron que son dos los componentes involucrados en la contribución de las reservas almacenadas en el tallo al rendimiento de grano en trigo, el primer componente es la capacidad de almacenar asimilados en el tallo, y el segundo componente es la eficiencia en la movilización o translocación de reservas al grano. Este segundo componente parece depender de la fuerza sumidero del grano, que puede variar en función del número de granos por espiga y del peso de los granos. En base a dichas apreciaciones, la línea 89 tuvo una mayor capacidad de almacenaje de asimilados en el tallo porque presentó entrenudos más largos y con mayor peso específico, junto a una mayor eficiencia en la translocación de las reservas del tallo ya que la contribución de los carbohidratos al rendimiento de grano fue mayor. En dicha línea RCSL, la fuerza colectora del grano pudo ser mayor porque tuvo menos granos por espiga y de mayor tamaño, y todo ello pudo redundar en una mejora de la calidad del grano, tanto en el contenido de carbohidratos como en el contenido proteico, lo que podría facilitar su uso tanto industrial como nutricional. Las otras líneas RCSL tuvieron también un mayor contenido de proteínas que el cv. Harrington, lo cual mejoraría potencialmente la calidad del grano para ciertos usos.

5.1.4.- El déficit hídrico afecta a la acumulación de biomasa y rendimiento de grano de las plantas de cebada.

La escasez en la disponibilidad hídrica del suelo a menudo afecta al rendimiento y la productividad de los cultivos (Beltrano *et al.*, 2006). En la madurez, el déficit hídrico redujo notablemente la acumulación de materia seca en las plantas de cebada como consecuencia de un descenso del número de tallos y de espigas por planta (Tabla 4.22), en conformidad con las apreciaciones indicadas por Gous *et al.* (2013). Una menor acumulación de biomasa en condiciones de estrés hídrico se ha encontrado en estudios recientes con cebada (Gous *et al.*, 2013) y trigo (Weldearegay *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013) y también con *Arabidopsis* (Hummel *et al.*, 2010). El ahijamiento comienza en etapas anteriores a la iniciación de las estructuras reproductivas (Duggan *et al.*, 2005), y se ha mostrado que cualquier limitación en la disponibilidad hídrica del suelo en etapas tempranas del desarrollo de los cereales reduce el número de tallos por planta (Yunusa and Sedgley, 1992) y la demanda de agua en la pre-antesis (Richards and Townley-Smith, 1987; Mitchell *et al.*, 2013). Entre los genotipos, la biomasa aumentó en la línea 8 en comparación con Harrington y la

línea 76 y tendió a aumentar con respecto a la línea 89 (Fig. 4.22). Cambios bastante similares al patrón de acumulación de biomasa se observaron en la eficiencia en el uso del agua a nivel de planta entera (WUE, *water use efficiency*, razón entre la materia seca producida y la cantidad de agua consumida), ya que la eficiencia en el uso del agua aumentó en la línea 8 en comparación con el cv. Harrington y la línea 76 y fue similar a la de la línea 89 (5.25, 7.09, 5.44 y 6.72 g·L⁻¹, WUE en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, lsd 1.25), aunque a diferencia de la acumulación de biomasa, la WUE fue también mayor en la línea 89 que en los otros dos genotipos. Desde un punto de vista fisiológico, la elevada eficiencia en el uso del agua se ha considerado tradicionalmente como un mecanismo que permite el incremento de la productividad y la supervivencia en ambientes secos (Jones, 1993). Esa mayor acumulación de biomasa en la línea 8 se relacionó, aún sin lograr el umbral de significación establecido, con un mayor número de tallos por planta (Tabla 4.22), de acuerdo con la propuesta de Gous *et al.* (2013) de que un aumento de biomasa en la cebada a menudo es el resultado de un incremento en el número de tallos. Si bien, conviene resaltar que el ambiente influyó en el número de tallos por planta entre los genotipos de cebada (Tabla 4.22), ya que el ahijamiento fue mayor en la línea 8 que en el resto de genotipos en condiciones de control hídrico (41, 58, 43 y 47 tallos por planta en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, lsd 13.2), y no hubo diferencias entre genotipos en condiciones de escasa disponibilidad hídrica (21.7, 22.7, 22.3 y 19 tallos por planta en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, lsd 13.2). Por lo que la reducción del ahijamiento inducida por la sequía, que se estimó con respecto a las plantas control en un 54.7% (Tabla 4.22), fue mayor en la línea 8 (60.9%) que en Harrington y la línea 76 (47.1% y 48.1%, respectivamente) y similar a la de la línea 89 (59.6%). Estos resultados revelan que la mayor acumulación de materia seca en la línea 8 deriva del incremento del número de tallos por planta en condiciones de control hídrico, lo cual parece constatar que el ahijamiento es regulado genéticamente y es influenciado por el ambiente (Dreccer *et al.*, 2013). Diferencias genotípicas en el número de tallos por planta se han mostrado en trigo (Duggan *et al.*, 2005), arroz (Fujita *et al.*, 2010) y sorgo (Kim *et al.*, 2010). El ahijamiento determina el número de espigas que es un importante componente del rendimiento (Duggan *et al.*, 2005; Dreccer *et al.*, 2013). En este estudio, la sequía indujo un notable descenso del número de tallos productivos o, lo que es lo mismo, del número de espigas por planta en todos los genotipos (Fig. 4.24), indicativo de que la imposición de la sequía con anterioridad a la antesis influyó en el número de espigas. Estos resultados confirman que el número final de espigas puede reducirse cuando las condiciones de sequía prevalecen durante el periodo completo del desarrollo del grano (Innes *et al.*, 1985; Blum and Pnuel, 1990; Foulkes *et al.*, 2007; Dolferus *et al.*, 2013) y que el efecto depende de la intensidad y duración del estrés hídrico y de la etapa de desarrollo de la planta (Innes *et al.*, 1985; Blum and Pnuel, 1990; Foulkes *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013). En control hídrico la línea 8 y el cv. Harrington tuvieron el mayor y menor número de espigas por planta, respectivamente (Fig. 4.24), y en déficit hídrico el número de tallos productivos fue similar entre los genotipos, lo que indica que el efecto de la sequía fue más acusado en la línea 8 que en los demás genotipos, y ligeramente menos acentuado en el cv. Harrington que en las líneas 76 y 89 (Fig. 4.24). Esto repercutió en que el porcentaje de tallos con espiga por planta disminuyese en el cv. Harrington en comparación con las líneas 76 y 89 y tendió a disminuir con respecto a la línea 8 (Tabla 4.22). En esta línea 8, el descenso del número de tallos y espigas por planta inducido por la sequía fue más drástico que en los demás genotipos, por lo que el porcentaje de tallos con espiga disminuyó o tendió a disminuir con respecto a las líneas 76 y 89, respectivamente (Tabla 4.22). En conjunto, estos resultados muestran la variabilidad en el ahijamiento y la diferente susceptibilidad al ambiente de los genotipos de cebada, junto a la estrecha relación existente entre el número de tallos y de espigas por planta con la biomasa de las plantas en la madurez (Gous *et al.*, 2013). Aún a pesar de que la interacción genotipo x disponibilidad hídrica no alcanzó el umbral de significación establecido

($P=0.084$) en el análisis de la varianza de la biomasa, mostró que en condiciones de escasa disponibilidad hídrica el peso por planta no varió significativamente entre los genotipos, al igual que el número de tallos y de espigas por planta (Tabla 4.22, Fig. 4.24), por lo que la variabilidad encontrada se asoció con las condiciones de control hídrico, como se anticipó previamente. El efecto de la sequía en la biomasa reflejó exactamente la influencia observada en el ahijamiento, ya que el déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas control, la biomasa en un 70.3%, 78.6%, 73.4% y 74% (36 y 10.7, 60.3 y 12.9, 41 y 10.9, 50.8 y 13.2 g-planta⁻¹ en control y sequía en el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente, lsd 12.47). Todo lo cual refleja que el descenso de biomasa inducido por la sequía fue mayor en la línea 8 que en los demás genotipos, pero no llegó a contrarrestar completamente la acumulación de materia seca de las plantas de control hídrico, ya que promediado con la disponibilidad hídrica la biomasa de la línea 8 fue mayor que la de los otros genotipos (Fig. 4.22), como se ha indicado anteriormente.

Se ha sugerido que el rendimiento de grano es un parámetro extremadamente complejo (Acreche and Slafer, 2006) y de una baja heredabilidad, ya que depende tanto del genotipo como del ambiente (Reynolds *et al.*, 2006; Araus *et al.*, 2008; Nevo and Chen, 2010). En cebada, uno de los principales determinantes del rendimiento de grano es el número de espigas productivas en el momento de cosecha, que depende tanto del número de tallos por planta como de la cantidad de espigas productivas (García del Moral and García del Moral, 1995), e influye en los componentes más importantes del rendimiento, el número de granos por unidad de superficie y el peso del grano (Acreche and Slafer, 2006; Araus *et al.*, 2008; Francia *et al.*, 2013). El porcentaje de espigas por planta promediado fue superior al 50% en las líneas 76 y 89, y ligeramente inferior a dicho porcentaje en la línea 8 y Harrington (Tabla 4.22). Resultados similares a aquellos observados en un estudio con varias líneas de trigo sometidas a estrés hídrico de diferente intensidad, en el que aproximadamente un 46% de los tallos generaron espigas productivas en la madurez (Mitchell *et al.*, 2013). La sequía no sólo redujo el número de espigas por planta sino también el número de granos por planta (Fig. 4.24, Fig. 4.27), parámetro que varió entre genotipos con la disponibilidad hídrica. En condiciones de control hídrico las líneas 8 y 76 tuvieron un mayor número de granos que el cv. Harrington y la línea 89 (Fig. 4.27), como era predecible, puesto que también tuvieron un mayor número de espigas por planta (Fig 4.24), pero la sequía disminuyó el número de granos por planta más drásticamente en las líneas 8 y 76 hasta el punto de que las diferencias entre genotipos se atenuaron (Fig. 4.27). Estos resultados revelan una elevada variabilidad en el número de granos por planta entre los genotipos con amplia disponibilidad hídrica, y la imposición del déficit hídrico con anterioridad a la antesis y su mantenimiento durante el llenado del grano redujo notablemente este componente del rendimiento. En coherencia con varios estudios que indican que la escasez en la disponibilidad hídrica brevemente antes o durante la post-antesis puede desencadenar efectos importantes en el rendimiento de grano porque el número de granos y el tamaño del grano se establece durante esta fase del desarrollo (Loss *et al.*, 1989; Beltrano *et al.*, 2006; Fischer, 2008; Li *et al.*, 2013).

Con relación al peso del grano, el otro componente importante del rendimiento de grano, el déficit hídrico condujo, con respecto a las plantas de control hídrico, a un drástico descenso del peso del grano, que se estimó en un 77.9% (Tabla 4.24). De acuerdo con la proposición de que una limitación en la disponibilidad hídrica del suelo en las etapas tempranas del desarrollo del grano disminuye el número de células del endospermo y reduce el potencial colector del grano, lo que se traduce en una reducción del peso del grano como consecuencia de la pérdida de capacidad del endospermo para acumular almidón (Saini and Westgate, 1999). La interacción genotipo x disponibilidad hídrica no logró el umbral de significación establecido ($P=0.077$), pero mostró una

pauta de cambio similar a la descrita para el número de granos por planta según la disponibilidad hídrica (Fig. 4.27). Y cabe indicar que la mayor pérdida de peso del grano inducida por la sequía fue en la línea 8, que se estimó en un 81.4% (18.52 y $3.44 \text{ g}\cdot\text{P}^{-1}$ en plantas control y sequía, lsd 4.189), mientras que la disminución del peso del grano fue inferior en los otros genotipos o próxima al promedio antes indicado. No obstante, pudo apreciarse que en las líneas 8 y 76, los genotipos con mayor número de granos en condiciones de control hídrico, el peso del grano aumentó con respecto a los otros dos genotipos, aunque el de la línea 76 tendió a aumentar con respecto a la línea 89 (Tabla 4.24). Los resultados sugieren la existencia de una buena correlación entre el número de granos y el peso del grano, y reflejan la variabilidad genotípica entre el peso del grano observado para cada genotipo y nivel de disponibilidad hídrica. Esto parece indicar que existe un fuerte componente genético que subyace en la diferente sensibilidad de cada uno de los genotipos a una restricción en la disponibilidad hídrica, y muestra que el déficit hídrico redujo el rendimiento de grano como consecuencia de un descenso del número y peso del grano. De acuerdo con otros estudios que han mostrado que el déficit hídrico durante el llenado del grano redujo el rendimiento de grano como consecuencia de un descenso del número y peso de grano en arroz (Lilley and Fukai, 1994), girasol (Göksoy *et al.*, 2004), maíz (Chimenti *et al.*, 2006) y trigo (Ehdaie *et al.*, 2008). Y difieren de aquellos en los que la imposición de la sequía en etapas tardías del llenado del grano disminuyó el peso de grano, mientras que el número de granos apenas fue alterado (Karim *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2013).

El déficit hídrico disminuyó también el peso por grano (Tabla 4.24), lo que sugiere que el descenso del rendimiento de grano inducido por la sequía en el cultivar parental Harrington y en las líneas recombinantes se asoció con una reducción del número de tallos, espigas y granos por planta y el peso de los granos individuales. Un descenso del rendimiento de grano se ha observado en un estudio anterior sobre el efecto de la sequía terminal en un grupo de 24 líneas RCSL de cebada cultivadas en el campo (Del Pozo *et al.*, 2012). Borrás *et al.* (2004) propusieron que el peso por grano contribuye al rendimiento de grano ya que para un número de granos hay un amplio margen de rendimiento alcanzable debido a la variación en el peso de grano. De acuerdo con dicha propuesta, entre los genotipos de cebada se ha observado una amplia variabilidad en el peso por grano, ya que el peso por grano fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, mayor en Harrington y la línea 76 que en la línea 8, y mayor a su vez en el cv. Harrington que en la línea 76 (Tabla 4.24). Estos resultados sugieren que los genotipos con un mayor número de granos generaron granos más pequeños, a diferencia de aquellos que mostraron un menor número de granos pero de mayor tamaño. Se ha mostrado que genotipos con un alto contenido de carbohidratos no estructurales en sus tallos generalmente producen un menor número de granos con mayor peso por grano (Slewinski, 2012). Sin embargo, los genotipos con menor contenido de carbohidratos solubles generan más granos por espiga con un menor peso (Rebetzke *et al.*, 2008). Una cierta relación entre el peso por grano y el contenido de carbohidratos solubles del tallo en las líneas RCSL y el cv. Harrington puede inferirse en este estudio, ratificando en cierto modo dichas apreciaciones.

El índice de cosecha es el parámetro más utilizado para medir la eficacia de la planta para transformar la biomasa en grano, que es la relación entre el peso del grano y el peso total de la planta. La sequía condujo, con respecto a las plantas control, a un descenso del índice de cosecha de un 14%. Los valores de índice de cosecha se encontraron en rangos próximos a los señalados por Vogel *et al.* (1963). Un descenso de dicho índice se ha observado frecuentemente en condiciones de estrés hídrico con diferentes especies vegetales (Foster *et al.*, 1995; Ramirez-Vallejo and Kelly, 1998; Bingham *et al.*, 2009). El índice de cosecha aumentó en la línea 76 en comparación con Harrington y

las otras dos líneas RCSL, y no varió significativamente entre estos últimos genotipos (Fig. 4.28). Vogel *et al.* (1963) observaron que plantas con un tamaño reducido y alto rendimiento suelen tener un índice de cosecha más elevado. De acuerdo con dicha propuesta, la línea 76 tuvo el mayor índice de cosecha, y fue el genotipo con una menor altura de planta y con un alto peso de los granos. No obstante, cabe señalar que aun cuando el peso del grano por planta de la línea 76 fue similar al de la línea 8, el número de granos fue menor y el peso por grano mayor (Tabla 4.24). Esto indica que desarrolló granos de mayor tamaño, y justifica que, aún con un menor número de granos por planta que la línea 8, el peso del grano por planta fuese similar entre ambas líneas RCSL.

5.2.- EXPERIMENTO 2.

5.2.1.- El déficit hídrico de menor intensidad afecta a la asimilación fotosintética del CO₂ en la post-antesis de la cebada.

En este experimento, el déficit hídrico impuesto fue menos severo que en el primero y, como era previsible, condujo en todos los genotipos a un descenso más tenue de la asimilación fotosintética del CO₂ en las condiciones de crecimiento (con luz saturante y concentración de CO₂ de 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), tanto en el inicio del desarrollo del grano como en los estadios de grano lechoso medio y lechoso tardío (Fig. 4.31a, Fig. 4.33a, Fig. 4.35a). Con el avance del desarrollo de las plantas, la fotosíntesis fue disminuyendo con independencia de la disponibilidad hídrica del suelo y del nivel de CO₂ utilizado en la medida como consecuencia de la progresión de la senescencia foliar, que podría inferirse por la pérdida de clorofilas (Tabla 4.42).

En el **inicio del desarrollo del grano**, con 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO₂ en la medida, el descenso de fotosíntesis inducido por la escasez en la disponibilidad hídrica fue más leve en el cv. Harrington que en las líneas RCSL, en las que el efecto fue similar (Fig. 4.31a), lo que condujo a que la fotosíntesis aumentase en el cv. Harrington con respecto a las líneas RCSL en condiciones de déficit hídrico, pauta contraria a la observada en condiciones de control hídrico. La sequía indujo una disminución de la conductancia de los estomas en todos los genotipos, menos intensa en Harrington y las otras líneas RCSL que en la línea 89 (Fig. 4.31b), lo que sugiere una elevada sensibilidad de la g_s al déficit hídrico en dicha línea RCSL. Estudios previos han mostrado variaciones genotípicas en el efecto de la sequía en la conductancia estomática (Johnson *et al.*, 1987; Matin *et al.*, 1989; Inoue *et al.*, 2004). El descenso de la g_s es el efecto más inmediato del déficit hídrico en la mayoría de los estudios (Ritchie *et al.*, 1990; González *et al.*, 2010; Del Pozo *et al.*, 2012). La sequía no sólo disminuyó la g_s sino también la transpiración (Fig. 4.31d), lo que muestra que la reducción de la apertura estomática con el estrés hídrico limita la pérdida de agua y permite mantener la turgencia celular (Hamidou *et al.*, 2007; Benešová *et al.*, 2012). Las diferencias en E dentro de las RCSL y Harrington variaron con la disponibilidad hídrica. Así, en condiciones de control hídrico la mayor E la tuvo la línea 76 y la menor la 89, con valores similares entre Harrington y la línea 8, pero la sequía disminuyó E hasta el punto de que las diferencias entre genotipos se atenuaron, excepto por el valor todavía menor en la línea 89 (Fig. 4.31d). En control hídrico, las diferencias genotípicas en E no se relacionaron con las respectivas diferencias en g_s . La mayor superficie verde de la línea 89 (Tabla 4.50) podría inducir mayor déficit hídrico interno que limitara E. Aunque la línea 76 también tuvo un valor alto de superficie del resto de hojas, la escasa superficie de las hojas bandera y penúltima podría mejorar el estado hídrico de dichas hojas y explicar la mayor E. El menor contenido porcentual de humedad en las hojas de la

línea 89 (Tabla 4.53) podría sustentar que tuvo mayor déficit hídrico interno. No obstante, el contenido hídrico relativo de las hojas (Tabla 4.48) no mostró diferencias significativas que confirmaran los cambios genotípicos en déficit hídrico interno indicados. La disminución de la fotosíntesis inducida por la sequía se acompañó de un aumento de la concentración de CO₂ en los espacios intercelulares en todos los genotipos, con la excepción de la línea 89 (Fig. 4.31c), que podría ser indicativo de una limitación no estomática de la fotosíntesis. En el cv. Harrington y las líneas 8 y 76, la posible limitación metabólica de la fotosíntesis no se encontró en el anterior experimento cuando a plantas más jóvenes se impuso una sequía más severa (Fig. 4.1c). Sin embargo, en la línea 89, la sequía no tuvo efecto en la C_i, al igual que en este experimento, por lo que la respuesta de la C_i no varió con la intensidad de la sequía en este genotipo (Fig. 4.1c, Fig. 4.31c). Se ha descrito que la respuesta de la conductancia de los estomas y de la fotosíntesis al contenido hídrico foliar, uno de los parámetros más comúnmente utilizado para la estimación del estado hídrico de la planta y la intensidad de la sequía, parece depender del genotipo, de la duración y velocidad de imposición de la sequía (Tardieu and Simonneau, 1998; Lawlor, 2002; Bunce, 2004). En este experimento, las diferencias descritas en la C_i resultan sorprendentes, dado que la severidad de la limitación hídrica impuesta fue menor que en la anterior experimentación, en la que no se encontraron. Las diferencias en C_i con la sequía o entre genotipos, no parecen relacionarse con el RWC foliar, que no varió significativamente (Tabla 4.48). Ya se ha indicado que el cálculo de la C_i por medidas de intercambio gaseoso puede conducir a una sobreestimación de dicho parámetro por el cierre irregular de los estomas en hojas deshidratadas (Terashima, 1992) o por cambios en la conductancia de la cutícula al vapor de agua (Boyer *et al.*, 1997). Por lo que se realizaron medidas con concentraciones elevadas de CO₂ para poder distinguir los efectos estomáticos y no estomáticos de la sequía sobre la fotosíntesis (Cornic, 2000). En este experimento, comparando las medidas con concentraciones elevada y ambiente de CO₂, la conocida disminución de g_s inducida por el aumento del CO₂ se observó en todos los genotipos, excepto en plantas de control hídrico de la línea 76 (Fig. 4.32b, Fig. 4.31b). Además, en las líneas 8 y 76 el descenso de g_s inducido por la sequía con respecto a las plantas control fue mayor con [CO₂] elevado que ambiente. En estas líneas, la mayor limitación aparente de los procesos metabólicos por la sequía, que sugerían las medidas en [CO₂] ambiente, podría aumentar la sensibilidad de los estomas al CO₂. Los descensos con la sequía en la concentración de CO₂ en los espacios intercelulares podrían deberse a las disminuciones de g_s (Fig. 4.32c, Fig. 4.32b). Así, mientras que en medidas con CO₂ ambiente la sequía disminuyó g_s pero generalmente aumentó C_i, con CO₂ elevado disminuyó C_i. Esta caída se asoció con la desaparición o fuerte disminución del efecto negativo de la sequía en la fotosíntesis (Fig. 4.32a) encontrado en CO₂ ambiente. Puesto que con [CO₂] elevado la fotosíntesis está limitada por la regeneración de Ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) y el transporte fotosintético de electrones (Farquhar *et al.*, 1980; Sharkey, 1985), hay que concluir que la sequía no inhibió estos procesos. Más aún, en las líneas 8 y 89 la fotosíntesis fue mayor con sequía respecto a las plantas control, lo que puede sugerir un transporte de electrones más eficiente. La sequía puede aumentar la relación entre complejos de captura de luz y centros de reacción del fotosistema II (Giardi *et al.*, 1996) y la eficiencia fotoquímica de los centros abiertos de dicho fotosistema (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 1997).

En el **estadio de grano lechoso medio**, con 390 μmol·mol⁻¹ de CO₂ en la medida, la fotosíntesis disminuyó en las plantas de control hídrico y apenas varió en aquellas con escasa disponibilidad hídrica con respecto al anterior estadio de desarrollo (Tabla 4.31, Tabla 4.30), lo que condujo a que el efecto del déficit hídrico en la fotosíntesis de los genotipos de cebada se atenuase en comparación con el inicio del desarrollo del grano. Con la progresión del tiempo de exposición a la sequía y el avance del desarrollo de las plantas, el contenido hídrico relativo foliar disminuyó tanto en plantas

control como con escasa disponibilidad hídrica, aunque nuevamente entre los genotipos no se apreciaron diferencias significativas (Tabla 4.48). El menor descenso de la fotosíntesis con escasa disponibilidad hídrica podría relacionarse con el contenido hídrico relativo comparativamente bajo de las plantas de control (Fig. 4.33a). La atenuación del efecto del déficit hídrico en la fotosíntesis, se observó también en el resto de parámetros de intercambio gaseoso, hasta el punto de que la g_s no varió con la disponibilidad hídrica en el cv. Harrington y las líneas 8 y 76, y únicamente disminuyó en la línea 89 (Fig. 4.33b), lo que indica una carencia de sensibilidad de la g_s al déficit hídrico en todos los genotipos, con la excepción de la línea 89. Promediado entre los genotipos, el aumento de C_i y la disminución de E con la sequía se asociaron con el descenso de g_s (Tabla 4.31), siendo el aumento de C_i indicativo de una posible limitación no estomática de la fotosíntesis, ya sugerida con anterioridad en el inicio del desarrollo del grano. Además, C_i y E variaron entre genotipos de manera que la C_i fue menor en la línea 76 que en las otras líneas RCSL y tendió a serlo con respecto al cv. Harrington, y por el contrario, la E fue menor en las líneas 8 y 89 que en la línea 76, y mayor, a su vez, en esta última línea que en el cv. Harrington, lo que sugiere que la pauta de cambio de la E y C_i entre los genotipos fue opuesta (Tabla 4.31). Las diferencias en C_i entre genotipos, como las causadas por la sequía, parecieron debidas a diferencias de g_s . Las diferencias genotípicas en la E , en cambio, no se relacionaron con la g_s , ya que mostraron menor E los genotipos con mayor g_s , aunque las diferencias en esta última no fueron significativas. El contenido porcentual de humedad del resto de hojas fue más bajo en las líneas con menor E , las líneas 89 y 8 (Fig. 4.52a), lo que puede sugerir que un mayor déficit hídrico interno redujo la transpiración en estos genotipos. Que el efecto de la sequía en la g_s de la línea 89 fuese mayor que el observado en los otros genotipos (Fig. 4.33b) podría deberse también a un mayor déficit hídrico interno, que estaría inducido por la mayor superficie verde de la espiga y el tallo (Tabla 4.51). Con concentraciones elevadas de CO_2 en la medida la inhibición de la fotosíntesis con la sequía observada con concentración ambiente de CO_2 desapareció en gran medida (Fig. 4.34a). Esto indica que la sequía generalmente no inhibió la regeneración de RuBP y el transporte de electrones, y que el efecto principal de la sequía fue reducir la difusión de CO_2 hasta el cloroplasto. La línea 76 mostró una disminución de la fotosíntesis con la sequía que no se asoció con disminución de g_s sino con aumento de C_i (Fig. 4.34b, Fig. 4.34c), lo que puede sugerir limitación del transporte de electrones y regeneración de la RuBP. La disminución de g_s inducida por el aumento de CO_2 se observó únicamente en las líneas 8 y 89, como en las medidas con CO_2 ambiente (Fig. 4.34b, Fig. 4.33b), posiblemente por las razones ya expuestas. Excepto en la línea 76, la disminución de E con la sequía fue paralela al descenso g_s , y probablemente fue consecuencia del mismo. La E fue mucho menor con sequía que en plantas de control de la línea 76 debido principalmente a su alto valor en estas últimas, que puede estar relacionado con un mejor estado hídrico interno a consecuencia de su menor superficie verde, en comparación con los otros genotipos.

En el **estadio de grano lechoso tardío**, en las condiciones de crecimiento, la sequía condujo a un descenso de la asimilación fotosintética del CO_2 en todos los genotipos de cebada que fue menos acusado en la línea 89 y Harrington que en las otras líneas RCSL (Fig. 4.35a). Y con la progresión de la senescencia foliar se observó un descenso de la fotosíntesis tanto en plantas con amplia como con escasa disponibilidad hídrica con respecto a la anterior fase de desarrollo (Tabla 4.31, Tabla 4.32). La fotosíntesis fue mayor en la línea 76 y menor en la línea 89, con valores similares entre Harrington y la línea 8 en plantas de control hídrico. La menor A en la línea 89 podría asociarse con un menor RWC que disminuyó con respecto a la línea 8 y tendió a disminuir con respecto a los otros dos genotipos (Fig. 4.49). La línea 76 tuvo más A que Harrington en plantas de control, y el efecto del déficit hídrico en la A de la línea 76 fue mayor que en la de Harrington, por lo que se atenuaron las diferencias entre ellos hasta el punto de presentar una A similar con escasa disponibilidad hídrica (Fig. 4.35a), lo

que pudo deberse a que la sequía redujo el RWC en la línea 76 (Fig. 4.49). Ambos genotipos, la línea 76 y Harrington, tuvieron un contenido de clorofilas mayor que las líneas 8 y 89 (Tabla 4.42), lo que también pudo favorecer que tuviesen en promedio una mayor A que las otras líneas RCSL (Tabla 4.32). Entre las líneas 8 y 89, aun cuando el contenido de clorofilas y proteínas fue menor en la línea 8 que en la 89, la A fue mayor en la primera que en la segunda línea RCSL en plantas de control hídrico (Fig. 4.35a), lo cual podría asociarse con el mayor RWC encontrado en dichas condiciones (Fig. 4.49) y un mayor contenido porcentual de humedad de las hojas bandera y penúltima (Tabla 4.55) que la línea 89. El efecto más leve del déficit hídrico en la línea 89 que en la línea 8 hizo que las diferencias en la A desapareciesen entre ambos genotipos (Fig. 4.35a). Al igual que la fotosíntesis, el resto de los parámetros de intercambio gaseoso varió entre las líneas RCSL y Harrington con la disponibilidad hídrica. El déficit hídrico redujo la conductancia de los estomas en Harrington y las líneas 8 y 89 y tendió a disminuirla en la línea 76 (Fig. 4.35b), lo que sugiere una mayor sensibilidad de la g_s al déficit hídrico en los genotipos de cebada que en la anterior fase del desarrollo. La g_s fue menor en la línea 76 en plantas de control hídrico y en la línea 8 en plantas de déficit hídrico y similar entre los restantes genotipos con independencia de la disponibilidad hídrica (Fig. 4.35b). La mayor E la tuvo la línea 76 y la menor la línea 89, y Harrington y la línea 8 tuvieron valores similares en condiciones de control hídrico, y aunque la sequía disminuyó la E, se mantuvo la misma pauta de cambio observada entre los genotipos con amplia disponibilidad hídrica (Fig. 4.35d). La menor superficie verde (Tabla 4.52) y el contenido porcentual de humedad relativamente alto en todos los órganos (Tabla 4.55) de la línea 76 podría ser la causa de su mayor E. Por el contrario, el menor contenido porcentual de humedad de las hojas bandera y penúltima de la línea 89, y de la mayoría de los órganos (Tabla 4.55), junto a la mayor superficie verde del tallo principal (Tabla 4.52) podría indicar que tuvo un mayor déficit hídrico interno, ya anticipado en fases anteriores, lo que podría promover una reducción de la transpiración en este genotipo (Fig. 4.35d). La línea 8 tuvo menor contenido porcentual de humedad del resto de las hojas y el tallo que la línea 76 (Tabla 4.55), junto a una mayor superficie verde (Tabla 4.52), lo que podría justificar la menor E encontrada con respecto a dicha línea. Harrington, por su parte, tuvo contenidos porcentuales de humedad similares a los de la línea 76 (Tabla 4.55), pero mayor superficie verde que ésta (Tabla 4.52) y posiblemente mayor déficit hídrico interno que limitaría la E. El déficit hídrico indujo un descenso de fotosíntesis y condujo también a un aumento de la concentración intercelular de CO_2 en la línea 76, tendió a aumentar la C_i en Harrington y no tuvo efecto significativo en la C_i de las líneas 8 y 89 (Fig. 4.35c), lo que podría ser indicativo de una limitación no estomática de la fotosíntesis en los dos primeros genotipos. Con concentraciones elevadas de CO_2 en la medida la inhibición de la fotosíntesis por la sequía observada con concentración de CO_2 ambiente desapareció en gran medida, hasta el punto de desaparecer la interacción (Tabla 4.32). La disminución de g_s inducida por el aumento de CO_2 se observó en todos los genotipos con independencia de la disponibilidad hídrica (Fig. 4.36a, Fig. 4.35b). Los descensos de C_i inducidos por la sequía podrían deberse a las disminuciones de g_s (Fig. 4.36b, Fig. 4.35c). Y aunque la sequía redujo la g_s y aumentó C_i en la línea 76 y tendió a hacerlo en Harrington y no tuvo efecto en las líneas 8 y 89 en las medidas con CO_2 ambiente, con CO_2 elevado disminuyó C_i . Esto se asoció con la desaparición del efecto negativo de la sequía en la fotosíntesis encontrado en CO_2 ambiente e indicaría que el déficit hídrico no inhibió la regeneración de la RuBP o el transporte de electrones sino que más bien pudo reducir la difusión del CO_2 .

5.2.2.- El déficit hídrico altera la partición del C y N en las hojas y los entrenudos del tallo. Relación con la actividad de los enzimas y/o la expresión de genes de su síntesis y/o degradación.

5.2.2.1.- Partición del C y N en las hojas.

Como se ha indicado anteriormente, el déficit hídrico en el segundo experimento fue menos severo y se impuso en una etapa del desarrollo ligeramente más avanzada que en el primero, y la toma de muestras desde el inicio del desarrollo del grano se realizó a intervalos de tiempo más próximos. Y a diferencia del anterior experimento, se ha investigado si la alteración en la partición del carbono y del nitrógeno en hojas y en las fracciones del tallo se relaciona con cambios en la actividad y/o el nivel de expresión de alguno de los enzimas que participan en su síntesis y/o degradación.

En el **inicio del desarrollo del grano**, aun cuando el déficit hídrico condujo a un descenso de la asimilación fotosintética del CO₂ (Fig. 4.31a), el contenido foliar de carbohidratos solubles en agua aumentó, como consecuencia del aumento de sacarosa y fructanos (Tabla 4.33). Un aumento del contenido foliar de carbohidratos solubles en agua se ha encontrado en otros estudios (Kim *et al.*, 2000; Cramer *et al.*, 2007). Entre las respuestas más inmediatas de las plantas al déficit hídrico se encuentran la inhibición del desarrollo de la parte aérea de la planta y de la expansión foliar, lo que disminuye la demanda metabólica de la planta y facilita la acumulación en las hojas de compuestos osmóticamente activos (Bhargava and Sawant, 2013), en conformidad con la disminución de la superficie verde foliar y del tallo principal observada en nuestro estudio (Tabla 4.50), que se acompañó también de un descenso del peso seco de las mismas (Tabla 4.56). El cv. Harrington y la línea 89 tuvieron un mayor contenido de sacarosa que las otras líneas RCSL, y la línea 89 tuvo también un mayor contenido de fructanos, lo que sugiere una mayor partición del carbono para fructanos foliares en la línea 89 y muy posiblemente una mayor capacidad de ajuste osmótico. Estudios previos han indicado un papel protector de los fructanos en las plantas sometidas a sequía (Kawakami and Yoshida, 2005). Los niveles de hexosas y almidón variaron entre las líneas RCSL y Harrington con la disponibilidad hídrica (Fig. 4.37). Así, en condiciones de control hídrico el contenido de almidón fue similar entre la línea 8 y Harrington y mayor que el de las líneas 76 y 89, con valores similares entre ellas, pero la sequía redujo el contenido de almidón en Harrington y la línea 8 hasta el punto de que las diferencias entre genotipos desaparecieron (Fig. 4.37c), lo que indica que con amplia disponibilidad hídrica la mayor provisión de carbono fotosintético facilitó la acumulación de almidón en Harrington y la línea 8, mientras que en condiciones de déficit hídrico muy posiblemente se favoreció la partición del carbono hacia la síntesis de carbohidratos con capacidad osmótica. El déficit hídrico indujo la acumulación de glucosa y fructosa en la línea 89, y de fructosa en la línea 76 aunque la glucosa tendió a aumentar (Fig. 4.37a, Fig. 4.37b). El aumento de hexosas inducido por la sequía sugiere un incremento de la hidrólisis de sacarosa por invertasas, por la proporcionalidad de las cantidades de glucosa y fructosa, aunque no se descarta la posible hidrólisis de fructanos y/o almidón. Aun cuando las hexosas aumentaron notablemente, el menor contenido de fructosa que de glucosa observado en la línea 89 en condiciones de déficit hídrico podría indicar que tuvo lugar una inducción de la biosíntesis de fructanos (Koroleva *et al.*, 1998; Morcuende *et al.*, 2004). En nuestro estudio hemos encontrado un aumento de la expresión génica de la invertasa de pared celular CWINV2 inducido por la sequía en todos los genotipos (Tabla 4.46), aunque no logró alcanzar significación estadística, asociado con el ligero aumento de los niveles de hexosas observados en todos ellos. Además, el aumento de transcritos inducido por la sequía con respecto a las plantas

control fue mayor en la línea 89 que en ningún otro genotipo, en conformidad con el incremento de hexosas antes descrito en dicha línea RCSL. Se ha mostrado que las hojas generalmente presentan una elevada actividad invertasa (Koroleva *et al.*, 1997). Un aumento de la expresión de varios genes que codifican invertasas ácidas solubles vacuolares involucradas en la hidrólisis de sacarosa y la conversión en fructanos inducido por la sequía se ha encontrado en trigo (Xue *et al.*, 2008a). Del mismo modo en plantas de maíz se han mostrado evidencias de que la sequía moderada condujo a un aumento de actividad invertasa que se acompañó de un aumento de la expresión génica y de la proteína invertasa vacuolar (Kim *et al.*, 2000). La sacarosa es el sustrato para la síntesis de fructanos en la vacuola por medio de las fructosiltransferasas, los cuales son hidrolizados a fructosa y fructano de menor peso molecular por las fructano exohidrolasas (Morcuende *et al.*, 2004; Kawakami and Yoshida, 2005). Los niveles de transcritos de los genes que codifican las fructosiltransferasas variaron entre genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.46). De manera que la escasez en la disponibilidad hídrica atenuó la represión génica, con referencia a las plantas de control de Harrington, de la 1-SST en la línea 89, en contraste con el ligero descenso de transcritos inducido en Harrington y la notable reducción de la expresión génica de la 1-SST inducida en la línea 76 y mayor aún en la línea 8. Por otra parte, el déficit hídrico no tuvo efecto en la expresión del gen que codifica la 6-SFT en la línea 89, mientras que en el resto de genotipos indujo un notable descenso de la expresión de dicho gen. Además, la escasez hídrica indujo un notable aumento de la expresión génica de la 1-FFT en la línea 89 y no tuvo efecto en los demás genotipos (Tabla 4.46). La posible inducción de la biosíntesis de fructanos por el déficit hídrico en la línea 89 antes sugerida podría asociarse con un aumento de expresión de la 1-FFT, con una atenuación de la represión génica inducida por el déficit hídrico en la 1-SST y con unos niveles de transcritos similares de la 6-SFT con respecto a las plantas control. Lo que contrasta con los notables descensos de los niveles de transcritos de los genes que codifican la 1-SST y 6-SFT inducidos por la sequía en los demás genotipos, particularmente en las líneas 8 y 76, que tuvieron mayor nivel de expresión de dichos genes en condiciones de control hídrico que la línea 89, aunque únicamente la expresión de la 1-SST alcanzó significación estadística. Estos resultados muestran una mayor sensibilidad al déficit hídrico de la regulación transcripcional de los genes que codifican la 1-SST y 6-SFT, enzimas responsables de la síntesis de fructanos con uniones $\beta(2-6)$ (Kawakami and Yoshida, 2005; Van den Ende *et al.*, 2005), que del gen que codifica la 1-FFT, dado que pareció mostrar una mayor estabilidad entre genotipos con independencia de la disponibilidad hídrica. La 1-FFT interviene junto con la 1-SST en la síntesis de fructanos con uniones $\beta(2-1)$. La sequía indujo también un aumento de los niveles de transcritos del gen que codifica la 1-FEH (Tabla 4.46), y aunque entre genotipos no hubo diferencias significativas en el patrón de expresión de este gen, la sequía superó la represión génica encontrada en plantas control en las líneas 76 y 89. El patrón de expresión de los genes del metabolismo del carbono parece indicar que la sequía facilitaría la acumulación de fructanos con uniones $\beta(2-1)$. Estos resultados difieren de aquellos mostrados en plantas de trigo en etapas más tempranas del desarrollo foliar sometidas a un déficit hídrico intenso, en las que la expresión de la 6-SFT en las hojas no varió con la disponibilidad hídrica y la expresión de la 1-SST y 1-FFT fue aumentada (Xue *et al.*, 2008a). Si bien, los niveles de transcritos del gen que codifica la 1-FEH aumentaron en plantas sometidas a sequía severa, de acuerdo con los cambios de expresión encontrados en nuestro estudio.

No obstante, cabe señalar que aun cuando se ha descrito que la sacarosa induce la expresión de las fructosiltransferasas (Müller *et al.*, 2000), el aumento de sacarosa inducido por la sequía en el inicio del desarrollo del grano en nuestro estudio no se acompañó de una inducción de la expresión génica de la 1-SST y la 6-SFT, por lo que otros factores podrían modular la expresión de las fructosiltransferasas. Se ha descrito que el nitrato es una señal negativa para la expresión de al

menos una de las fructosiltransferasas, la 6-SFT, en cebada (Morcuende *et al.*, 2004) y aunque no se ha determinado el contenido de nitrato, muy posiblemente pudo aumentar puesto que la sequía indujo un aumento del contenido de proteínas solubles foliares (Tabla 4.42). Y conviene reseñar que la sacarosa es no sólo el sustrato para la síntesis de fructanos sino que también aumenta la actividad de las fructosiltransferasas (Müller *et al.*, 2000; Joudi *et al.*, 2012). Por tanto, se muestran evidencias sobre la escasez de paralelismo entre el nivel de expresión génica, el contenido de proteína y la actividad y los productos de la reacción que se han observado en otros estudios (Scheible *et al.*, 1997c; Morcuende *et al.*, 1998). Y se confirma que la evaluación exclusiva de la expresión génica resulta insuficiente y debería ir acompañada de la valoración de la actividad y la cantidad de proteína, así como de los sustratos y/o productos de reacción.

La alteración en la partición del carbono a nivel foliar inducida por la sequía entre los genotipos de cebada muy posiblemente pudo modificar la asimilación del nitrógeno, que requiere energía y esqueletos carbonados para la asimilación del nitrógeno en compuestos orgánicos nitrogenados. Por ello, en este estudio se ha determinado el contenido de proteínas, la actividad y el nivel de expresión de la nitrato reductasa, el enzima clave regulador de la asimilación del nitrógeno en plantas. El déficit hídrico condujo a un notable aumento, que fue estimado en un 26.7% (Tabla 4.42), del contenido de proteínas solubles con respecto a las plantas control, lo que sugiere que tuvo lugar una estimulación de la biosíntesis de proteínas, o bien una disminución de su degradación y/o exportación a otros órganos con la sequía. La actividad nitrato reductasa varió entre los genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.45). Así, el déficit hídrico indujo un notable aumento de la actividad NR máxima y selectiva en todos los genotipos de cebada, con la excepción de la línea 8, en la que no logró alcanzar significación estadística (Fig. 4.47a, Fig. 4.47b). La actividad NR tanto en presencia como en ausencia de Mg^{+2} fue mayor en la línea 8 que en los demás genotipos con amplia disponibilidad hídrica, aunque la diferencia con la línea 76 en NR máxima no fue significativa (Fig. 4.47a). Los niveles de transcritos del gen que codifica la NR fueron mayores en la línea 8 en plantas de control hídrico que en ningún otro genotipo, aunque los transcritos no variaron significativamente con respecto a la línea 89 (Tabla 4.46), por lo que muy posiblemente la mayor actividad NR en la línea 8 podría asociarse con un mayor nivel de proteína. Y el hecho de que la sequía no condujese a un aumento significativo de la actividad máxima y selectiva de la NR en la línea 8, pudo deberse a la atenuación de la expresión génica con respecto a las plantas control, lo que contrasta con la importante estimulación de la acumulación de transcritos del gen que codifica la NR en Harrington y la línea 76 o con el mantenimiento de la expresión del enzima encontrado en la línea 89 (Tabla 4.46). Además, la actividad NR del cv. Harrington fue mayor que la de las líneas RCSL con escasa disponibilidad hídrica (Fig. 4.47a, Fig. 4.47b), lo que pudo posiblemente deberse a que en Harrington la sequía condujo a una mayor acumulación de transcritos, y probablemente a mayor proteína, con respecto a las plantas control que en los demás genotipos (Tabla 4.46). Un aspecto interesante fue comprobar que el estado de activación de la NR en Harrington y las líneas 8 y 89 fue similar con independencia de la disponibilidad hídrica del suelo (Fig. 4.47c), mientras que el déficit hídrico aumentó el estado de activación de la NR en la línea 76, lo que condujo a que el estado de activación de la NR en esta línea no variase con respecto a los demás genotipos con escasa disponibilidad hídrica frente al menor estado de activación observado en plantas de control hídrico (Fig. 4.47c). Este aumento del estado de activación de la NR inducido por la sequía en la línea 76 no se relacionó con un incremento del contenido foliar de sacarosa que se ha mostrado que incrementa la actividad y el estado de activación de la NR (Morcuende *et al.*, 1998), lo que sugiere que otro mecanismo de regulación post-traducciona l pudo estar implicado. Estos resultados en su conjunto muestran que el aumento de actividad NR inducido por el déficit hídrico se acompañó de una estimulación de la asimilación del

nitrógeno y de la biosíntesis de proteínas, aunque no descarta una disminución de su degradación o exportación a otros órganos, lo que se tradujo en un aumento del contenido foliar de proteínas solubles. Lo cual contrasta con el descenso del contenido proteico encontrado durante la post-antesis de la cebada en plantas sometidas a un déficit hídrico más severo que en este estudio en el anterior experimento (Tabla 4.12). Además, la línea 76 tuvo un mayor contenido de proteínas que el cv. Harrington y la línea 8, que tuvieron contenidos similares, y tendió a aumentar con respecto a la línea 89 (Tabla 4.42). Un mayor contenido de proteínas foliares en la línea 76 también se observó en el anterior experimento en una etapa más avanzada del desarrollo, en concreto en el estadio de grano lechoso tardío, ya que en el inicio del desarrollo del grano no alcanzó significación estadística (Tabla 4.12), lo que sugiere que debe de ser una característica propia del genotipo con independencia de la disponibilidad hídrica.

El aumento de actividad NR observado en nuestro estudio difiere del descenso frecuentemente encontrado en plantas sometidas a estrés hídrico (Ferrario-Méry *et al.*, 1998; Foyer *et al.*, 1998; Mahan *et al.*, 1998; Correia *et al.*, 2005; Fresneau *et al.*, 2007) de la ausencia de efecto encontrada en plantas de tomate (Brewitz *et al.*, 1996) y de la variabilidad de efectos según la intensidad del déficit hídrico en plantas de *Arabidopsis*, en las que la actividad del enzima disminuyó notablemente con un déficit hídrico intenso y no con déficit moderado (Hummel *et al.*, 2010). La actividad NR es coordinada con la fotosíntesis y la disponibilidad de esqueletos carbonados tanto a nivel transcripcional como post-traducciona (Foyer *et al.*, 1998) y la expresión génica de la NR está sujeta a un ritmo circadiano (Scheible *et al.*, 1997a). El nitrato es un potente inductor de la expresión génica del enzima (Cheng *et al.*, 1986) y los azúcares también inducen la expresión de la NR (Cheng *et al.*, 1992; Vincentz *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 2000), mientras que la glutamina reprime la transcripción de la NR (Vincentz *et al.*, 1993). De acuerdo a la bibliografía, la disminución de la actividad NR se vincula al descenso de fotosíntesis por cierre de los estomas (Kaiser and Brendle-Behnisch, 1991) más que al estrés hídrico en sí mismo (Sharkey, 1990). Foyer *et al.* (1998) y Ferrario-Méry *et al.* (1998) asociaron el descenso de actividad NR en hojas de plantas de maíz y tabaco sometidas a sequía con un descenso de transcritos de la NR y sugirieron que posiblemente tuvo lugar un descenso de la síntesis de proteínas debido a una inhibición de los procesos que involucran la transcripción y la formación de proteína NR por disminución del contenido de nitrato debido a la escasez de la disponibilidad de nutrientes bajo sequía. Correia *et al.* (2005) también asociaron el descenso de actividad NR en girasol con un agotamiento de nitrato. Nuestros resultados, por el contrario, muestran que el aumento de actividad NR inducido por la sequía se acompañó de un aumento de transcritos de la NR, que podría relacionarse con el mantenimiento del contenido de nitrato con la sequía suave impuesta a las plantas, lo que posiblemente facilitó la síntesis de la proteína NR a diferencia de los resultados previamente descritos.

En el **estadio de grano lechoso medio**, el déficit hídrico condujo a un aumento del contenido de carbohidratos solubles en agua que se relacionó con la mayor acumulación de sacarosa, fructosa y glucosa, puesto que los fructanos no variaron con la disponibilidad hídrica y el almidón disminuyó (Tabla 4.34). Los carbohidratos solubles aumentaron con la escasez en la disponibilidad hídrica en menor medida que en el inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.33), ya que el incremento con respecto a las plantas control se estimó en un 11.5% en esta fase frente al 35.3% observado en la anterior fase del desarrollo. Esta menor acumulación de WSC con el déficit hídrico derivó de un 13.2% de aumento del contenido de carbohidratos en plantas de control hídrico y de un 15.8% de descenso en plantas de déficit hídrico con respecto al inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.33). Estos resultados parecen indicar que la limitación de la fotosíntesis inducida por la sequía no fue

suficiente para mantener la provisión de fotoasimilados requeridos por los órganos colectores de asimilados, lo que muy posiblemente promovió la removilización de los carbohidratos de reserva para facilitar la exportación de sacarosa, como indican los menores contenidos de almidón, fructanos y sacarosa con respecto al inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.34, Tabla 4.33). Por el contrario, en las plantas de control hídrico, la mayor provisión de asimilados fotosintéticos con respecto a las plantas de déficit muy posiblemente pudo satisfacer la demanda de carbono requerida por otros órganos, aunque parece que tuvo lugar una ligera degradación de almidón y se acumularon fructanos y sacarosa (Tabla 4.34, Tabla 4.33). La capacidad de acumulación de carbohidratos solubles e insolubles varió entre los genotipos, ya que las líneas 8 y 89 tuvieron un mayor contenido de almidón que la línea 76 y Harrington, con valores similares entre cada uno de los genotipos de ambos grupos (Tabla 4.34). El mayor contenido de fructanos lo tuvo también la línea 89 y los demás genotipos tuvieron niveles similares de dicho carbohidrato, mientras que el contenido de sacarosa fue mayor en Harrington y la línea 89 que en las otras líneas RCSL. Puesto que los niveles de hexosas no variaron entre genotipos, los resultados parecen indicar que la línea 89 mostró la mayor capacidad de acumulación de carbohidratos foliares (WSC y almidón) y la línea 76 la menor, y Harrington y la línea 8 con contenidos similares mostraron niveles de carbohidratos entre las otras líneas RCSL. Cierta variabilidad genotípica en el patrón de acumulación de carbohidratos se ha encontrado en otros estudios (Ehdaie *et al.*, 2008).

Al igual que en la anterior fase del desarrollo, el déficit hídrico aumentó el contenido foliar de proteínas un 12.5% con respecto a las plantas de control (Tabla 4.42). El porcentaje de aumento fue inferior al encontrado en el inicio del desarrollo del grano, ya que el contenido de proteínas solubles disminuyó un 28% en plantas de control hídrico y un 39.7% en plantas de déficit hídrico con respecto dicha fase del desarrollo (Tabla 4.42). Esto parece indicar que la exportación de proteínas foliares y/o degradación fue mayor en plantas de déficit hídrico que en plantas de control hídrico con el avance del desarrollo de las plantas. El déficit hídrico condujo también a un aumento de la actividad nitrato reductasa (Tabla 4.45), lo que sugiere que la estimulación de la asimilación del nitrógeno se acompañó de una inducción de la biosíntesis de aminoácidos y posterior síntesis de proteínas (Morcuende *et al.*, 1998), sin obviar la degradación y/o exportación ya mencionada con anterioridad. La línea 89 tuvo el menor contenido de proteínas foliares y también la menor actividad NR (Tabla 4.42, Tabla 4.45), y la línea 76 tuvo el mayor contenido de proteínas foliares (Tabla 4.42) y una mayor actividad NR máxima que los demás genotipos, aunque la diferencia con Harrington no fue significativa (Tabla 4.45). El contenido de proteínas foliares en Harrington y la línea 8 fue similar (Tabla 4.42), si bien la actividad NR fue mayor en la línea 8 que en Harrington (Tabla 4.45). Los resultados parecen mostrar un buen paralelismo entre la actividad máxima de la NR y los niveles de proteínas foliares.

La actividad nitrato reductasa selectiva varió entre las líneas RCSL y Harrington con la disponibilidad hídrica al igual que el estado de activación del enzima (Fig. 4.48). La inactivación reversible tiene lugar cuando la proteína NR fosforilada interacciona con una proteína inhibidora del tipo 14-3-3 en presencia de Mg^{+2} (Lambeck *et al.*, 2012). Hemos observado que la sequía aumentó la actividad NR selectiva en todos los genotipos con la excepción de la línea 8 (Fig. 4.48a). La línea 89 tuvo una menor actividad NR selectiva que los demás genotipos, con actividades similares, en plantas de control hídrico, mientras que en plantas de déficit hídrico Harrington y la línea 76 tuvieron una mayor actividad NR selectiva que las líneas 8 y 89 (Fig. 4.48a). Además, la sequía indujo un aumento del estado de activación de la NR en la línea 76, al igual que en el inicio del desarrollo del grano, que no tuvo lugar en los demás genotipos, lo que condujo a que aunque en plantas de control la línea 76

tuvo un menor estado de activación de la NR, con la escasez hídrica el estado de activación de la NR fuese similar entre todos los genotipos (Fig. 4.48b). En el estadio de grano lechoso medio, la variabilidad genotípica en el patrón de acumulación de carbohidratos y compuestos nitrogenados evidencia que la línea 89 tuvo el mayor contenido de carbohidratos y el menor contenido de proteínas de todos los genotipos de cebada. Por el contrario, la línea 76 tuvo el menor contenido de carbohidratos y el mayor contenido de proteínas, con cantidades similares en los otros dos genotipos, lo cual corrobora la estrecha interrelación existente entre los metabolismos de carbono y nitrógeno en plantas (Stitt *et al.*, 2002; Scheible *et al.*, 2004). Estudios previos han mostrado que las líneas que acumulan mayor cantidad de WSC contienen menos compuestos nitrogenados y viceversa (McIntyre *et al.*, 2011).

En el **estadio de grano lechoso tardío**, los carbohidratos foliares continuaron acumulándose tanto en plantas con amplia como con escasa disponibilidad hídrica en comparación con el estadio de grano lechoso medio (Tabla 4.35, Tabla 4.34). El aumento de la concentración foliar de WSC y de almidón en este estadio del desarrollo se estimó en un 23.7% y 52.7% para cada uno de ellos en plantas de control hídrico y en un 25.6% y 54.1% en plantas de déficit hídrico, respectivamente, con respecto a la anterior fase (Tabla 4.35, Tabla 4.34). Estos resultados sugieren que la acumulación de WSC y almidón fue mayor, 1.9% y 1.4%, respectivamente, en plantas en déficit que en plantas de control con respecto al estadio de grano lechoso medio. El aumento del contenido de WSC inducido por el déficit hídrico se asoció al aumento de sacarosa, glucosa y fructosa, ya que los fructanos no variaron con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.35), al igual que ocurrió en el estadio de grano lechoso medio (Tabla 4.34). La carencia de efecto de la disponibilidad hídrica en el contenido de fructanos pudo deberse a que los niveles de transcritos de los genes que codifican la 1-SST y la 1-FFT no variaron significativamente con respecto a las plantas de control hídrico (Tabla 4.46). Y aunque la expresión génica de la 6-SFT fue disminuida con la sequía, al igual que en el inicio del desarrollo del grano, la represión génica inducida por el déficit hídrico fue notablemente atenuada con respecto a dicha fase del desarrollo. El déficit hídrico también aumentó los niveles de transcritos de la 1-FEH, lo que pudo facilitar la hidrólisis de fructanos a fructosa y fructano de menor peso molecular (Kawakami and Yoshida, 2005). La mayor expresión del gen que codifica la 1-FEH con la sequía también se observó con anterioridad, aunque el aumento fue más tenue en esta fase del desarrollo. Los niveles de almidón entre los genotipos de cebada variaron con la disponibilidad hídrica, ya que la sequía disminuyó el contenido foliar de almidón en las líneas RCSL y no tuvo efecto en el cv. Harrington (Fig. 4.38). La línea 8 acumuló almidón en mayor medida que los demás genotipos en plantas de control hídrico, los cuales mostraron niveles similares entre ellos. Aun cuando la sequía indujo un mayor descenso del contenido de almidón en la línea 8 y se atenuaron las diferencias entre los genotipos en plantas con escasa disponibilidad hídrica, los niveles de almidón fueron mayores en la línea 8 que en la 76 y tendieron a aumentar en comparación con la línea 89, aunque no variaron con respecto a Harrington (Fig. 4.38). La mayor acumulación de almidón en plantas de control hídrico en la línea 8 podría derivarse o bien de una menor demanda de carbono y, por tanto, una menor translocación de asimilados a otros órganos, o bien de una mayor provisión de carbono fotosintético. El carbono para la síntesis de almidón deriva de los intermediarios del ciclo de Calvin y la actividad fotosintética es uno de los factores determinantes de la acumulación de almidón en las hojas (Geigenberger, 2011). En plantas de control la fotosíntesis de la línea 8 fue similar a la del cv. Harrington, y mayor la de ambos genotipos que la de la línea 89, aunque menor que la de la línea 76 (Fig. 4.35a), por lo que posiblemente la primera propuesta pudiera ser más plausible para explicar la el mayor contenido de almidón en la línea 8 en dichas condiciones, bien porque tuvo lugar una

menor demanda de los órganos colectores de asimilados o que la demanda de carbono para el resto de genotipos fue mayor que para la línea 8.

La línea 8 tuvo el mayor contenido de fructanos y el cv. Harrington el menor, con contenidos similares entre las líneas 76 y 89 (Tabla 4.35). Cambios bastante semejantes se observaron en el patrón de acumulación de transcritos de alguno de los genes que codifican las fructosiltransferasas, particularmente la 1-SST, entre los distintos genotipos (Tabla 4.46). El mayor contenido de fructanos en la línea 8 se asoció con un aumento de transcritos del gen que codifica la 1-SST con respecto al cv. Harrington que fue el genotipo con menor contenido foliar de fructanos y menores niveles de transcritos de dicho gen (Tabla 4.46). Ligeras diferencias en el paralelismo entre expresión de las fructosiltransferasas y contenidos de fructanos fueron observadas en las otras líneas RCSL. Así, las líneas 76 y 89 tuvieron niveles similares de fructanos entre ellas, que fueron mayores que en Harrington y menores que en la línea 8 (Tabla 4.35), y los niveles de transcritos del gen que codifica la 1-SST tendieron a aumentar en ambos genotipos con respecto a Harrington y fueron menores que en la línea 8, si bien no lograron alcanzar significación estadística con respecto a ninguno de ellos (Tabla 4.46). Aún a pesar de que el nivel de expresión de los genes que codifican las otras fructosiltransferasas no varió significativamente entre genotipos, la mayor acumulación de fructanos en la línea 8 pudo deberse no sólo al aumento de la expresión génica de la 1-SST sino también al aumento de transcritos para la 1-FFT y 6-SFT, mientras que la expresión génica de la 1-FEH fue similar a la de Harrington (Tabla 4.46). Estos resultados parecen sugerir que la variabilidad genotípica encontrada en el patrón de acumulación de fructanos en las hojas bandera y penúltima pudo deberse a cambios en el nivel de expresión de los genes que codifican las enzimas que participan en su síntesis, lo que muy posiblemente pudo también redundar en variaciones en el contenido de proteínas. Cabe señalar que entre las líneas RCSL y Harrington se encontraron cambios en el patrón de expresión del gen que codifica la invertasa de pared celular, ya que los niveles de transcritos del gen CWINV2 aumentaron en las líneas RCSL con respecto a Harrington (Tabla 4.46), y la expresión fue ligeramente superior en las líneas 8 y 89 que en la 76, aún mayor en la línea 8, que tuvieron un mayor contenido de fructanos y en las que las hexosas también tendieron a ser más elevadas (Tabla 4.35).

En esta etapa más avanzada del desarrollo del grano, el contenido de proteínas disminuyó un 15.8% en plantas de control hídrico y un 17.8% en déficit hídrico con respecto al estadio de desarrollo de grano lechoso medio (Tabla 4.42), lo que podría sugerir una mayor degradación de proteínas y/o translocación de compuestos nitrogenados a otros órganos en plantas con escasa disponibilidad hídrica. El déficit hídrico condujo a un aumento, que fue estimado en un 10.3%, del contenido de proteínas foliares con respecto a las plantas de control hídrico (Tabla 4.42). Además, el mayor contenido de proteínas lo tuvo Harrington y el menor la línea 8, mientras que las otras líneas RCSL tuvieron niveles similares (Tabla 4.42). La escasez en la disponibilidad hídrica aumentó la actividad NR máxima y selectiva (Tabla 4.45) y aunque los niveles de transcritos del gen que codifica la NR aumentaron con la sequía en Harrington y las líneas 8 y 76, únicamente en este último genotipo alcanzaron significación estadística, mientras que en la línea 89 tendieron a disminuir (Tabla 4.46). Estos resultados parecen mostrar una atenuación de los efectos de la sequía en la expresión génica de la NR encontrados al inicio del desarrollo del grano, como consecuencia posiblemente del descenso del nitrato foliar con la progresión de la sequía y de la senescencia foliar. La actividad NR máxima y la selectiva mostraron una pauta de cambio similar entre los genotipos de cebada, ya que las líneas 8 y 76 tuvieron una mayor actividad NR tanto en presencia como en ausencia de Mg^{2+} que Harrington y la línea 89, mientras que el estado de activación del enzima fue menor en Harrington

que en las líneas RCSL (Tabla 4.45). Se sabe que la sacarosa aumenta el estado de activación de la NR (Morcuende *et al.*, 1998) y la glutamina lo disminuye (Vincentz *et al.*, 1993), Harrington tuvo un contenido foliar de sacarosa menor que las líneas 76 y 89 pero similar al de la línea 8 (Tabla 4.35), por lo que no parece plausible que un menor contenido de sacarosa fuese la causa del menor estado de activación del enzima en Harrington, y aún a pesar de que el contenido de proteínas fue mayor en Harrington, desconocemos si pudiera tener un mayor contenido de glutamina que pudiera modular el estado de activación del enzima. En conjunto, los resultados muestran que Harrington tuvo un mayor contenido de proteínas y una menor actividad NR que la línea 8, que a su vez tuvo el menor contenido de proteínas y la mayor actividad NR, mientras que las líneas 76 y 89 tuvieron niveles similares de proteínas, pero la actividad de la NR fue mayor en la primera línea que en la segunda. No parece, por tanto, que exista correlación entre el nivel de actividad de la NR y el contenido de proteínas entre los genotipos de cebada, por lo que muy posiblemente otros mecanismos como la velocidad de exportación y/o la degradación de las proteínas pudieron influir en la variabilidad genotípica descrita.

5.2.2.2.- Partición del C y N en el último y penúltimo entrenudos del tallo.

En este experimento, a diferencia del anterior, se ha estudiado la capacidad de almacenaje y redistribución de asimilados tanto del último como del penúltimo entrenudo del tallo principal. En los estadios de desarrollo correspondientes al inicio del desarrollo del grano y grano lechoso tardío se ha estudiado la relación entre el contenido de carbohidratos y proteínas en el último entrenudo del tallo con el nivel de expresión de genes que codifican proteínas que participan en su síntesis y/o degradación.

En el estadio de desarrollo correspondiente al **inicio del desarrollo del grano**, el déficit hídrico no tuvo efecto en el contenido de WSC y de almidón en el último entrenudo del tallo, pero redujo la acumulación de fructanos y aumentó la de sacarosa (Tabla 4.36). La carencia de efecto del déficit hídrico en el contenido de carbohidratos solubles en agua en el último entrenudo del tallo concuerda con un estudio de Ehdaie *et al.* (2006b) con plantas de trigo y difiere de los aumentos encontrados en otros estudios con trigo y cebada (Méndez *et al.*, 2011; Del Pozo *et al.*, 2012; Joudi *et al.*, 2012; Khoshro *et al.*, 2014) y de aquellos observados en el anterior experimento. Estudios previos con trigo han mostrado un descenso del contenido de fructanos junto a un aumento de los niveles de sacarosa en el tallo de plantas sometidas a sequía (Yang *et al.*, 2004). Estos resultados parecen indicar que la escasez en la disponibilidad hídrica indujo la hidrólisis de fructanos, lo que muy posiblemente facilitó la translocación de los recursos disponibles para el crecimiento del entrenudo y de la espiga y, por consiguiente, para el desarrollo del grano. La 1-FEH es una de las enzimas involucradas en la hidrólisis de fructanos en cereales (Van den Ende *et al.*, 2005) y su expresión génica aumentó en plantas con déficit con respecto a las de control hídrico (Tabla 4.47), en conformidad con la apreciación antes indicada. El déficit hídrico condujo también a un descenso de transcritos del gen que codifica la 6-SFT y no tuvo efecto en los niveles de transcritos de gen que codifica la 1-SST con respecto a las plantas de control hídrico (Tabla 4.47). McIntyre *et al.* (2011) encontraron una disminución de la expresión génica de la 6-SFT en el tallo de plantas de trigo cultivadas en el campo con escasez hídrica con respecto a aquellas con abundancia de agua. Por lo que la menor acumulación de fructanos en plantas sometidas a déficit hídrico en nuestro estudio pudo relacionarse con la menor expresión de al menos uno de los enzimas que intervienen en su síntesis y la mayor expresión de la 1-FEH, lo que

podría indicar que la escasez en la disponibilidad hídrica facilitó que prevaleciera la degradación sobre la síntesis de fructanos en el último entrenudo del tallo para permitir la exportación de carbono con respecto a las plantas control. En sintonía con dicha apreciación es pertinente indicar que son más los estudios en los que se ha evaluado la actividad de los enzimas involucrados en la síntesis de fructanos en el tallo de plantas con diferentes regímenes hídricos que aquellos en los que se ha determinado la expresión de los genes que codifican dichas enzimas. Algunos de los cuales han mostrado que la reducción del contenido de fructanos en el tallo inducida por la sequía se acompañó de un descenso de actividad de las fructosiltransferasas, junto a un aumento de la actividad fructano exohidrolasa (Wardlaw and Willenbrink, 2000; Yang *et al.*, 2004; Joudi *et al.*, 2012) e invertasa (Wardlaw and Willenbrink, 2000). Resultados que podrían aproximarse a los nuestros con las limitaciones que conlleva el hecho de que los cambios en la expresión de un gen pueden no correlacionarse con el nivel de proteína y/o actividad (Scheible *et al.*, 1997a).

Los contenidos de glucosa y fructosa variaron entre las líneas RCSL y Harrington con la disponibilidad hídrica. La sequía indujo la acumulación de glucosa y fructosa en la línea 89 y no tuvo efecto en los demás genotipos, lo que condujo a que el contenido de ambas hexosas fuese mayor en la línea 89 que en las otras líneas RCSL y Harrington con independencia de la disponibilidad hídrica (Fig. 4.39a, Fig. 4.39b). La mayor acumulación de fructosa que de glucosa con ambos niveles de disponibilidad hídrica en el suelo en la línea 89, mayor aún con déficit hídrico, podría ser indicativo de que tuvo lugar una inducción de la hidrólisis de fructanos. Aun cuando el análisis de la varianza de los datos de expresión génica de la 1-FEH no alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica, sí que pudo observarse que la sequía condujo a un importante aumento de los niveles de transcritos del gen que codifica la fructano exohidrolasa con respecto a las plantas de control hídrico en la línea 89 (Tabla 4.47), de acuerdo con la potencial inducción de la hidrólisis de fructanos sugerida anteriormente. Del mismo modo, el déficit hídrico tendió a aumentar los niveles de transcritos de los genes que codifican la 1-SST y 6-SFT en la línea 89 con respecto a las plantas de control hídrico y aumentó notablemente los niveles de transcritos del gen que codifica la 1-FFT en dicha línea RCSL (Tabla 4.47). Los resultados parecen indicar que la sequía indujo en la línea 89 la expresión de la fructano exohidrolasa, lo que permitiría la hidrólisis de fructanos en fructosa y fructano de menor peso molecular, a la vez que se facilitaría la síntesis de novo de fructanos a partir de sacarosa, como evidencia el aumento de transcritos del gen que codifica la 1-FFT y los cambios en la expresión de la 1-SST y 6-SFT (Tabla 4.47), lo que posibilitaría el mantenimiento del gradiente de sacarosa necesario para satisfacer la demanda de carbono en otros órganos y la síntesis de carbohidratos como reserva temporal. Bien es cierto que la línea 89 fue el genotipo de desarrollo más rápido, como ya se indicó en el anterior experimento y, por ello, posiblemente inició antes la redistribución de reservas en condiciones desfavorables con respecto al resto de genotipos de cebada, pero también tuvo el mayor contenido de fructanos en el último entrenudo del tallo de todos los genotipos (Tabla 4.36), en conformidad con los resultados del anterior experimento aun cuando la sequía fue más acusada. Cierta variabilidad genotípica en el contenido de fructanos en el último entrenudo del tallo pareció observarse en esta fase del desarrollo, la línea 89 tuvo el mayor contenido de fructanos y la línea 76 el menor, con contenidos similares entre Harrington y la línea 8 (Tabla 4.36), lo que sugiere una mayor adscripción del carbono a fructanos en el último entrenudo del tallo en la línea 89. Y el contenido de sacarosa fue también mayor en la línea 89 que en Harrington y la línea 8 y tendió a aumentar con respecto a la línea 76. Estos resultados muestran que los fructanos fueron el principal carbohidrato acumulado en el último entrenudo del tallo (Yang *et al.*, 2004; Ruuska *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2008a), y que en el genotipo con el mayor contenido de sacarosa, el sustrato para la síntesis de fructanos, éstos se acumularon en mayor medida.

Promediado entre genotipos, los cambios en la expresión de los genes del metabolismo del carbono no parecieron relacionarse con los niveles de carbohidratos descritos, con la excepción de la línea 89. Pues los niveles de transcritos de los genes que codifican la 1-SST, 6-SFT, 1-FFT y 1-FEH disminuyeron significativamente en la línea 8 con respecto a Harrington y las otras líneas RCSL, aunque el contenido de fructanos fue similar al de Harrington, mayor que el de la línea 76 y menor que el de la línea 89 (Tabla 4.47, Tabla 4.36). Sin embargo, en el caso de la línea 89, el nivel de expresión de los genes que codifican la 1-SST, 6-SFT y CWINV2 tendieron a aumentar con respecto a los demás genotipos, de acuerdo con el mayor contenido de carbohidratos solubles en agua, principalmente fructanos. Un aumento de la expresión génica de la 1-SST y 6-SFT se ha encontrado en líneas de trigo con alto contenido de carbohidratos solubles en agua en el tallo (McIntyre *et al.*, 2011), y en plantas de trigo con una mayor capacidad de acumulación de fructanos en el último entrenudo del tallo bajo sequía terminal (Khoshro *et al.*, 2014), así como en estudios de expresión génica global que han investigado el papel de los WSC del tallo en el llenado del grano (Xue *et al.*, 2008b). No obstante, en un estudio con varios genotipos con diferente capacidad de acumulación de fructanos en el tallo en el que se ha evaluado la relación entre contenido de fructanos y la actividad de los enzimas de su síntesis se ha mostrado que a menudo no se encuentra relación entre el contenido de fructanos y la actividad de las fructosiltransferasas (Goggin and Setter, 2004), por lo que algo similar podría ocurrir con la expresión génica.

En relación con la partición de compuestos nitrogenados en los genotipos de cebada, el déficit hídrico aumentó el contenido de proteínas en el último entrenudo del tallo (Tabla 4.43), al igual que en el anterior experimento en esta fase del desarrollo del grano. En otras especies vegetales sometidas a sequía se ha encontrado un aumento del contenido de proteínas en el tallo, en conformidad con el papel que desempeña el tallo como reserva temporal de asimilados (Rodrigues *et al.*, 1995; Pinheiro *et al.*, 2001). La expresión génica de la NR varió entre genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.47). Y el déficit hídrico aumentó notablemente los niveles de transcritos del gen que codifica la NR en Harrington y las líneas 76 y 8 y tendió a aumentarlos en la línea 89. Estos resultados parecen mostrar un cierto paralelismo entre el efecto de la sequía en el contenido de proteínas y la expresión génica de la NR en el último entrenudo del tallo. Además, en plantas de control hídrico la línea 89 tuvo una mayor expresión de la NR que los demás genotipos, y en las líneas 8 y 76 fue mayor que en Harrington, mientras que con escasa disponibilidad hídrica la expresión fue similar entre los genotipos (Tabla 4.47). Puesto que el contenido de proteínas no mostró significación para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica, promediado entre genotipos, la expresión de la NR aumentó en la línea 89 con respecto a Harrington y la línea 8, y en las líneas 8 y 76 en comparación con Harrington (Tabla 4.47). Sin embargo, el contenido de proteínas aumentó en la línea 76 y Harrington con respecto a las otras líneas RCSL y en la línea 89 con respecto a la línea 8 (Tabla 4.43). La escasa semejanza entre genotipos en el patrón de expresión de la NR y el contenido de proteínas en el último entrenudo del tallo podría indicar que otros factores como la capacidad de exportación y degradación de proteínas contribuyeron a la variabilidad genotípica observada en la acumulación de proteínas en dicha fracción del tallo.

En el **estadio de grano lechoso medio**, el déficit hídrico aumentó los contenidos de sacarosa y glucosa y tendió a aumentar los de fructosa (Tabla 4.37). El contenido de WSC, fructanos y almidón varió entre genotipos con la disponibilidad hídrica. Así, en condiciones de control hídrico el mayor contenido de fructanos lo tuvo la línea 89 y el menor la línea 76, con contenidos similares la línea 8 y Harrington, pero aun cuando la sequía redujo el contenido de fructanos en Harrington y tendió a hacerlo en las líneas 8 y 76 se mantuvo la misma pauta de cambio entre los genotipos que en las

plantas de control hídrico (Fig. 4.40b). Puesto que los fructanos fueron los carbohidratos mayoritarios en el último entrenudo del tallo, la pauta de cambio entre genotipos con la disponibilidad hídrica del total de carbohidratos solubles fue similar a la de los fructanos (Fig. 4.40a). Cabe recordar que en esta fase del desarrollo el contenido de WSC foliares disminuyó en plantas de déficit hídrico con respecto al inicio del desarrollo del grano como consecuencia posiblemente de la limitación en la provisión de carbono fotosintético inducida por la sequía, por lo que para satisfacer los requerimientos de asimilados de otros órganos de la planta se pudo inducir la exportación de asimilados. Por ello, la disminución del contenido de fructanos y del total de carbohidratos solubles en agua en el último entrenudo del tallo inducida por la sequía en Harrington podría indicar que probablemente la demanda de carbono en dichas condiciones pudo ser mayor y/o que la provisión de fotoasimilados desde las hojas fue menor que en los demás genotipos, lo que pudo promover la removilización de fructanos del último entrenudo del tallo para facilitar la exportación de sacarosa necesaria para el llenado del grano o el crecimiento. Además, en plantas de control hídrico la línea 89 tuvo un mayor contenido de almidón que los demás genotipos, que mostraron contenidos similares entre ellos, pero la sequía redujo los niveles de almidón en la línea 89 y 76 hasta el punto de que el contenido de almidón de la línea 76 fue menor que el de la línea 8 y no variaron significativamente con respecto a los demás genotipos (Fig. 4.40c). Estos resultados indican que el déficit hídrico pudo promover la degradación de almidón en dichas líneas RCSL, lo cual generaría glucosa que podría ser metabolizada a sacarosa, bien para ser exportada, acumulada o utilizada en la síntesis de fructanos.

Cabe señalar que los contenidos de glucosa y fructosa en el último entrenudo del tallo con independencia de la disponibilidad hídrica disminuyeron notablemente con respecto a la anterior fase del desarrollo (Tabla 4.37, Tabla 4.36), lo que sugiere que dichas hexosas fueron metabolizadas a sacarosa bien para mantener la exportación o bien para facilitar su acumulación y/o síntesis de fructanos. Resulta de interés resaltar que con respecto al inicio del desarrollo del grano tuvo lugar una importante acumulación de fructanos y de sacarosa en menor medida en todos los genotipos, exceptuando la línea 76 (Tabla 4.37, Tabla 4.36). En dicha línea RCSL, el contenido de fructanos, promediado con la disponibilidad hídrica, y de sacarosa se mantuvo en un nivel bastante similar al encontrado en la anterior fase del desarrollo, lo que condujo a que en este estadio de desarrollo fuera el genotipo con el menor contenido de sacarosa y, en conformidad con la menor cantidad de sustrato para la síntesis de polímeros de fructosa, de fructanos y del total de WSC (Tabla 4.37). Estos resultados podrían indicar que en la línea 76 predominó la exportación con ambos niveles de disponibilidad hídrica, que pudo ser mayor con escasez de agua por los motivos antes indicados (Fig. 4.40c). Por el contrario, la línea 89 tuvo el mayor contenido de sacarosa, glucosa y fructosa de todos los genotipos (Tabla 4.37), y de fructanos con ambos niveles de disponibilidad hídrica, aunque tendió a aumentar con escasa disponibilidad hídrica (Fig. 4.40b). Todo lo anterior parece indicar que la línea 89 tuvo el mayor contenido de carbohidratos solubles en agua y para satisfacer los requerimientos de carbono con escasa disponibilidad hídrica muy posiblemente se promovió la hidrólisis de fructanos, como sugiere también el descenso de almidón, por lo que aumentaron los niveles de hexosas. Esto podría facilitar la síntesis de fructanos de menor peso molecular más fácilmente metabolizables y posiblemente con mayor capacidad de ajuste osmótico en las condiciones indicadas. En la línea 8 y Harrington el patrón de cambio de los carbohidratos cualquiera que fuera su naturaleza fue bastante similar con las peculiaridades discutidas en el párrafo anterior.

El contenido de proteínas en el último entrenudo del tallo varió entre las líneas RCSL y Harrington con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.43). En plantas de control hídrico la línea 76 tuvo un mayor contenido de proteínas que Harrington y la línea 8 y un contenido similar al de la línea 89, pero el

déficit hídrico indujo una mayor acumulación de proteínas en la línea 89 y menor en la línea 76 que en Harrington y la línea 8 hasta el punto de que aumentó el contenido de proteínas en la línea 89 con respecto a las otras líneas RCSL y Harrington, con valores similares entre ellas (Fig. 4.45). Nuevamente recordar que en esta fase del desarrollo tuvo lugar una importante reducción del contenido de proteínas foliares con respecto al inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.43), aun cuando el déficit hídrico condujo a un aumento del contenido proteico foliar, el descenso de proteínas foliares fue mayor en plantas de déficit que de control hídrico, lo que sugería un aumento de exportación y/o degradación de las mismas. Pues bien, pudimos también comprobar como en el último entrenudo del tallo disminuyó el contenido de proteínas con respecto al inicio del desarrollo del grano, y al igual que en las hojas se mantuvo el efecto del déficit hídrico induciendo la acumulación de proteínas en todos los genotipos, aún a pesar de que muy posiblemente la demanda de compuestos nitrogenados fuese mayor en esas condiciones.

En el **estadio de grano lechoso tardío**, el déficit hídrico redujo el contenido de almidón y condujo a un importante descenso del contenido de carbohidratos solubles en agua en el último entrenudo del tallo con respecto a las plantas de control hídrico que se relacionó con la disminución del contenido de fructanos (Tabla 4.38). Otros estudios han mostrado un descenso en el contenido de fructanos en el tallo de plantas de trigo sometidas a sequía durante el desarrollo del grano (Wardlaw and Willenbrink, 2000). A su vez, la escasez en la disponibilidad hídrica condujo a un aumento de sacarosa y de glucosa y no tuvo efecto en el contenido de fructosa (Tabla 4.38). No obstante, conviene indicar que frente al 35.4% de aumento del contenido de WSC en plantas de control hídrico con respecto al estadio de grano lechoso medio, en las plantas de déficit hídrico sólo aumentó un 6.7% (Tabla 4.38, Tabla 4.37), lo que sugiere que la mayor provisión de fotoasimilados facilitó el almacenaje de carbohidratos en el último entrenudo del tallo, fructanos y almidón, en condiciones de control hídrico. Aun cuando el déficit hídrico condujo a un mayor descenso de transcritos de los genes que codifican la 1-SST y 1-FFT en esta fase del desarrollo en comparación con el inicio del desarrollo del grano, tampoco alcanzaron significación estadística, pero sí que se mantuvo la represión génica inducida por la sequía para la 6-SFT. Además, la escasez en la disponibilidad hídrica del suelo condujo a un aumento de transcritos del gen que codifica la 1-FEH y no tuvo efecto en los transcritos del gen de la invertasa de pared celular (Tabla 4.47). El descenso del contenido de fructanos inducido por el déficit hídrico pudo deberse a una limitación en la síntesis y/o a un aumento de la hidrólisis como sugieren la expresión de las fructosiltransferasas y la 1-FEH. Aun con las limitaciones indicadas de que los descensos en la expresión génica no tienen necesariamente que conducir a un menor contenido de proteína y/o actividad, se ha mostrado que el aumento de actividad fructano exohidrolasa inducido por la sequía condujo a un descenso de fructanos en el tallo (Wardlaw and Willenbrink, 2000).

La línea 89 tuvo un mayor contenido de fructanos, sacarosa, fructosa y glucosa que los demás genotipos (Tabla 4.38), y el importante aumento del nivel de fructosa con respecto al de glucosa sugiere que muy posiblemente en condiciones de déficit hídrico tuvo lugar una mayor hidrólisis de fructanos, ya que como se ha indicado anteriormente la mayor acumulación de fructanos con respecto a la anterior fase del desarrollo tuvo lugar en las plantas de control hídrico, como en los demás genotipos. Al contrario que la línea 89, la línea 76 tuvo el menor contenido de fructanos de todos los genotipos, mientras que la línea 8 y Harrington tuvieron contenidos similares, pero el contenido de sacarosa fue mayor en la línea 76 que en la línea 8 y similar al de Harrington (Tabla 4.38). Los niveles de transcritos del gen que codifica la 1-FEH aumentaron en las líneas 8 y 76 con respecto a Harrington y la línea 89. La expresión génica de la CWINV2 fue mayor en las líneas RCSL

que en Harrington, la de la 1-FFT mayor en la línea 8 que en los demás genotipos, y la línea 8 también tuvo una mayor expresión de la 1-SST que la línea 76, y la línea 89 y Harrington mostraron una expresión similar entre ellas de dicho gen que no varió con respecto a las otras líneas RCSL (Tabla 4.47).

En déficit hídrico condujo a un aumento del contenido de proteínas en el último entrenudo del tallo (Tabla 4.43), al igual que en etapas anteriores del desarrollo del grano, lo que se relacionó con un aumento de los niveles de transcritos del gen que codifica la NR (Tabla 4.47). Entre los genotipos, la línea 76 tuvo el mayor contenido de proteínas de todos los genotipos, y el de Harrington fue mayor que el de las líneas 8 y 89, con contenido similares entre ellas (Tabla 4.43). Cabe señalar que con respecto al estadio de grano lechoso medio, promediado entre genotipos, el contenido de proteínas en el último entrenudo del tallo aumentó en Harrington y la línea 76, tendió a aumentar en la línea 8 y se mantuvo en la línea 89. Y pudo apreciarse también que los descensos de proteínas foliares en las líneas RCSL entre el estadio de grano lechoso medio y tardío sólo redundó en un aumento de proteínas en el último entrenudo del tallo en la línea 76 (Tabla 4.43, Tabla 4.42), por lo que probablemente hubo una mayor exportación de compuestos nitrogenados a los granos en desarrollo. Además, pudo comprobarse que el contenido de proteínas del penúltimo entrenudo del tallo en Harrington y la línea 76 y en menor medida en la línea 8 disminuyó en el estadio de grano lechoso tardío con respecto al de lechoso medio (Tabla 4.44). Esto podría indicar que en esta fase del desarrollo se incrementó la demanda de compuestos nitrogenados en los genotipos indicados y se promovió la redistribución del nitrógeno desde otras partes de la planta.

Con respecto al contenido de carbohidratos y compuesto nitrogenados en el **penúltimo entrenudo del tallo**, en el inicio del desarrollo del grano, los carbohidratos se acumularon en dicha fracción del tallo principalmente como fructanos, en menor medida como sacarosa y hexosas, y la cantidad de almidón fue aún menor (Tabla 4.39), lo que muestra un patrón de acumulación bastante similar al observado en el último entrenudo del tallo, de acuerdo con estudios previos en otros cereales como el trigo (Wardlaw and Willenbrink, 2000). La sequía condujo a un descenso del contenido de carbohidratos WSC y almidón, y a un aumento del contenido de sacarosa, aunque los fructanos, la fructosa y la glucosa variaron en las líneas RCSL y Harrington con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.39). Un descenso del contenido de carbohidratos solubles en agua inducido por la sequía en el penúltimo entrenudo del tallo y en los entrenudos inferiores se ha mostrado en plantas de trigo (Ehdaie *et al.*, 2006b). Además, promediado entre genotipos, el contenido de WSC, en particular fructanos, fue mayor en el penúltimo que en el último entrenudo del tallo, de acuerdo con los resultados de otros autores que han mostrado una mayor acumulación de reservas en el penúltimo entrenudo que en el último entrenudo del tallo (Wardlaw and Willenbrink, 1994; 2000; Ehdaie *et al.*, 2006a; 2006b). Sin embargo, los niveles de sacarosa en esta fracción del tallo fueron bastante similares a los observados en el último entrenudo del tallo con ambos niveles de disponibilidad hídrica.

El contenido de fructanos varió entre genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.39, Fig. 4.41a). Así, en plantas de control hídrico el contenido de fructanos fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, y mayor a su vez en Harrington que en la línea 8 y similar al de la línea 76, pero el déficit hídrico redujo el contenido de fructanos en la línea 89 y en Harrington hasta el punto de que se atenuaron las diferencias entre genotipos, excepto para el contenido todavía mayor en la línea 89 (Fig. 4.41a). Estos resultados indican que el mayor descenso de fructanos inducido por la sequía en la línea 89 muy posiblemente condujo a un aumento del contenido de glucosa y de

fructosa en dicha línea RCSL en las condiciones descritas (Fig. 4.41b, Fig. 4.41c). Los niveles similares de ambas hexosas en plantas de déficit hídrico de la línea 89 parece sugerir que fueron rápidamente metabolizadas, bien en la síntesis de sacarosa y/o fructanos, ya que el déficit hídrico indujo también la degradación de almidón, lo cual generaría glucosa que junto con fructosa permitiría sintetizar sacarosa bien para ser exportada y/o ser utilizada nuevamente en la síntesis de fructanos. Sin embargo, en plantas de control hídrico el descenso de fructosa con respecto a la glucosa parece indicar que se indujo la síntesis de fructanos (Fig. 4.41b, Fig. 4.41c). No obstante, esa variabilidad pudo apreciarse en todos los genotipos con independencia de la disponibilidad hídrica, indicativo de la existencia de una importante removilización y/o redistribución de reservas muy difícil de evaluar. Al margen de dicha dificultad, lo que parece obvio es que la línea 89 tuvo el mayor contenido de fructanos y sacarosa en esta fracción del tallo (Tabla 4.39), al igual que en el último entrenudo del tallo. Esto evidencia la importante variabilidad genotípica existente en la capacidad de acumulación de WSC en el tallo y confirma que existe un componente genotípico en la variación en el contenido de carbohidratos solubles, de acuerdo con otros estudios (Ruuska *et al.*, 2004; 2006). El resto de genotipos mostraron un contenido de WSC bastante similar, si bien el cv. Harrington tuvo un mayor contenido de WSC que la línea 8, mientras que la línea 76 tuvo un contenido semejante a ambos genotipos (Tabla 4.39). Dicha variabilidad entre los genotipos en el total de carbohidratos solubles refleja la variabilidad descrita para el contenido de fructanos según la disponibilidad hídrica del suelo por ser los carbohidratos mayoritarios en esta fracción del tallo.

El contenido de proteínas varió entre los genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.44). Así, en condiciones de control hídrico la línea 89 tuvo un mayor contenido de proteínas solubles que los otros genotipos, y el déficit hídrico indujo la acumulación de proteínas en mayor medida en la línea 76 que en las otras líneas RCSL y tendió a aumentarlas en Harrington hasta el punto de que el contenido de proteínas en las líneas 76 y 89 aumentó con respecto a Harrington y la línea 8, con contenidos similares entre ellas (Fig. 4.46). Los resultados muestran en conformidad con los resultados encontrados en las hojas y el último entrenudo del tallo, que el déficit hídrico aumentó el contenido de proteínas también en esta fracción del tallo y la mayor acumulación de proteínas en la línea 76 inducida por la sequía pudo ser consecuencia de una mayor biosíntesis, una menor exportación y/o una menor degradación.

En el **estadio de grano lechoso medio**, los carbohidratos solubles en agua continuaron acumulándose en el penúltimo entrenudo del tallo, como consecuencia del aumento del contenido de fructanos, con respecto al inicio del desarrollo del grano. Cabe señalar que los niveles de hexosas disminuyeron con independencia de la disponibilidad hídrica, y el efecto del déficit hídrico observado en el anterior estadio de desarrollo desapareció, al igual que ocurrió con la sacarosa (Tabla 4.40, Tabla 4.39). El mayor contenido de sacarosa lo tuvo la línea 89 y el menor la línea 76, y el cv. Harrington y la línea 8 tuvieron contenidos similares, mientras que los niveles de glucosa y fructosa fueron mayores en la línea 89 que en los demás genotipos, los cuales mostraron niveles similares (Tabla 4.40). La variabilidad genotípica descrita en el contenido de sacarosa se reflejó también en el contenido de WSC y fructanos, aunque en interacción con la disponibilidad hídrica en el suelo (Tabla 4.40). Así, en condiciones de control hídrico la línea 89 tuvo el mayor contenido de WSC y fructanos y la línea 76 el menor, con contenidos similares entre Harrington y la línea 8, y aunque el déficit hídrico condujo a un descenso de fructanos y WSC en Harrington y las líneas 8 y 76 y no tuvo efecto en la línea 89, la pauta de cambio del contenido de dichos carbohidratos en condiciones de déficit hídrico no varió entre genotipos (Fig. 4.42a, Fig. 4.42b). Los niveles de almidón también variaron entre los genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.40). La línea 89 tuvo un mayor contenido de almidón

que las otras líneas RCSL y Harrington, y el déficit hídrico redujo los niveles de almidón hasta el punto de que desaparecieron las diferencias entre genotipos (Fig. 4.42c). Estos resultados muestran que el déficit hídrico indujo la degradación de almidón en la línea 89, y en los demás genotipos la de fructanos. Y con independencia de la disponibilidad hídrica, el mayor contenido de fructanos y, por tanto, de WSC lo tuvo la línea 89 y el menor la 76, con contenidos similares en la línea 8 y Harrington, cambios semejantes a los encontrados en sacarosa. Lo cual evidencia la variabilidad genotípica en la capacidad de acumulación de WSC en el tallo según el ambiente (Ehdaie *et al.*, 2006b).

El déficit hídrico indujo la acumulación de proteínas en el penúltimo entrenudo del tallo. La línea 76 tuvo un mayor contenido de proteínas que las demás líneas RCSL y Harrington, y los niveles de proteína de la línea 8 fueron mayores que los de la línea 89 y los de Harrington no variaron con respecto a ninguna de estas dos líneas RCSL (Tabla 4.44). Estos resultados parecen indicar que en la línea 89 tuvo lugar una mayor exportación y/o degradación de proteínas que en los demás genotipos con respecto a la anterior fase del desarrollo, muy posiblemente en condiciones de déficit hídrico.

En el **estadio de grano lechoso tardío**, mientras que los carbohidratos solubles en agua en el penúltimo entrenudo del tallo aumentaron en un 20.4% en plantas de control hídrico con respecto al estadio de grano lechoso medio, en las plantas de déficit hídrico disminuyeron un 1.6% (Tabla 4.41, Tabla 4.40). Las diferencias entre ambos estadios de desarrollo en el contenido de fructanos en plantas de control y déficit hídrico se incrementaron levemente, ya que los fructanos aumentaron un 21.6% en plantas de control hídrico y disminuyeron un 3.8% en plantas de déficit hídrico, lo que sugiere que frente a la acumulación de fructanos en el penúltimo entrenudo del tallo en plantas con amplia disponibilidad hídrica tuvo lugar la removilización de reservas con la progresión de la sequía y del desarrollo de las plantas. El déficit hídrico condujo a un descenso de un 49% del contenido de fructanos con respecto a las plantas de control hídrico y a un aumento del contenido de glucosa y de sacarosa y no tuvo efecto en el de fructosa (Tabla 4.41). El contenido de almidón varió entre los genotipos con la disponibilidad hídrica. Así, en condiciones de control hídrico las líneas RCSL tuvieron un mayor contenido de almidón que el cv. Harrington, y en la línea 89 fue mayor que en la 76 y similar al de la línea 8, pero el déficit hídrico redujo el almidón en las líneas 89 y 76 y tendió a aumentarlo en Harrington, lo que condujo a que el contenido de almidón de la línea 8 aumentase con respecto a las otras líneas RCSL y en Harrington con respecto a la línea 76 (Fig. 4.43). Estos resultados indican que el efecto del déficit hídrico entre Harrington y las líneas RCSL fue diferente, mientras que en el primero tendió a aumentar el contenido de almidón en las líneas RCSL indujo la hidrólisis de almidón, particularmente en las líneas 89 y 76.

Entre los genotipos, la línea 89 tuvo un mayor contenido sacarosa y hexosas que las otras líneas RCSL, pero a diferencia de lo ocurrido en anteriores estadios del desarrollo, el contenido de fructanos fue similar al de la línea 8 y Harrington, y mayor el de todos ellos que el de la línea 76 (Tabla 4.41). Estos resultados sugieren que aun cuando el déficit hídrico indujo una notable degradación de fructanos, para que se atenuasen las diferencias de la línea 89 con respecto a Harrington y la línea 8 en el contenido de fructanos muy posiblemente en dichos genotipos aumentaron proporcionalmente más los fructanos en condiciones de control hídrico que en la línea 89, lo cual podría ser consecuencia de la ligera aceleración del crecimiento observada en este genotipo que facilitaría el uso de los asimilados con independencia de la disponibilidad hídrica. Resulta interesante que el contenido de fructosa fuese notablemente más elevado en la línea 89 que en los demás genotipos y a su vez mayor que el de glucosa, aun a pesar de que el déficit hídrico indujo la degradación de

almidón y cabría esperar un aumento de glucosa en dichas condiciones, pero pudo ser metabolizada a sacarosa para ser exportada o bien ser reutilizada en la síntesis de otros carbohidratos.

El contenido de proteínas en el penúltimo entrenudo del tallo a diferencia de lo observado con el contenido de carbohidratos solubles en agua disminuyó en las plantas de control hídrico con respecto al estadio de grano lechoso medio, mientras que el contenido en plantas de déficit hídrico se mantuvo, lo que condujo a que el aumento en el contenido de proteínas inducido por el déficit hídrico con respecto a las plantas de control hídrico fuese mayor que el observado con anterioridad, los cuales se estimaron en un 32.2% en el estadio de grano lechoso tardío frente al 18.1% encontrado en el estadio de grano lechoso medio (Tabla 4.44). Además, el contenido proteico de esta fracción del tallo disminuyó en todos los genotipos en comparación con la anterior fase del desarrollo, exceptuando el aumento observado en la línea 89. Por ello, la línea 89 tuvo un mayor contenido de proteínas que los demás genotipos, y el de la línea 8 fue mayor que el de Harrington y la línea 76, que mostraron niveles similares. En esta fase del desarrollo probablemente se facilitó la exportación y/o degradación de proteínas en Harrington y las líneas 8 y 76.

5.2.3.- El déficit hídrico afecta al crecimiento del tallo principal durante la post-antesis de la cebada.

5.2.3.1.- Crecimiento durante la fase reproductiva.

En este experimento, en paralelo a la recogida de muestras para los análisis bioquímicos y moleculares se recogieron muestras para el seguimiento de la evolución del crecimiento del tallo principal de la planta, y para poder estimar, en la medida de lo posible, el momento en el que los distintos genotipos pudieron lograr alcanzar la mayor longitud de los entrenudos del tallo y la mayor acumulación de materia seca.

El déficit hídrico redujo la superficie verde de las hojas bandera y penúltima a lo largo de los diferentes estadios de desarrollo evaluados (Tabla 4.50–Tabla 4.52), y mientras que en el inicio del desarrollo del grano el porcentaje de descenso con respecto a las plantas de control hídrico se estimó en un 23.7% (Tabla 4.50), en el estadio de grano lechoso tardío fue de un 32.1%, variabilidad atribuible a la progresión de la senescencia foliar (Tabla 4.52). La reducción de la expansión foliar es una de las respuestas más inmediatas de las plantas al déficit hídrico para preservar la pérdida de agua por transpiración y mantener la turgencia celular (Teulat *et al.*, 1997; 2005). El déficit hídrico condujo también a un descenso, que fue estimado en torno a un 23%, del peso de las hojas con respecto a las plantas control en las distintas fases del desarrollo del grano (Tabla 4.56–Tabla 4.58). No obstante, conviene indicar que la relación entre ambos parámetros de crecimiento no se tiene en consideración en este estudio por las peculiaridades del método experimental utilizado para la estimación de la superficie verde y el peso seco de las hojas, puesto que este último incluye las partes secas de las hojas. La línea 76 tuvo una menor superficie verde foliar que los demás genotipos, los cuales tuvieron superficies similares, entre el inicio del desarrollo del grano y el estadio de grano lechoso medio (Tabla 4.50, Tabla 4.51). Sin embargo, en el estadio de grano lechoso tardío pudo apreciarse que la superficie verde foliar de la línea 89 disminuyó con respecto a Harrington y la línea 8, en las cuales fue similar (Tabla 4.52). La línea 76 tuvo también un menor peso seco de las hojas que las otras líneas RCSL y Harrington, con pesos similares entre ellas, en los dos primeros estadios de desarrollo (Tabla 4.56, Tabla 4.57), mientras que en el estadio de grano lechoso tardío el peso de

las hojas de la línea 89 fue menor que el de la línea 8, y el de Harrington similar al de dichas líneas RCSL (Tabla 4.58). Además, la escasez en la disponibilidad hídrica del suelo no tuvo efecto en la superficie verde del resto de las hojas del tallo principal en los dos primeros estadios de desarrollo investigados (Tabla 4.50, Tabla 4.51) y en el estadio de grano lechoso tardío incluso la aumentó (Tabla 4.52). El déficit hídrico aumentó ligeramente el peso del resto de las hojas en el inicio del desarrollo del grano, efecto que desapareció en los siguientes estadios (Tabla 4.56–Tabla 4.58). Las líneas 76 y 89 tuvieron un área verde del resto de las hojas similar y mayor que el de Harrington y la línea 8, con valores similares entre ellas en el inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.50). En la etapa posterior, la superficie verde de las hojas en el cv. Harrington y las líneas RCSL varió con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.51). Así, en condiciones de control hídrico el área verde del resto de las hojas no varió entre los genotipos, pero el déficit hídrico redujo la superficie verde de la línea 8, tendió a disminuir la de la línea 89 y tendió a aumentar las de los otros genotipos, lo cual condujo a que la línea 8 tuviera el menor área verde, y el de la línea 76 aumentase con respecto a la línea 89 y fuese similar al de Harrington (Fig. 4.51a). Sin embargo, en el estadio de grano lechoso tardío, se atenuaron las diferencias encontradas en la fase anterior hasta el punto de que la línea 8 tuvo una menor superficie verde que Harrington y las otras líneas RCSL, aunque no logró alcanzar significación estadística con respecto a la línea 89 (Tabla 4.52). Por su parte, el peso del resto de las hojas fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, y mayor en Harrington que en la línea 76, y similar el de estos genotipos al de la línea 8 en el inicio del desarrollo del grano (Tabla 4.56), la variabilidad genotípica descrita en el peso del resto de las hojas se atenuó con el avance del desarrollo hasta el punto de que desaparecieron las diferencias en el estadio de grano lechoso tardío (Tabla 4.58). En conjunto, los resultados parecen indicar que la línea 76 tuvo una menor superficie verde de las hojas más jóvenes que los demás genotipos, lo que parece ser una característica inherente al genotipo, a la vez que tuvo una mayor superficie verde del resto de las hojas, similar a la de la línea 89. Con el avance del desarrollo pudo comprobarse que la superficie verde del resto de las hojas disminuyó notablemente en todos los genotipos, no así en las hojas más jóvenes, descenso que fue más acusado en las líneas RCSL que en el cv. Harrington, lo que podría deberse a una senescencia más temprana en las líneas recombinantes.

Con relación a las otras partes del tallo principal, cabe destacar que la superficie verde de la espiga fue aumentando con el avance del desarrollo (Tabla 4.50–Tabla 4.52). El déficit hídrico condujo a un descenso, que se estimó en un 5.8%, de la superficie verde de la espiga con respecto a las plantas de control hídrico (Tabla 4.52). Estudios previos en trigo han mostrado que la sequía antes de la anthesis influye en el tamaño de las espigas (Ehdaie *et al.*, 2008). Del mismo modo, como era previsible, con el avance del llenado del grano, el peso seco de la espiga fue aumentando (Tabla 4.56–Tabla 4.58), y aun cuando el peso no varió significativamente entre las plantas con amplia o escasa disponibilidad hídrica en el estadio de grano lechoso tardío, sí que se apreciaron diferencias en la madurez de las plantas (Tabla 4.58, Tabla 4.60). En la etapa más avanzada del desarrollo, la línea 76 tuvo la menor superficie verde de la espiga, y la de la línea 89 fue mayor que la de Harrington y no varió con respecto a la de la línea 8 (Tabla 4.52). Sin embargo, la línea 89 tuvo el mayor peso de la espiga y la línea 76 el menor, con pesos similares en Harrington y la línea 8 (Tabla 4.58). En el inicio del desarrollo del grano, el déficit hídrico redujo la superficie verde del último entrenudo y del resto del tallo y no tuvo efecto en la del penúltimo entrenudo del tallo (Tabla 4.50). Por el contrario, en el estadio de grano lechoso tardío los efectos de la sequía en las dos primeras fracciones del tallo indicadas se atenuaron hasta el punto de que no variaron con la disponibilidad hídrica, y la superficie verde del penúltimo entrenudo del tallo fue disminuida por la sequía (Tabla 4.52). En esta última fase del desarrollo, la línea 89 tuvo la mayor superficie verde del último y

penúltimo entrenudos del tallo y del resto del tallo y la línea 76 la menor, mientras que Harrington y la línea 8 tuvieron superficies similares de todas ellas (Tabla 4.52). Asimismo, la sequía condujo a un descenso del peso de las distintas fracciones del tallo durante las etapas evaluadas en la post-antesis de la cebada (Tabla 4.56–Tabla 4.58). En el estadio de grano lechoso tardío, la línea 89 tuvo el mayor peso de cada una de las fracciones del tallo y la línea 76 la menor, mientras que Harrington y la línea 8 tuvieron pesos similares de cada una de ellas (Tabla 4.58). La variabilidad genotípica descrita en el último y penúltimo entrenudos del tallo, junto al resto del tallo parecen estar condicionadas por el tamaño de cada uno de los genotipos, puesto que la longitud total de la fracción tallo mostró la misma pauta de cambio que los parámetros de crecimiento descritos. Con independencia de las diferencias genotípicas en las longitudes de cada uno de los segmentos separados de la fracción tallo del tallo principal, pudo apreciarse que la línea 89 fue el genotipo que tuvo una mayor altura, considerando la longitud total de la fracción tallo, de planta y la línea 76 la menor, y Harrington y la línea 8 con alturas similares tendrían una altura intermedia con respecto a las otras líneas RCSL en el estadio de grano lechoso tardío (Tabla 4.59). La pauta de cambio en la longitud de las fracciones del tallo y en el total fue similar a la encontrada en la madurez de las plantas (Tabla 4.61) y evidencia que los diferentes entrenudos del tallo habrían logrado alcanzar su longitud máxima entre los estadios de grano lechoso medio y tardío. Algo similar ocurrió con la acumulación de materia seca de dichas fracciones (Tabla 4.57–Tabla 4.58). Además, la evaluación de los cambios en la biomasa de las fracciones del tallo según el genotipo y la disponibilidad hídrica entre los estadios de grano lechoso medio y tardío puso de manifiesto que la variabilidad observada podría atribuirse a la velocidad de desarrollo de los genotipos. Así, en la línea 89 el momento de acumulación máxima de materia seca para los tres fragmentos en los que se dividió la fracción tallo del tallo principal se alcanzó en el estadio de grano lechoso medio, puesto que en el estadio de grano lechoso tardío se observó un descenso del peso de dichas fracciones (Tabla 4.57, Tabla 4.58), al igual que ocurrió con la acumulación de carbohidratos en el último y penúltimo entrenudos del tallo. En conformidad con la relación existente entre la acumulación de materia seca y carbohidratos solubles en el tallo (Ehdaie *et al.*, 2006b; Dreccer *et al.*, 2009), y que los tallos son el principal órgano de almacenaje de carbohidratos (Bonnett and Incoll, 1992; Blum *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2013; Noorka and Noorka, 2013). En el cv. Harrington se observó que la biomasa promediada con la disponibilidad hídrica de las distintas fracciones del tallo apenas varió entre los estadios del desarrollo antes indicados (Tabla 4.57, Tabla 4.58), aun cuando pudo comprobarse que en el estadio de grano lechoso medio la biomasa del último y penúltimo entrenudos fue disminuida por el déficit hídrico, más aún la del penúltimo entrenudo del tallo en todos los genotipos (Fig. 4.54). Y por último, las líneas 8 y 76 fueron los genotipos que mostraron una tenue subida en el estadio de grano lechoso tardío con respecto al anterior, indicativo de una capacidad de acumulación máxima de materia seca, lo que sugiere que dichas líneas la alcanzaron más tardíamente que Harrington y la línea 89.

Finalmente, la evaluación de los parámetros de crecimiento de las distintas partes del tallo principal nos permitió estimar la biomasa total del mismo en cada uno de los estadios del desarrollo del grano estudiados. En el estadio de grano lechoso tardío, el déficit hídrico redujo en un 10% la acumulación de materia seca de las plantas con respecto a las plantas de control hídrico (Tabla 4.58). Además, la línea 89 tuvo la mayor biomasa y la línea 76 la menor, mientras que Harrington y la línea 8 tuvieron pesos secos del total del tallo principal similares, de acuerdo con la variabilidad genotípica descrita en otras partes separadas del tallo principal.

5.2.3.2.- Crecimiento en la madurez y rendimiento de grano.

En la madurez, al igual que en los anteriores estadios de desarrollo, se determinó la materia seca de cada una de las partes en las que fue fraccionado el tallo principal junto al resto de la parte aérea de la planta lo que nos permitió obtener el rendimiento de la espiga del tallo principal y de la planta como se describió en los capítulos de materiales y métodos y resultados.

En este estudio, la acumulación de biomasa en el tallo principal fue disminuida por el déficit hídrico en un 12.7% con respecto a las plantas control (Tabla 4.60). La imposición de una sequía más suave y de menor duración que en el experimento anterior condujo a un descenso más leve del peso seco del tallo principal, de acuerdo con otros estudios (Xu *et al.*, 2009; Pinheiro and Chaves, 2011; Dolferus *et al.*, 2013). Entre genotipos, la línea 89 tuvo el mayor peso del tallo principal y la línea 76 el menor, y el del cv. Harrington y la línea 8 fue similar. En cuanto al peso de las distintas partes del tallo principal, el déficit hídrico no tuvo efecto significativo en el peso de las hojas bandera y penúltima y aumentó en un 19.4% el peso del resto de las hojas, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos en dichos parámetros, resultados que difieren notablemente de los efectos encontrados con un déficit hídrico moderado en el anterior experimento. El peso de la espiga aumentó con respecto al estadio de grano lechoso tardío (Tabla 4.60, Tabla 4.58) y en esta fase a diferencia de la anterior, el peso de la espiga varió entre los genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.60). Así, el déficit hídrico redujo, con respecto a las plantas de control hídrico, el peso de la espiga en el cv. Harrington y las líneas 8 y 76 un 19.5%, 16.6% y 11.9%, respectivamente, y no tuvo efecto en el de la línea 89 (Fig. 4.59a), lo que sugiere que el efecto del déficit hídrico en la acumulación de biomasa en la espiga fue más acusado en el cv. Harrington que en las líneas RCSL. En plantas de control hídrico, la línea 89 tuvo un mayor peso de la espiga que las otras líneas RCSL y similar al del cv. Harrington, y el mayor descenso inducido por la sequía en Harrington y las líneas 8 y 76 condujo a que las diferencias entre ellos desapareciesen y tuvieran pesos de las espigas similares e inferiores al de la línea 89 (Fig. 4.59a). Promediado con la disponibilidad hídrica, puesto que la biomasa del tallo principal no varió entre genotipos con la disponibilidad hídrica del suelo, la contribución del peso de la espiga a la biomasa total del tallo principal para el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89 fue de un 57.6%, 57.5%, 59.6% y 50.8%, respectivamente (Tabla 4.60), lo que parece indicar que la contribución del peso de la espiga fue mayor en la línea 76 que tuvo la menor biomasa del tallo principal y, por el contrario, la contribución fue menor en la línea 89 que tuvo la mayor biomasa del tallo principal, mientras que en Harrington y la línea 8 la contribución fue similar e intermedia entre las otras líneas RCSL. Al igual que el peso de la espiga, el del último y penúltimo entrenudos del tallo varió entre las líneas RCSL y Harrington con la disponibilidad hídrica, lo cual repercutió en el peso del total de la fracción del tallo (Tabla 4.60). El déficit hídrico redujo, con respecto a las plantas control, el peso del último entrenudo del tallo en Harrington y las líneas 8 y 89 y tendió a disminuirlo en la línea 76 (21%, 25.4%, 31.9% y 15%, respectivamente) y el del penúltimo entrenudo del tallo (27%, 23.3%, 31.5% y 9.6%, respectivamente). En plantas de control el mayor peso del último y penúltimo entrenudos del tallo lo tuvo la línea 89 y el menor la línea 76, con valores similares entre Harrington y la línea 8 (Fig. 4.59b), pero la sequía redujo los pesos hasta el punto de que las diferencias en el peso del penúltimo entrenudo del tallo entre genotipos se atenuaron, excepto por el valor todavía mayor en la línea 89 (Fig. 4.59c), y para el peso del último entrenudo del tallo se mantuvieron las diferencias entre genotipos de las plantas de control (Fig. 4.59b). Estos resultados muestran la variabilidad en la sensibilidad del peso del último entrenudo del tallo a la sequía entre los genotipos que pareció ser más acusada en la línea 89 y menor en la 76. Estudios con trigo han mostrado una amplia variabilidad

en el peso de las fracciones del tallo entre genotipos, además de descensos en el peso de las diferentes fracciones del tallo inducidos por la sequía, particularmente en el último entrenudo del tallo (Ehdaie *et al.*, 2006a). Promediado con la disponibilidad hídrica, la contribución del peso del último entrenudo del tallo a la biomasa del tallo principal representó para el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (7.5%, 8.1%, 6.9% y 8.5%) y para el penúltimo entrenudo del tallo (6.1%, 6.5%, 5.6% y 8.4%). Estos resultados muestran que en la línea 89 la contribución del peso de ambas fracciones a la biomasa del tallo principal es similar, si bien en Harrington y las líneas 76 y 8 fue mayor la contribución del último entrenudo que del penúltimo entrenudo del tallo. El déficit hídrico redujo también el peso del resto del tallo un 15% con respecto a las plantas control, y las líneas 89 y 76 tuvieron el mayor y menor peso del resto del tallo respectivamente, con valores similares entre Harrington y la línea 8 (Tabla 4.60). La contribución del peso del resto del tallo a la biomasa del tallo principal representó para el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (15.7%, 17%, 15.2% y 22.8%). Finalmente, como se ha indicado con anterioridad el peso del total de la fracción tallo varió con la disponibilidad hídrica y mostró exactamente la misma pauta de cambio descrita para el peso del penúltimo entrenudo del tallo (Fig. 4.59d). Aun cuando se han desglosado las contribuciones de los pesos de las distintas fracciones del tallo a la biomasa del tallo principal, puede también inferirse la del total de la fracción tallo, que llegó a representar (29.4%, 31.6%, 27.6% y 39.6%) para el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente. Estos resultados ponen de manifiesto que en la línea 76 la contribución del peso de las fracciones del tallo a la biomasa del tallo principal fue menor, lo que podría indicar que este genotipo favorece la acumulación de biomasa en la espiga. Una vez conocidas las contribuciones de los pesos de la espiga y del total de la fracción tallo pudo estimarse la contribución del total de las hojas a la biomasa del tallo principal y representó para el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (13%, 11.2%, 12.8% y 9.6%).

En esta fase del desarrollo del grano, el déficit hídrico redujo, con respecto a las plantas de control hídrico, la longitud total de la fracción tallo del tallo principal un 8.8% y no tuvo efecto en el resto del tallo (Tabla 4.61). Un descenso del 9% en la longitud del tallo principal inducido por la sequía se ha encontrado en un estudio con un amplio grupo de genotipos de trigo (Ehdaie *et al.*, 2006a). Promediado con la disponibilidad hídrica, la línea 89 tuvo la mayor longitud del resto y del total del tallo y la línea 76 la menor y el cv. Harrington y la línea 8 con longitudes similares (Tabla 4.61). Estos resultados muestran la variabilidad genotípica existente en el tamaño de las plantas, de manera que la línea 89 tuvo la mayor altura y la línea 76 la menor, y Harrington y la línea 8 con una altura similar entre ellas e intermedia a la de las otras dos líneas RCSL, como ya se vislumbró en etapas anteriores del desarrollo del grano y en el anterior experimento. Sin embargo, la longitud del último y penúltimo entrenudos del tallo varió entre los genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.61). En comparación con las plantas control, el déficit hídrico redujo la longitud del último y penúltimo entrenudos del tallo en Harrington (18.4% y 17.5%) y la línea 89 (24.9% y 13.3%), en la línea 8 disminuyó el último entrenudo y tendió a disminuir el penúltimo entrenudo del tallo (17.4% y 8.5%) y en la línea 76 tendió a disminuir el último entrenudo (9.1%) y no tuvo efecto en el penúltimo entrenudo del tallo (Fig. 4.60). Un descenso en la longitud del último y penúltimo entrenudos del tallo inducido por la sequía se ha observado en estudios previos (Ehdaie *et al.*, 2006a). No obstante, las reducciones inducidas por la sequía en la longitud de ambos entrenudos del tallo en nuestro estudio parecen ser mayores que las encontradas por Ehdaie *et al.* (2006a), que mostraron un descenso de un 15% para el último entrenudo y de un 9% para el penúltimo entrenudo del tallo. En plantas de control hídrico la línea 89 tuvo la mayor longitud de ambos entrenudos del tallo, los otros tres genotipos tuvieron longitudes similares del último entrenudo del tallo, y la longitud del

penúltimo entrenado del tallo fue mayor en Harrington y la línea 8 que en la 76, pero el descenso inducido por la sequía en cada uno de los genotipos hizo que la longitud del último entrenado fuera mayor en la línea 89 que en la línea 8 y similar a la de Harrington y la línea 76, y la del penúltimo entrenado mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, con valores similares entre ellos (Fig. 4.60). Estos resultados constatan una elevada variabilidad genotípica en la sensibilidad de la longitud de ambos entrenados al déficit hídrico. La sensibilidad fue mayor en Harrington y la línea 89, aunque el efecto de la sequía fue similar para ambos entrenados en Harrington y mayor en el último entrenado que en el penúltimo entrenado del tallo en la línea 89, la sensibilidad mostrada por la línea 8 fue menor que en dichos genotipos pero con una pauta similar a la indicada para la línea 89, mientras que en la línea 76 únicamente la longitud del último entrenado del tallo fue muy tenuemente afectada. Puesto que los entrenados se alargan secuencialmente hacia arriba (Borrell *et al.*, 1993), el último entrenado en desarrollarse parece mostrar una mayor sensibilidad a la sequía de menor intensidad en las líneas RCSL, con la variabilidad genotípica descrita, a diferencia del cv. Harrington en el que la sensibilidad de los entrenados parece ser similar. La separación de los dos entrenados superiores de la fracción tallo puso de manifiesto las diferencias en longitud entre ellos, siendo menor la del penúltimo que la del último entrenado del tallo. En conformidad con estudios previos de Molina Cano *et al.* (1989) que indicaron que la longitud de los entrenados del tallo en plantas de cebada se va haciendo mayor a medida que se alejan de la base, de manera que el entrenado más próximo a la espiga será más largo que los entrenados inferiores.

Se ha indicado que la capacidad de acumulación potencial de reservas en el tallo y su movilización dependen de la longitud y del peso de los entrenados del tallo, y la relación entre ambos parámetros determina el peso específico (Ehdaie *et al.*, 2008). El déficit hídrico disminuyó un 7.2% el peso específico del último entrenado del tallo con respecto a las plantas control. El peso específico del último entrenado del tallo fue mayor en la línea 89 que en los demás genotipos, mayor en Harrington y la línea 8 que en la línea 76, y mayor en la línea 8 que en Harrington (Tabla 4.62). En la madurez se ha observado un descenso de este parámetro para cualquiera de las fracciones del tallo con respecto al encontrado en etapas anteriores del desarrollo del grano (datos no mostrados), los cuales podrían ser indicativos de la pérdida de materia seca de dichas fracciones (Ehdaie *et al.*, 2008). El descenso del peso específico del último entrenado del tallo con respecto al estadio de grano lechoso tardío en Harrington y las líneas 8 y 76, y al estadio de grano lechoso medio para la línea 89, que fue como se ha indicado anteriormente cuando alcanzó la máxima acumulación de materia seca, se ha estimado que fue para Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (20.1%, 20%, 13.4% y 24.6%). El peso específico del penúltimo entrenado y resto del tallo, junto al total del tallo en la madurez varió entre genotipos en interacción con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.62). Y la sequía redujo el peso específico del último entrenado del tallo en todos los genotipos (Fig. 4.61a), pero el del resto del tallo únicamente en la línea 89, aunque tendió a disminuirlo en Harrington y la línea 8 y no tuvo efecto en la línea 76 (Fig. 4.61b). Aun a pesar de los descensos inducidos por la sequía en el peso específico del penúltimo entrenado del tallo, se comprobó que con ambos niveles de disponibilidad hídrica el mayor peso específico lo tuvo la línea 89 y el menor la línea 76, con valores similares entre Harrington y la línea 8 (Fig. 4.61a), las pautas de cambio del resto del tallo fue algo diferente ya que con ambos niveles de disponibilidad hídrica el mayor peso específico del resto del tallo lo tuvo la línea 89, con valores similares entre los demás genotipos (Fig. 4.61b). Promediado con la disponibilidad hídrica, el descenso del peso específico del penúltimo entrenado del tallo en la madurez con respecto al estadio de máxima capacidad de acumulación fue para Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (31.5%, 36.2%, 18.9% y 27.8%) y para el del resto del tallo (27.5%, 38.2%, 27.3% y 29.5%). Estos resultados indican una gran variabilidad genotípica en los descensos del

peso específico de las distintas fracciones del tallo entre el momento de acumulación máxima potencial de reservas y la madurez. Y muestran que el descenso del peso específico en el cv. Harrington fue mayor en el penúltimo entrenudo del tallo y en las RCSL en el resto de tallo, con contribuciones diferentes de ambos entrenudos entre ellas.

Finalmente, con relación al rendimiento de grano de la espiga del tallo principal, el déficit hídrico redujo, con respecto a las plantas de control hídrico, el número de granos un 7.4% y como consecuencia el peso del grano disminuyó también un 13.6%, mientras que la disminución del peso por grano fue de un 6.6% (Tabla 4.64). Como era previsible, la sequía de menor intensidad indujo un menor descenso del rendimiento de grano que en el anterior experimento. La línea 8 tuvo el mayor número de granos en la espiga principal pero con un menor peso por grano, por lo que la mayor producción de granos sería una característica de este genotipo, que no se refleja en el peso del grano que fue similar al del cv. Harrington y la línea 76 (Tabla 4.64), lo que sugiere que produjo granos de menor tamaño. Por el contrario, la línea 89 presentó el mayor peso del grano y peso por grano, mientras que tuvo un menor número de granos que la línea 8 y similar al de Harrington y la línea 76 (Tabla 4.64), indicativo de que generó granos de mayor tamaño. Por su parte, el cv. Harrington y la línea 76 tuvieron un número de granos similar a los de la línea 89, pero un menor peso del grano que dicha línea RCSL, indicativo de que tuvieron granos de menor tamaño que la línea 89 y mayores que los de la línea 8. No obstante, entre Harrington y la línea 76 el peso por grano varió de manera que Harrington tuvo granos de una tamaño ligeramente mayor que los de la línea 76. Además, la contribución del peso del grano al peso de la espiga fue mayor en la línea 76 que en los demás genotipos (77.1%, 78.8%, 84.6% y 75%, cv. Harrington y líneas 8, 76 y 89, respectivamente). Dicha apreciación parece indicar que la línea 76 tuvo una mayor asignación de materia seca al grano que al resto de estructuras de la espiga, mientras que la asignación en Harrington y la línea 8 fue ligeramente superior que en la línea 89 y similar entre ellos.

5.2.4.- El déficit hídrico afecta a la acumulación de biomasa y rendimiento de grano de las plantas de cebada.

En este experimento, al igual que en el anterior, la sequía, aún de menor intensidad, disminuyó la acumulación de biomasa en los genotipos de cebada. La biomasa total de la planta y el número de tallos hijos variaron entre genotipos con la disponibilidad hídrica (Fig. 4.62, Tabla 4.63). Así, en comparación con las plantas control, el déficit hídrico disminuyó en Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente, la biomasa total de la planta (42.1%, 53.7%, 45.6% y 43.7%) (Fig. 4.62) y el número de tallos por planta (20.3%, 58%, 51.2% y 26%) (Fig. 4.63a). En plantas de control hídrico la mayor acumulación de biomasa la tuvo la línea 8 y la de la línea 89 fue mayor que la del cv. Harrington, y la de la línea 76 fue similar a la de ambos genotipos, pero la sequía disminuyó la biomasa hasta el punto de que las diferencias entre las líneas RCSL y Harrington desaparecieron (Fig. 4.62). Estos resultados muestran que aun cuando en condiciones de control hídrico por lo general las líneas RCSL tuvieron una mayor acumulación de biomasa que Harrington, la mayor sensibilidad a la sequía de las líneas RCSL que Harrington condujo a que todos ellos tuvieran biomazas similares. Además, la línea 8 tuvo un mayor número de tallos por planta que Harrington y la línea 89 y similar al de la línea 76 en plantas control, pero el efecto de la sequía fue más acusado en la línea 8 y la 76 por lo que disminuyó el número de tallos en ambos genotipos con respecto a Harrington y la línea 89 (Fig. 4.63a). El hecho de que estos últimos genotipos tuvieran un mayor número de tallos que las líneas 8 y 76 con escasa

disponibilidad hídrica y, sin embargo, la biomasa total de todos ellos fuera similar parece indicar que el aumento del número de tallos no necesariamente repercutió en un aumento de biomasa, lo que sugiere que tuvieron un mayor número de tallos improductivos en dichas condiciones.

El déficit hídrico redujo, en comparación con las plantas de control hídrico, el número de espigas por planta en un 55.9%. La línea 89 tuvo un menor número de espigas por planta que los demás genotipos, con valores similares entre ellos (Tabla 4.63). El porcentaje de espigas por planta varió entre los genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.63). De manera que el déficit hídrico redujo, con respecto a las plantas control, el porcentaje de espigas por planta en el cv. Harrington y la línea 89 en un 53.3% y un 38.3%, respectivamente, mientras que no tuvo efecto significativo en las otras líneas RCSL. En condiciones de control hídrico el porcentaje de espigas por planta fue mayor en el cv. Harrington y la línea 76 que en las líneas 8 y 89, pero la sequía disminuyó el porcentaje de espigas por planta en Harrington y la línea 89 con respecto a las líneas 76 y 8 (Fig. 4.63b). Estos resultados constatan las anteriores apreciaciones, puesto que con escasa disponibilidad hídrica el cv. Harrington y la línea 89 tuvieron un mayor número de tallos, de los cuales un menor número desarrolló espigas, al contrario de lo que ocurrió en las líneas 8 y 76, lo que condujo a que todos ellos tuvieran una biomasa similar en las condiciones descritas.

Con relación al rendimiento de grano a nivel de planta. El número de granos varió entre genotipos con la disponibilidad hídrica (Tabla 4.65). El déficit hídrico disminuyó, con respecto a las plantas de control hídrico, el número de granos en el cv. Harrington y las líneas 8, 76 y 89, respectivamente (59.1%, 55.5%, 56.3% y 52.8%) (Fig. 4.64). En plantas de control, el menor número de granos por planta lo tuvo la línea 89, mientras que las líneas 76 y 8, con valores similares entre ellas, tuvieron un mayor número de granos que Harrington, pero la sequía disminuyó el número de granos hasta el punto de que las diferencias entre genotipos se atenuaron, excepto por el valor todavía menor en la línea 89 (Fig. 4.64). A pesar del notable descenso del número de granos inducido por la sequía en todos los genotipos, superior al 50% (Fig. 4.64), el peso del grano no alcanzó significación estadística para la interacción genotipo x disponibilidad hídrica. Así, el déficit hídrico disminuyó, con respecto a las plantas de control hídrico, el peso del grano en un 55.4%, lo que sugiere que este parámetro es altamente sensible a la disponibilidad hídrica. Promediado con la disponibilidad hídrica, las líneas 76 y 8 tuvieron un mayor número de granos que el cv. Harrington y la línea 89 (Tabla 4.65). Se ha propuesto que las espigas con un mayor número de granos suelen generar granos de menor tamaño y con un menor peso por grano (Acreche and Slafer, 2006; Mitchell *et al.*, 2013), y al igual que hemos observado en la espiga del tallo principal, la línea 8 mostró un menor peso por grano que las otras líneas RCSL, aunque no alcanzó significación estadística con respecto al cv. Harrington, y a su vez el peso por grano de la línea 89 fue mayor que el de la línea 76 (Tabla 4.65). Estos resultados confirman aquellos observados a nivel de la espiga principal ya que la línea 8 tuvo un mayor número de granos con un menor peso por grano y, por el contrario, la línea 89 tuvo un menor número de granos con mayor peso por grano.

Todos los parámetros anteriores se pueden resumir en el índice de cosecha, que relaciona el rendimiento de grano y la biomasa por planta, y varió entre genotipos con la disponibilidad hídrica. El déficit hídrico redujo, con respecto a las plantas control, el índice de cosecha en Harrington y la línea 76 un 17.7% y 12.9%, respectivamente, y no tuvo efecto en la línea 8 y la línea 89 (Fig. 4.65). Con ambos niveles de disponibilidad hídrica en el suelo la línea 76 tuvo el mayor índice de cosecha y la línea 89 el menor, mientras que Harrington tuvo un IC mayor que la línea 8 en plantas de control, pero la sequía redujo el IC en Harrington hasta el punto de que desaparecieron las diferencias entre

ellos (Fig. 4.65). Richards and Townley-Smith (1987) propusieron que los genotipos que presentan un alto peso específico del tallo suelen tener un menor IC y rendimiento de grano, en conformidad con los resultados obtenidos para la línea 89. Cabe resaltar que las líneas 89 y 76, que han mostrado los valores superiores e inferiores tanto en los parámetros de crecimiento como en la acumulación de reservas en los entrenudos del tallo y las hojas durante el desarrollo del grano y en la madurez, el IC fue al contrario. Esto podría ser indicativo de que la línea 76, en términos de productividad, es más resistente a la sequía que la línea 89, lo que estaría de acuerdo con datos obtenidos en campo (Inostroza *et al.*, 2007; Del Pozo *et al.*, 2012). La variabilidad genotípica encontrada en nuestro estudio parece indicar que el rendimiento de grano mejoró en el genotipo de menor altura. En conformidad con estudios previos que mostraron que el rendimiento de grano aumentó en variedades de trigo modernas con una reducción de la altura del tallo (Austin *et al.*, 1980; Ledent and Stoy, 1988). Mathews *et al.* (2006) en un estudio con líneas isogénicas para la mayoría de los genes de la altura encontraron que las líneas de menor altura tenían un rendimiento ventajoso sobre las líneas de mayor altura. Además, las líneas con alto contenido en WSC tenían espigas más pesadas pero menor número de granos por unidad de peso de la espiga y con un mayor peso por grano. Y la aparente contribución de los WSC del tallo al rendimiento de grano fue mayor en las líneas con alto contenido de WSC y su número de granos menor. De manera que una mayor proporción del peso del grano individual final en las plantas con alto contenido de carbohidratos solubles en agua fue dependiente de las reservas de carbohidratos almacenados en el tallo que se estimó en un 11.5% frente al 8.2% en las líneas de bajo contenido de WSC. Y las líneas con un bajo contenido de WSC alcanzaron un menor peso del grano final en comparación con las de alto contenido de WSC con mayor aparente contribución de los WSC del tallo en el peso por grano. Lo que fundamentaría la hipótesis de que las líneas con un elevado contenido de WSC podrían tener un mayor peso del grano bajo condiciones potenciales, o peso del grano potencial por sí mismo. Otros estudios han indicado que la inversión en carbohidratos solubles en el tallo podría constituir un sumidero competitivo alternativo para la espiga, con el potencial de disminuir el rendimiento vía una reducción del número de granos. Por ello, los genotipos enanos que transfieren los recursos hacia la espiga durante el periodo de rápido desarrollo de la espiga pueden ser más ventajosos (Fischer and Stockman, 1986).

6.- Conclusiones

1. La difusión del CO₂ por cierre de los estomas, más que cualquier trastorno metabólico, pudo ser la causa principal de la limitación de la fotosíntesis con el déficit hídrico moderado y prolongado. Dicha limitación fue más acusada en los genotipos que tuvieron mayor superficie verde de las hojas bandera y penúltima: el cv. Harrington y la línea 8. El déficit hídrico menos intenso pudo causar una limitación metabólica que pareció estar más relacionada con la carboxilación de la Rubisco que con la regeneración de la RuBP. La fotosíntesis de las líneas 8 y 89 aumentó con déficit hídrico probablemente por un transporte electrónico más eficiente.

2. El aumento del contenido foliar de carbohidratos solubles en agua a pesar de la disminución de la fotosíntesis con el déficit hídrico, pudo deberse a la inhibición del crecimiento y la demanda metabólica de otros órganos. La variabilidad genotípica en el contenido de carbohidratos en las hojas y el último entrenudo del tallo se asoció con sus diferencias en la fotosíntesis y el desarrollo.

3. En el inicio del desarrollo del grano, la sequía aumentó el contenido foliar de hexosas e indujo la expresión génica de la invertasa ácida de pared celular. En la línea 89 estos efectos de la sequía fueron mayores que en los otros genotipos.

4. El aumento del contenido foliar de sacarosa inducido por la sequía no aumentó la expresión de los genes que codifican la 1-SST y 6-SFT. El contenido de nitrato, que es una señal negativa para la expresión de estos enzimas, pudo aumentar con la sequía como lo hicieron las proteínas solubles y reducir la expresión de esos genes. La sequía posiblemente promovió la acumulación foliar de fructanos con uniones $\beta(2-1)$, porque no modificó la expresión de la 1-FFT y disminuyó drásticamente los transcritos para la 6-SFT y en menor medida los de la 1-SST. En la línea 89, la represión génica inducida por la sequía de la 6-SFT y 1-SST fue atenuada y la expresión de la 1-FFT aumentó en conformidad con una mayor biosíntesis de fructanos.

5. Los fructanos fueron los carbohidratos almacenados en mayor medida en el último y penúltimo entrenudos del tallo, y el almidón el de menor cuantía. El contenido de fructanos fue mayor en el penúltimo que el último entrenudo del tallo. Los mayoritarios en el último entrenudo del tallo fueron los de grado de polimerización medio, indicativo de un predominio de fructanos con uniones $\beta(2-6)$. Su abundancia en este órgano confirma el papel del tallo como reserva temporal de asimilados.

6. El déficit hídrico moderado de larga duración indujo acumulación de fructanos en el último entrenudo del tallo, mientras que el déficit hídrico de menor intensidad redujo el contenido de los mismos. Esta diferencia pudo asociarse con una menor limitación del crecimiento y la demanda de carbono de los colectores de asimilados en estas últimas condiciones, que promovió la utilización de las reservas almacenadas en el tallo.

7. La menor acumulación de fructanos en el último entrenudo del tallo con déficit hídrico de menor intensidad se relacionó con mayor hidrólisis de fructanos, aumento de transcritos para la 1-FEH y descenso de transcritos para la 6-SFT, sin cambios en la expresión génica para la 1-SST.

8. La degradación de fructanos de mayor grado de polimerización a fructanos de menor peso molecular podría considerarse un buen indicador de la variabilidad genotípica en la velocidad de desarrollo.

9. El déficit hídrico aumentó la actividad nitrato reductasa en todos los genotipos de cebada, y la variabilidad genotípica en la actividad del enzima con la disponibilidad hídrica se asoció con cambios en la expresión del gen para dicha proteína. El aumento de la actividad NR inducido por el déficit hídrico se acompañó de un mayor contenido de proteínas, como consecuencia de mayor biosíntesis y/o menor exportación o degradación.

10. El déficit hídrico moderado o menos intenso redujo el número de granos, el peso por grano y el peso del grano por espiga. Con amplia disponibilidad hídrica la línea 89 tuvo el mayor peso del grano por espiga y la línea 76 el menor, mientras que con déficit hídrico moderado Harrington tuvo el mayor peso del grano y la línea 76 el menor. La sequía disminuyó también la biomasa final y la producción de grano a nivel de planta entera.

11. El déficit hídrico moderado aumentó el contenido de carbohidratos solubles en agua y proteínas en el grano y no varió el contenido de almidón, lo cual mejoraría la calidad del grano para ciertos usos, particularmente en las líneas recombinantes con sustitución de cromosomas.

12. En la línea 89, con una mayor longitud de los entrenudos del tallo y un alto contenido de carbohidratos solubles en el último entrenudo del tallo, fue mayor la contribución de los carbohidratos al rendimiento de grano.

7.- Bibliografía

- Acreche, M. M., and Slafer, G. A. (2006). Grain weight response to increases in number of grains in wheat in a Mediterranean area. *Field Crops Research* **98**, 52-59.
- Andrews, M., Raven, J. A., and Lea, P. J. (2013). Do plants need nitrate?. The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of Applied Biology* **163**, 174-199.
- Antonio, C., Pinheiro, C., Chaves, M. M., Ricardo, C. P., Ortuño, M. F., and Thomas-Oates, J. (2008). Analysis of carbohydrates in *Lupinus albus* stems on imposition of water deficit, using porous graphitic carbon liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1187**, 111-118.
- Aoki, N., Hirose, T., and Furbank, R. (2012). Chapter 28: Sucrose Transport in Higher Plants: From Source to Sink. In "Photosynthesis" (J. J. Eaton-Rye, B. C. Tripathy and T. D. Sharkey, eds.), Vol. 34, pp. 703-729. Springer Netherlands.
- Ap Rees, T., Wright, B. W., and Fuller, W. A. (1977). Measurements of starch breakdown as estimates of glycolysis during thermogenesis by the spadix of *Arum maculatum* L. *Planta* **134**, 53-56.
- Aranjuelo, I., Cabrera-Bosquet, L., Morcuende, R., Avice, J. C., Nogués, S., Araus, J. L., Martínez-Carrasco, R., and Pérez, P. (2011). Does ear C sink strength contribute to overcoming photosynthetic acclimation of wheat plants exposed to elevated CO₂?. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3957-3969.
- Araus, J. L., Slafer, G. A., Reynolds, M. P., and Royo, C. (2002). Plant breeding and drought in C3 cereals: What should we breed for?. *Annals of Botany* **89**, 925-940.
- Araus, J. L., Slafer, G. A., Royo, C., and Serret, M. D. (2008). Breeding for yield potential and stress adaptation in cereals. *Critical Reviews in Plant Science* **27**, 377-412.
- Argueso, C. T., Ferreira, F. J., and Kieber, J. J. (2009). Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell and Environment* **32**, 1147-1160.
- Arnau, G., Monneveux, P., This, D., and Alegre, L. (1998). Photosynthesis of six barley genotypes as affected by water stress. *Photosynthetica* **34**, 67-76.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* **24**, 1-15.
- Ashraf, M., and Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* **59**, 206-216.
- Austin, R. B., Bingham, J., Blackwell, R. D., Evans, L. T., Ford, M. A., Morgan, C. L., and Taylor, M. (1980). Genetic improvements in winter wheat yields since 1900 and associated physiological changes. *The Journal of Agricultural Science* **94**, 675-689.
- Badr, A., Müller, K., Schäfer-Pregl, R., El Rabey, H., Effgen, S., Ibrahim, H. H., Pozzi, C., Rohde, W., and Salamini, F. (2000). On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution* **17**, 499-510.
- Ballicora, M., Iglesias, A., and Preiss, J. (2004). ADP-Glucose pyrophosphorylase: A regulatory enzyme for plant starch synthesis. *Photosynthesis Research* **79**, 1-24.
- Bancal, P., Carpita, N. C., and Gaudillere, J. P. (1992). Differences in fructan accumulated in induced and field-grown wheat plants: an elongation-trimming pathway for their synthesis. *New Phytologist* **120**, 313-321.
- Bancal, P., Henson, C. A., Gaudillère, J. P., and Carpita, N. C. (1991). Fructan chemical structure and sensitivity to an exohydrolase. *Carbohydrate Research* **217**, 137-151.
- Bancal, P., and Triboï, E. (1993). Temperature effect on fructan oligomer contents and fructan-related enzyme activities in stems of wheat (*Triticum aestivum* L.) during grain filling. *New Phytologist* **123**, 247-253.
- Barnabás, B., Järger, K., and Fehér, A. (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell and Environment* **31**, 11-38.
- Baroja-Fernández, E., Muñoz, F. J., Zanduetta-Criado, A., Morán-Zorzano, M. T., Viale, A. M., Alonso-Casajús, N., and Pozueta-Romero, J. (2004). Most of ADP-Glucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 13080-13085.
- Barrs, H., and Weatherley, P. (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* **15**, 413-428.

- Bartels, D., and Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**, 23-58.
- Baum, M., Grando, S., Backes, G., Jahoor, A., Sabbagh, A., and Ceccarelli, S. (2003). QTLs for agronomic traits in the Mediterranean environment identified in recombinant inbred lines of the cross "Arta" x *H. spontaneum* 41-1. *Theoretical and Applied Genetics* **107**, 1215-1225.
- Beevers, L., and Hageman, R. (1980). Nitrate and nitrite reduction. *The Biochemistry of Plants* **5**, 115-168.
- Beheshti, A. (2013). Genotypic variation for traits associated with dry matter remobilization in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) genotypes under drought stress conditions. *Crop Breeding Journal* **3**, 113-122.
- Beltrano, J., Ronco, M. G., and Arango, M. C. (2006). Soil drying and rewatering applied at three grain developmental stages affect differentially growth and grain protein deposition in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Brazilian Journal of Plant Physiology* **18**, 341-350.
- Beltrano, J., Ronco, M. G., and Montaldi, E. R. (1999). Drought stress syndrome in wheat is provoked by ethylene evolution imbalance and reversed by rewatering, aminoethoxyvinylglycine, or sodium benzoate. *Journal of Plant Growth Regulation* **18**, 59-64.
- Benešová, M., Holá, D., Fischer, L., Jedelský, P. L., Hnilička, F., Wilhelmová, N., Rothová, O., Kočová, M., Procházková, D., Honnerová, J., Fridrichová, L., and Hnilíčková, H. (2012). The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: Early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration?. *PLoS ONE* **7**, e38017.
- Bengtsson, B. O. (1992). Barley genetics - not only here for the beer. *Trends in Genetics* **8**, 3-5.
- Bergmeyer, H., and Beutler, H. (1990). Ammonia. In "Methods of Enzymatic Analysis" (H. Bergmeyer, ed.), 3rd Edition. Vol. VII, pp. 454-461. VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.
- Bhargava, S., and Sawant, K. (2013). Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding* **132**, 21-32.
- Bieker, S., and Zentgraf, U. (2013). Chapter 3: Plant senescence and nitrogen mobilization and signaling. In "Senescence and Senescence-Related Disorders" (Z. Wang and H. Inuzuka, eds.), pp. 53-84. In Tech.
- Bingham, I. J., Blake, J., Foulkes, M. J., and Spink, J. (2007a). Is barley yield in the UK sink limited? I. Post-anthesis radiation interception, radiation-use efficiency and source-sink balance. *Field Crops Research* **101**, 198-211.
- Bingham, I. J., Blake, J., Foulkes, M. J., and Spink, J. (2007b). Is barley yield in the UK sink limited?: II. Factors affecting potential grain size. *Field Crops Research* **101**, 212-220.
- Bingham, I. J., Walters, D. R., Foulkes, M. J., and Paveley, N. D. (2009). Crop traits and the tolerance of wheat and barley to foliar disease. *Annals of Applied Biology* **154**, 159-173.
- Blum, A. (1998). Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilisation. *Euphytica* **100**, 77-83.
- Blum, A. (2005). Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential-are they compatible, dissonant, or mutually exclusive?. *Australian Journal of Agricultural Research* **56**, 1159-1168.
- Blum, A., Golan, G., Mayer, J., and Sinmena, B. (1997). The effect of dwarfing genes on sorghum grain filling from remobilized stem reserves, under stress. *Field Crops Research* **52**, 43-54.
- Blum, A., and Pnuel, Y. (1990). Physiological attributes associated with drought resistance of wheat cultivars in a Mediterranean environment. *Australian Journal of Agricultural Research* **41**, 799-810.
- Blum, A., Ramaiah, S., Kanemasu, E. T., and Paulsen, G. M. (1990). Wheat recovery from drought stress at the tillering stage of development. *Field Crops Research* **24**, 67-85.
- Blum, A., Sinmena, B., Mayer, J., Golan, G., and Shpiler, L. (1994). Stem reserve mobilisation supports wheat-grain filling under heat stress. *Functional Plant Biology* **21**, 771-781.
- Bogeat-Triboulot, M.-B., Brosché, M., Renaut, J., Jouve, L., Le Thiec, D., Fayyaz, P., Vinocur, B., Witters, E., Laukens, K., and Teichmann, T. (2007). Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiology* **143**, 876-892.

- Bonnett, G. D., and Incoll, L. D. (1992). The potential pre-anthesis and post-anthesis contributions of stem internodes to grain yield in crops of winter barley. *Annals of Botany* **69**, 219-225.
- Bonnett, G. D., and Incoll, L. D. (1993). Effects on the stem of winter barley of manipulating the source and sink during grain-filling: I. Changes in accumulation and loss of mass from internodes. *Journal of Experimental Botany* **44**, 75-82.
- Bonnett, G. D., Sims, I. M., St. John, J. A., and Simpson, R. J. (1994). Purification and characterization of fructans with β -2,1- and β -2,6-glycosidic linkages suitable for enzyme studies. *New Phytologist* **127**, 261-269.
- Börnke, F., and Sonnewald, S. (2011). Biosynthesis and metabolism of starch and sugars. In "Plant Metabolism and Biotechnology" (H. Ashihara, A. Crozier, and A. Komamine eds.), pp. 1-25. Wiley and Sons, Ltd., London.
- Borrás, L., Slafer, G. A., and Otegui, M. a. E. (2004). Seed dry weight response to source-sink manipulations in wheat, maize and soybean: a quantitative reappraisal. *Field Crops Research* **86**, 131-146.
- Borrell, A. K., Incoll, L. D., and Dalling, M. J. (1993). The influence of the *Rht*₁ and *Rht*₂ alleles on the deposition and use of stem reserves in wheat. *Annals of Botany* **71**, 317-326.
- Boyer, J. S. (1982). Plant Productivity and Environment. *Science* **218**, 443-448.
- Boyer, J. S., Wong, S. C., and Farquhar, G. D. (1997). CO₂ and water vapor exchange across leaf cuticle (epidermis) at various water potentials. *Plant Physiology* **114**, 185-191.
- Bradford, M. 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**, 248-254.
- Bray, E. A. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* **103**, 1035.
- Bray, E. A. (2002). Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: An analysis using microarray and differential expression data. *Annals of Botany* **89**, 803-811.
- Bray, E. A. (2004). Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2331-2341.
- Brewitz, E., Larsson, C.-M., and Larsson, M. (1996). Responses of nitrate assimilation and N translocation in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) to reduced ambient air humidity. *Journal of Experimental Botany* **47**, 855-861.
- Bunce, J. A. (2004). Carbon dioxide effects on stomatal responses to the environment and water use by crops under field conditions. *Oecologia* **140**, 1-10.
- Bunce, J. A. (2009). Use of the response of photosynthesis to oxygen to estimate mesophyll conductance to carbon dioxide in water-stressed soybean leaves. *Plant, Cell and Environment* **32**, 875-881.
- Cairns, A. J., and Pollock, C. J. (1988). Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum* L. I. Chromatographic characterization of oligofructans and their labelling patterns following ¹⁴CO₂ feeding. *New Phytologist* **109**, 399-405.
- Calderini, D. F., Abeledo, L. G., Savin, R., and Slafer, G. A. (1999). Effect of temperature and carpel size during pre-anthesis on potential grain weight in wheat. *The Journal of Agricultural Science* **132**, 453-459.
- Campbell, W. H. (1999). Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 277-303.
- Carpita, N. C., Housley, T. L., and Hendrix, J. E. (1991). New features of plant-fructan structure revealed by methylation analysis and carbon-13 nmr spectroscopy. *Carbohydrate Research* **217**, 127-136.
- Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F.-W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Francia, E., Marè, C., Tondelli, A., and Stanca, A. M. (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research* **105**, 1-14.
- Ceccarelli, S., and Grando, S. (1996). Drought as a challenge for the plant breeder. *Plant Growth Regulation* **20**, 149-155.
- Claeys, H., and Inzé, D. (2013). The agony of choice: How plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant Physiology* **162**, 1768-1779.

- Comparot-Moss, S., and Denyer, K. (2009). The evolution of the starch biosynthetic pathway in cereals and other grasses. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2481-2492.
- Cornic, G. (1994). Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis. In "Photoinhibition of Photosynthesis: from Molecular Mechanism to Field" (N. R. Baker and J. R. Bowyer, eds.), pp. 297-313. Bios Scientific Publishers, Oxford.
- Cornic, G. (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture-not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* **5**, 187-188.
- Corradini, C., Cavazza, A., and Bignardi, C. (2012). High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection as a powerful tool to evaluate carbohydrates of food interest: principles and applications. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* **2012**.
- Correia, M. J., Fonseca, F., Azedo-Silva, J., Dias, C., David, M. M., Barrote, I., Osório, M. L., and Osório, J. (2005). Effects of water deficit on the activity of nitrate reductase and content of sugars, nitrate and free amino acids in the leaves and roots of sunflower and white lupin plants growing under two nutrient supply regimes. *Physiologia Plantarum* **124**, 61-70.
- Coruzzi, G. M., and Zhou, L. (2001). Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 247-253.
- Cramer, G., Ergül, A., Grimplet, J., Tillett, R., Tattersall, E. R., Bohlman, M., Vincent, D., Sonderegger, J., Evans, J., Osborne, C., Quilici, D., Schlauch, K., Schooley, D., and Cushman, J. (2007). Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Functional and Integrative Genomics* **7**, 111-134.
- Cross, J. M., Clancy, M., Shaw, J. R., Greene, T. W., Schmidt, R. R., Okita, T. W., and Hannah, L. C. (2004). Both subunits of ADP-Glucose pyrophosphorylase are regulatory. *Plant Physiology* **135**, 137-144.
- Cross, J. M., von Korff, M., Altmann, T., Bartzetko, L., Sulpice, R., Gibon, Y., Palacios, N., and Stitt, M. (2006). Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 Arabidopsis accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology* **142**, 1574-1588.
- Cruz-Aguado, J. A., Rodés, R., Pérez, I. P., and Dorado, M. (2000). Morphological characteristics and yield components associated with accumulation and loss of dry mass in the internodes of wheat. *Field Crops Research* **66**, 129-139.
- Czechowski, T., Bari, R. P., Stitt, M., Scheible, W. R., and Udvardi, M. K. (2004). Real time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root and shoot specific genes. *The Plant Journal* **38**, 366-379.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., and Scheible, W.-R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**, 5-17.
- Chalmers, J., Lidgett, A., Cummings, N., Cao, Y., Forster, J., and Spangenberg, G. (2005). Molecular genetics of fructan metabolism in perennial ryegrass. *Plant Biotechnology Journal* **3**, 459-474.
- Chatterton, N. J., and Harrison, P. A. (1997). Fructan oligomers in *Poa ampla*. *New Phytologist* **136**, 3-10.
- Chaves, M., Osório, J., and Pereira, J. (2004). Water use efficiency and photosynthesis. In "Water Use Efficiency in Plant Biology" (M. Bacon, ed.), pp. 42-74. Blackwell Publishing, Oxford.
- Chaves, M. M. (1991). Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany* **42**, 1-16.
- Chaves, M. M., Flexas, J., and Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **103**, 551-560.
- Chaves, M. M., and Oliveira, M. M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2365-2384.
- Chaves, M. M., Pereira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C. P. P., Osório, M. L., Carvalho, I., Faria, T., and Pinheiro, C. (2002). How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* **89**, 907-916.
- Chen, G., Krugman, T., Fahima, T., Chen, K., Hu, Y., Röder, M., Nevo, E., and Korol, A. (2010). Chromosomal regions controlling seedling drought resistance in Israeli wild barley, *Hordeum spontaneum* C. Koch. *Genetic Resources and Crop Evolution* **57**, 85-99.

- Chen, R.-D., Yu, L.-X., Greer, A., Cheriti, H., and Tabaeizadeh, Z. (1994). Isolation of an osmotic stress- and abscisic acid-induced gene encoding an acidic endochitinase from *Lycopersicon chilense*. *Molecular and General Genetics* **245**, 195-202.
- Cheng, C.-L., Dewdney, J., Kleinhofs, A., and Goodman, H. M. (1986). Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**, 6825-6828.
- Cheng, C. L., Acedo, G. N., Cristinsin, M., and Conkling, M. A. (1992). Sucrose mimics the light induction of Arabidopsis nitrate reductase gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 1861-1864.
- Chimenti, C. A., Marcantonio, M., and Hall, A. J. (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**, 305-315.
- Dai, Z., Edwards, G. E., and Ku, M. S. B. (1992). Control of photosynthesis and stomatal conductance in *Ricinus communis* L. (Castor bean) by leaf to air vapor pressure deficit. *Plant Physiology* **99**, 1426-1434.
- Davidson, D. J., and Chevalier, P. M. (1992). Storage and remobilization of water-soluble carbohydrates in stems of spring wheat. *Crop Science* **32**, 186-190.
- Davies, W. J., and Wilkinson, S. (2012). Understanding and exploiting plant hormone biology to enhance crop production under water scarcity. In "Plant Responses to Drought Stress" (R. Aroca, ed.), pp. 259-272. Springer Berlin Heidelberg.
- De Roover, J., Vandenbranden, K., Van Laere, A., and Van den Ende, W. (2000). Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). *Planta* **210**, 808-814.
- Del Pozo, A., Castillo, D., Inostroza, L., Matus, I., Méndez, A. M., and Morcuende, R. (2012). Physiological and yield responses of recombinant chromosome substitution lines of barley to terminal drought in a Mediterranean-type environment. *Annals of Applied Biology* **160**, 157-167.
- Denyer, K., Dunlap, F., Thorbjornsen, T., Keeling, P., and Smith, A. M. (1996). The major form of ADP-Glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidial. *Plant Physiology* **112**, 779-785.
- Dodd, J. C., Rosendahl, S., Giovannetti, M., Broome, A., Lanfranco, L., and Walker, C. (1996). Inter- and intraspecific variation within the morphologically-similar arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Glomus coronatum*. *New Phytologist* **133**, 113-132.
- Dolferus, R., Powell, N., Ji, X., Ravash, R., Edlington, J., Oliver, S., van Dongen, J., and shiran, B. (2013). Chapter 8: The physiology of reproductive-stage abiotic stress tolerance in cereals. In "Molecular Stress Physiology of Plants" (G. R. Rout and A. B. Das, eds.), pp. 193-218. Springer India.
- Dreccer, M. F., Chapman, S. C., Rattey, A. R., Neal, J., Song, Y., Christopher, J. T., and Reynolds, M. (2013). Developmental and growth controls of tillering and water-soluble carbohydrate accumulation in contrasting wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes: can we dissect them?. *Journal of Experimental Botany* **64**, 143-160.
- Dreccer, M. F., Van Herwaarden, A. F., and Chapman, S. C. (2009). Grain number and grain weight in wheat lines contrasting for stem water soluble carbohydrate concentration. *Field Crops Research* **112**, 43-54.
- Duchateau, N., Bortlik, K., Simmen, U., Wiemken, A., and Bancal, P. (1995). Sucrose:Fructan 6-Fructosyltransferase, a key enzyme for diverting carbon from sucrose to fructan in barley leaves. *Plant Physiology* **107**, 1249-1255.
- Duggan, B. L., Richards, R. A., Van Herwaarden, A. F., and Fettell, N. A. (2005). Agronomic evaluation of a tiller inhibition gene (*tin*) in wheat. I. Effect on yield, yield components, and grain protein. *Australian Journal of Agricultural Research* **56**, 169-178.
- Dupont, F. M., and Altenbach, S. B. (2003). Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science* **38**, 133-146.
- Dutilleul, C., Lelarge, C., Prioul, J.-L., De Paepe, R., Foyer, C. H., and Noctor, G. (2005). Mitochondria-driven changes in leaf NAD status exert a crucial influence on the control of nitrate

- assimilation and the integration of carbon and nitrogen metabolism. *Plant Physiology* **139**, 64-78.
- Ehdaie, B., Alloush, G. A., Madore, M. A., and Waines, J. G. (2006a). Genotypic variation for stem reserves and mobilization in wheat: I. Postanthesis changes in internode dry matter. *Crop Science* **46**, 735-746.
- Ehdaie, B., Alloush, G. A., Madore, M. A., and Waines, J. G. (2006b). Genotypic variation for stem reserves and mobilization in wheat: II. Postanthesis changes in internode water-soluble carbohydrates. *Crop Science* **46**, 2093-2103.
- Ehdaie, B., Alloush, G. A., and Waines, J. G. (2008). Genotypic variation in linear rate of grain growth and contribution of stem reserves to grain yield in wheat. *Field Crops Research* **106**, 34-43.
- Ehdaie, B., and Waines, J. (1996). Genetic variation for contribution of preanthesis assimilates to grain yield in spring wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Genetics and Breeding (Italy)* **50**, 47-56.
- Eisenstein, M. (2013). Plant breeding: Discovery in a dry spell. *Nature* **501**, S7-S9.
- Ellis, R. P., Forster, M. P., Robinson, D., Handley, L. L., Gordon, D. C., Russel, J. R., and Powell, W. (2000). Wild barley: a source of genes for crop improvement in the 21st century?. *Journal of Experimental Botany* **51** (342), 9-17.
- Eschrich, W. (1989). Phloem unloading of photoassimilates. *Transport of Photoassimilates*, 206-263.
- Esmailpour-Jahromi, M., Ahmadi, A., Lunn, J. E., Abbasi, A., Poustini, K., and Joudi, M. (2012). Variation in grain weight among Iranian wheat cultivars: the importance of stem carbohydrate reserves in determining final grain weight under source limited conditions. *Australian Journal of Crop Science* **6**, 1508.
- Evans, L., Wardlaw, I., and Fischer, R. (1975). Wheat. In "Crop physiology: some case histories" (L. T. Evans, ed.), pp. 104-147. Cambridge University Press, London/New York.
- Faiguenbaum, H. (2003). Cebada. In "Labranza, Siembra y Producción de los Principales Cultivos de Chile." (Ograma, ed.), pp. 107-133. Ograma S.A., Santiago, Chile.
- Farías-Rodríguez, R., Mellor, R. B., Arias, C., and Peña-Cabriales, J. J. (1998). The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. *Physiologia Plantarum* **102**, 353-359.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., and Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* **29**, 185-212.
- Farquhar, G. D., Hubick, K. T., Terashima, I., Condon, A. G., and Richards, R. A. (1987). Genetic variation in the relationship between photosynthetic CO₂ assimilation rate and stomatal conductance to water loss. In "Progress in Photosynthesis Research" (J. Biggins, ed.), pp. 209-212. Springer Netherlands.
- Farquhar, G. D., Von Caemmerer, S., and Berry, J. A. (1980). A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* **149**, 78-90.
- Farquhar, G. D., von Caemmerer, S., and Berry, J. A. (2001). Models of photosynthesis. *Plant Physiology* **125**, 42-45.
- Ferrario-Méry, S., Masclaux-Daubresse, C., Suzuki, A., Valadier, M.-H., Hirel, B., and Foyer, C. H. (2001). Glutamine and α -ketoglutarate are metabolite signals involved in nitrate reductase gene transcription in untransformed and transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-glutamine- α -ketoglutarate aminotransferase. *Planta* **213**, 265-271.
- Ferrario-Méry, S., Valadier, M.-H., and Foyer, C. H. (1998). Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. *Plant Physiology* **117**, 293-302.
- Fischer, K., Barbier, G. G., Hecht, H.-J., Mendel, R. R., Campbell, W. H., and Schwarz, G. (2005). Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: Crystal structures of the nitrate reductase active site. *The Plant Cell* **17**, 1167-1179.
- Fischer, R., and Stockman, Y. (1986). Increased kernel number in norin 10-derived dwarf wheat: Evaluation of the cause. *Functional Plant Biology* **13**, 767-784.
- Fischer, R. A. (2008). The importance of grain or kernel number in wheat: A reply to Sinclair and Jamieson. *Field Crops Research* **105**, 15-21.

- Flexas, J., Bota, J., Cifre, J., Escalona, J. M., Galmés, J., Gulías, J., Lefi, E. K., Martínez-Cañellas, S. F., Moreno, M. T., Ribas-Carbó, M., Riera, D., Sampol, B., and Medrano, H. (2004a). Understanding down-regulation of photosynthesis under water stress: future prospects and searching for physiological tools for irrigation management. *Annals of Applied Biology* **144**, 273-283.
- Flexas, J., Escalona, J. M., and Medrano, H. (1999). Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. *Plant, Cell and Environment* **22**, 39-48.
- Flexas, J., and Medrano, H. (2002). Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany* **89**, 183-189.
- Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Bota, J., Galmés, J., Henkle, M., Martínez-Cañellas, S., and Medrano, H. (2006). Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist* **172**, 73-82.
- Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Diaz-Espejo, A., Galmés, J., and Medrano, H. (2008). Mesophyll conductance to CO₂: Current knowledge and future prospects. *Plant, Cell and Environment* **31**, 602-621.
- Forde, B. G., and Lea, P. J. (2007). Glutamate in plants: Metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2339-2358.
- Foster, E. F., Pajarito, A., and Acosta-Gallegos, J. (1995). Moisture stress impact on N partitioning, N remobilization and N-use efficiency in beans (*Phaseolus vulgaris*). *The Journal of Agricultural Science* **124**, 27-37.
- Foulkes, M. J., Scott, R. K., and Sylvester-Bradley, R. (2002). The ability of wheat cultivars to withstand drought in UK conditions: formation of grain yield. *The Journal of Agricultural Science* **138**, 153-169.
- Foulkes, M. J., Sylvester-Bradley, R., Weightman, R., and Snape, J. W. (2007). Identifying physiological traits associated with improved drought resistance in winter wheat. *Field Crops Research* **103**, 11-24.
- Fox, G. P., Panozzo, J. F., Li, C. D., Lance, R. C. M., Inkerman, P. A., and Henry, R. J. (2003). Molecular basis of barley quality. *Australian Journal of Agricultural Research* **54**, 1081-1101.
- Foyer, C. H., Noctor, G., and Verrier, P. (2007). Photosynthetic carbon-nitrogen interactions: Modelling inter-pathway control and signalling. In "Annual Plant Reviews: Control of Primary Metabolism in Plants", Vol. 22, pp. 325-347. Blackwell Publishing Ltd.
- Foyer, C. H., Valadier, M.-H., Migge, A., and Becker, T. W. (1998). Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiology* **117**, 283-292.
- Francia, E., Tondelli, A., Rizza, F., Badeck, F. W., Thomas, W. T., Van Eeuwijk, F., Romagosa, I., Stanca, A. M., and Pecchioni, N. (2013). Determinants of barley grain yield in drought-prone Mediterranean environments. *Italian Journal of Agronomy* **8**, 1-8.
- Fresneau, C., Ghashghaie, J., and Cornic, G. (2007). Drought effect on nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase activities in wheat (*Triticum durum* L.): Role of leaf internal CO₂. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2983-2992.
- Fujita, D., Ebron, L., Araki, E., Kato, H., Khush, G., Sheehy, J., Lafarge, T., Fukuta, Y., and Kobayashi, N. (2010). Fine mapping of a gene for low-tiller number, *Ltn*, in japonica rice (*Oryza sativa* L.) variety Aikawa 1. *Theoretical and Applied Genetics* **120**, 1233-1240.
- Gadegaard, G., Didion, T., Folling, M., Storgaard, M., Andersen, C. H., and Nielsen, K. K. (2008). Improved fructan accumulation in perennial ryegrass transformed with the onion fructosyltransferase genes 1-SST and 6G-FFT. *Journal of Plant Physiology* **165**, 1214-1225.
- Galmés, J., Ribas-Carbó, M., Medrano, H., and Flexas, J. (2011). Rubisco activity in Mediterranean species is regulated by the chloroplastic CO₂ concentration under water stress. *Journal of Experimental Botany* **62**, 653-665.
- García del Moral, M. B., and García del Moral, L. F. (1995). Tiller production and survival in relation to grain yield in winter and spring barley. *Field Crops Research* **44**, 85-93.

- Gausung, K., and Jensen, C. B. (1990). Two ubiquitin-long-tail fusion genes arranged as closely spaced direct repeats in barley. *Gene* **94**, 165-171.
- Gebbing, T., and Schnyder, H. (1999). Pre-anthesis reserve utilization for protein and carbohydrate synthesis in grains of wheat. *Plant Physiology* **121**, 871-878.
- Gebbing, T., Schnyder, H., and Kühbauch, W. (1999). The utilization of pre-anthesis reserves in grain filling of wheat. Assessment by steady-state $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ labelling. *Plant, Cell and Environment* **22**, 851-858.
- Geigenberger, P. (2011). Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiology* **155**, 1566-1577.
- Geigenberger, P., Geiger, M., and Stitt, M. (1998). High-temperature perturbation of starch synthesis is attributable to inhibition of ADP-Glucose pyrophosphorylase by decreased levels of glycerate-3-phosphate in growing potato tubers. *Plant Physiology* **117**, 1307-1316.
- Geigenberger, P., Kolbe, A., and Tiessen, A. (2005). Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1469-1479.
- Geigenberger, P., Reimholz, R., Geiger, M., Merlo, L., Canale, V., and Stitt, M. (1997). Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. *Planta* **201**, 502-518.
- Genstat® for windows (2003). 7th edition – Statistical Package. (R. Payne, ed.). VSN International Ltd., Oxford, UK.
- Gent, M. P. N. (1994). Photosynthate reserves during grain filling in winter wheat. *Agronomy Journal* **86**, 159-167.
- Giardi, M. T., Cona, A., Geiken, B., Kučera, T., Masojídek, J., and Mattoo, A. K. (1996). Long-term drought stress induces structural and functional reorganization of photosystem II. *Planta* **199**, 118-125.
- Gibon, Y., Blaesing, O. E., Hannemann, J., Carillo, P., Höhne, M., Hendriks, J. H. M., Palacios, N., Cross, J., Selbig, J., and Stitt, M. (2004a). A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: Comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *The Plant Cell* **16**, 3304-3325.
- Gibon, Y., Bläsing, O. E., Palacios-Rojas, N., Pankovic, D., Hendriks, J. H. M., Fisahn, J., Höhne, M., Günther, M., and Stitt, M. (2004b). Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-Glucose pyrophosphorylase in the following light period. *The Plant Journal* **39**, 847-862.
- Giunta, F., Motzo, R., and Deidda, M. (2002). SPAD readings and associated leaf traits in durum wheat, barley and triticale cultivars. *Euphytica* **125**, 197-205.
- Goggin, D. E., and Setter, T. L. (2004). Fructosyltransferase activity and fructan accumulation during development in wheat exposed to terminal drought. *Functional Plant Biology* **31**, 11-21.
- Göksoy, A. T., Demir, A. O., Turan, Z. M., and Dağüstü, N. (2004). Responses of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to full and limited irrigation at different growth stages. *Field Crops Research* **87**, 167-178.
- Gong, P., Zhang, J., Li, H., Yang, C., Zhang, C., Zhang, X., Khurram, Z., Zhang, Y., Wang, T., Fei, Z., and Ye, Z. (2010). Transcriptional profiles of drought-responsive genes in modulating transcription signal transduction, and biochemical pathways in tomato. *Journal of Experimental Botany* **61**, 3563-3575.
- Gong, Y. H., Zhang, J., Gao, J. F., Lu, J. Y., and Wang, J. R. (2005). Slow export of photoassimilate from stay-green leaves during late grain-filling stage in hybrid winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science* **191**, 292-299.
- González, A., Bermejo, V., and Gimeno, B. (2010). Effect of different physiological traits on grain yield in barley grown under irrigated and terminal water deficit conditions. *Journal of Agricultural Science* **148**, 319-328.
- González, A., Martín, I., and Ayerbe, L. (2008). Yield and osmotic adjustment capacity of barley under terminal water-stress conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science* **194**, 81-91.

- Gooding, M. J., Ellis, R. H., Shewry, P. R., and Schofield, J. D. (2003). Effects of restricted water availability and increased temperature on the grain filling, drying and quality of winter wheat. *Journal of Cereal Science* **37**, 295-309.
- Gous, P. W., Hasjim, J., Franckowiak, J., Fox, G. P., and Gilbert, R. G. (2013). Barley genotype expressing "stay-green"-like characteristics maintains starch quality of the grain during water stress condition. *Journal of Cereal Science* **58**, 414-419.
- Grando, S., Baum, M., Ceccarelli, S., Goodchild, A., Jaby El-Haramein, F., Jahoor, A., and Backes, G. (2005). QTLs for straw quality characteristics identified in recombinant inbred lines of a *Hordeum vulgare* x *H. spontaneum* cross in a Mediterranean environment. *Theoretical and Applied Genetics* **110**, 688-695.
- Graner, A., Bjørnstad, s., Konishi, T., and Ordon, F. (2003). Chapter 7: Molecular diversity of the barley genome. In "Diversity in Barley (*Hordeum vulgare*)" (R. Von Bothmer, T. Van Hintum, H. Knüpffer and K. Sato, eds.), Vol. 7, pp. 121-141. Elsevier.
- Grassi, G., and Magnani, F. (2005). Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant, Cell and Environment* **28**, 834-849.
- Guicherd, P., Peltier, J. P., Gout, E., Bligny, R., and Marigo, G. (1997). Osmotic adjustment in *Fraxinus excelsior* L.: malate and mannitol accumulation in leaves under drought conditions. *Trees* **11**, 155-161.
- Gutiérrez, D., Gutiérrez, E., Pérez, P., Morcuende, R., Verdejo, A. L., and Martínez-Carrasco, R. (2009). Acclimation to future atmospheric CO₂ levels increases photochemical efficiency and mitigates photochemistry inhibition by warm temperatures in wheat under field chambers. *Physiologia Plantarum* **137**, 86-100.
- Gutierrez, L., Mauriat, M., Guénin, S., Pelloux, J., Lefebvre, J.-F., Louvet, R., Rusterucci, C., Moritz, T., Guérineau, F., Bellini, C., and Van Wuytswinkel, O. (2008). The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnology Journal* **6**, 609-618.
- Gutiérrez, R. A., Stokes, T. L., Thum, K., Xu, X., Obertello, M., Katari, M. S., Tanurdzic, M., Dean, A., Nero, D. C., McClung, C. R., and Coruzzi, G. M. (2008). Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene *CCA1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 4939-4944.
- Hadiarto, T., and Tran, L.-S. (2011). Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Reports* **30**, 297-310.
- Hamidou, F., Zombre, G., and Braconnier, S. (2007). Physiological and biochemical responses of cowpea genotypes to water stress under glasshouse and field conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science* **193**, 229-237.
- Hare, P. (1977). Subnanomole-range amino acid analysis. *Methods in Enzymology* **47**, 3.
- Hare, P. D., and Cress, W. A. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* **21**, 79-102.
- Hare, P. D., Cress, W. A., and Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* **21**, 535-553.
- Harlan, J. R., and Zohary, D. (1966). Distribution of wild wheats and barley. *Science* **153**, 1074-1080.
- Heldt, H.-W. (2005). "Plant Biochemistry" (H.-W. Heldt, and F. Held, eds.), 3rd Edition, 630 p. Elsevier.
- Hendriks, J. H. M., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., and Geigenberger, P. (2003). ADP-Glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiology* **133**, 838-849.
- Hendry, G. A. F. (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructans -a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* **123**, 3-14.
- Hewitt, E. J. (1966). "Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition". Technical communication no. 22, 2nd Edition, pp. 430-472. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham royal, USA.
- Hincha, D. K. (2002). Cryoprotectin: A plant lipid-transfer protein homologue that stabilizes membranes during freezing. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **357**, 909-916.

- Hincha, D. K., Hellwege, E. M., Heyer, A. G., and Crowe, J. H. (2000). Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. *European Journal of Biochemistry* **267**, 535-540.
- Hincha, D. K., Zuther, E., Hellwege, E. M., and Heyer, A. G. (2002). Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology* **12**, 103-110.
- Hodges, M. (2002). Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *Journal of Experimental Botany* **53**, 905-916.
- Högy, P., Brunnbauer, M., Koehler, P., Schwadorf, K., Breuer, J., Franzaring, J., Zhunusbayeva, D., and Fangmeier, A. (2013a). Grain quality characteristics of spring wheat (*Triticum aestivum*) as affected by free-air CO₂ enrichment. *Environmental and Experimental Botany* **88**, 11-18.
- Högy, P., Poll, C., Marhan, S., Kandeler, E., and Fangmeier, A. (2013b). Impacts of temperature increase and change in precipitation pattern on crop yield and yield quality of barley. *Food Chemistry* **136**, 1470-1477.
- Hori, K., Sato, K., Nankaku, N., and Takeda, K. (2005). QTL analysis in recombinant chromosome substitution lines and doubled haploid lines derived from a cross between *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* and *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*. *Molecular Breeding* **16**, 295-311.
- Horneck, D. A., and Miller, R. O. (1998). Determination of total nitrogen in plant tissue. *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*, 75-83.
- Huang, J.-Z., and Huber, S. C. (2001). Phosphorylation of synthetic peptides by a CDPK and plant SNF1-related protein kinase. Influence of proline and basic amino acid residues at selected positions. *Plant and Cell Physiology* **42**, 1079-1087.
- Huber, J. L., Huber, S. C., Campbell, W. H., and Redinbaugh, M. G. (1992). Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **296**, 58-65.
- Huber, S. C., and Huber, J. L. (1992). Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiology* **99**, 1275-1278.
- Huber, S. C., and Huber, J. L. (1996). Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* **47**, 431-444.
- Hummel, I., Pantin, F., Sulpice, R., Piques, M., Rolland, G., Dauzat, M., Christophe, A., Pervent, M., Bouteillé, M., Stitt, M., Gibon, Y., and Muller, B. (2010). Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: An integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiology* **154**, 357-372.
- Hunt, L. (1979). Stem weight changes during grain filling in wheat from diverse sources. In "Proceedings 5th International Wheat Genetics Symposium" (Ramanujam, ed.), Vol. 2328, pp. 1978. Indian Society of Genetics and Plant Breeding, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India.
- Huynh, B.-L., Mather, D., Schreiber, A., Toubia, J., Baumann, U., Shoaei, Z., Stein, N., Ariyadasa, R., Stangoulis, J., Edwards, J., Shirley, N., Langridge, P., and Fleury, D. (2012). Clusters of genes encoding fructan biosynthesizing enzymes in wheat and barley. *Plant Molecular Biology*, 1-16.
- Huynh, B.-L., Palmer, L., Mather, D. E., Wallwork, H., Graham, R. D., Welch, R. M., and Stangoulis, J. C. R. (2008). Genotypic variation in wheat grain fructan content revealed by a simplified HPLC method. *Journal of Cereal Science* **48**, 369-378.
- Iglesias, A. A., Barry, G. F., Meyer, C., Bloksberg, L., Nakata, P. A., Greene, T., Laughlin, M. J., Okita, T. W., Kishore, G. M., and Preiss, J. (1993). Expression of the potato tuber ADP-Glucose pyrophosphorylase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 1081-1086.
- Ingram, J., and Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Biology* **47**, 377-403.
- Innes, P., Hoogendoorn, J., and Blackwell, R. D. (1985). Effects of differences in date of ear emergence and height on yield of winter wheat. *The Journal of Agricultural Science* **105**, 543-549.
- Inostroza, L., Del Pozo, A., Matus, I., Castillo, D., Hayes, P., Machado, S., and Corey, A. (2009). Association mapping of plant height, yield, and yield stability in recombinant chromosome

- substitution lines (RCSLs) using *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* as a source of donor alleles in a *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* background. *Molecular Breeding* **23**, 365-376.
- Inostroza, L., Del Pozo, A., Matus, I., and Hayes, P. (2007). Tolerancia a sequía en líneas recombinantes con sustitución de cromosomas (RCSLs) obtenidas de la crucea *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* (Caesarea 26-24) × *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* cv. Harrington. *Agricultura Técnica (Chile)* **67(3)**, 253-261.
- Inoue, T., Inanaga, S., Sugimoto, Y., and El Siddig, K. (2004). Contribution of pre-anthesis assimilates and current photosynthesis to grain yield, and their relationships to drought resistance in wheat cultivars grown under different soil moisture. *Photosynthetica* **42**, 99-104.
- IPCC (2013). Climate change 2013: The physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA,.
- Israel, D. W., Rufty Jr, T. W., and Cure, J. D. (1990). Nitrogen and phosphorus nutritional interactions in a CO₂ enriched environment. *Journal of Plant Nutrition* **13**, 1419-1433.
- Jiang, D., and Yu, Z. (2007). Effects of soil water on yield and grain quality of wheat. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences* **21**, 641-645 (in Chinese with English abstract).
- Jiang, Y., and Huang, B. (2001). Osmotic adjustment and root growth associated with drought preconditioning-enhanced heat tolerance in kentucky bluegrass. *Crop Science* **41**, 1168-1173.
- Johnson, R. C., Kebede, H., Mornhinweg, D. W., Carver, B. F., Rayburn, A. L., and Nguyen, H. T. (1987). Photosynthetic differences among triticum accessions at tillering. *Crop Science* **27**, 1046-1050.
- Johnson, R. C., Witters, R. E., and Ciha, A. J. (1981). Daily patterns of apparent photosynthesis and evapotranspiration in a developing winter wheat crop. *Agronomy Journal* **73**, 414-418.
- Jones, H. (1993). Drought tolerance and water-use efficiency. In "Water Deficits: Plant Responses from Cell to Community" (J. A. C. Smith and H. Griffiths, eds.), pp. 193-203. BIOS Scientific Publishers, Oxford, U.K.
- Joudi, M., Ahmadi, A., Mohamadi, V., Abbasi, A., Vergauwen, R., Mohammadi, H., and Van den Ende, W. (2012). Comparison of fructan dynamics in two wheat cultivars with different capacities of accumulation and remobilization under drought stress. *Physiologia Plantarum* **144**, 1-12.
- Kaiser, W. M., and Brendle-Behnisch, E. (1991). Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase activity by photosynthesis: I. modulation in vivo by CO₂ availability. *Plant Physiology* **96**, 363-367.
- Kaiser, W. M., and Förster, J. (1989). Low CO₂ prevents nitrate reduction in leaves. *Plant Physiology* **91**, 970-974.
- Kaiser, W. M., and Huber, S. C. (1994). Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiology* **106**, 817.
- Kaiser, W. M., and Huber, S. C. (1997). Correlation between apparent activation state of nitrate reductase (NR), NR hysteresis and degradation of NR protein. *Journal of Experimental Botany* **48**, 1367-1374.
- Kaiser, W. M., and Huber, S. C. (2001). Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1981-1989.
- Kaiser, W. M., Weiner, H., Kandlbinder, A., Tsai, C. B., Rockel, P., Sonoda, M., and Planchet, E. (2002). Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *Journal of Experimental Botany* **53**, 875-882.
- Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A., and Flügge, U.-I. (1998). Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: The glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *The Plant Cell* **10**, 105-117.
- Karim, M., Hamid, A., and Rahman, S. (2000). Grain growth and yield performance of wheat under subtropical conditions: II. Effect of water stress at reproductive stage. *Cereal Research Communications* **28**, 101-107.
- Katona, E., Neimanis, S., Schönknecht, G., and Heber, U. (1992). Photosystem I-dependent cyclic electron transport is important in controlling Photosystem II activity in leaves under conditions of water stress. *Photosynthesis Research* **34**, 449-464.

- Kawakami, A., Sato, Y., and Yoshida, M. (2008). Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. *Journal of Experimental Botany* **59**, 793-802.
- Kawakami, A., and Yoshida, M. (2005). Fructan:fructan 1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of graminan oligomers in hardened wheat. *Planta* **223**, 90-104.
- Kerepesi, I., and Galiba, G. (1998). Osmotic and salt stresses induced differential alteration in water-soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 5347-5354.
- Khoshro, H., Taleei, A., Bihamta, M., Shahbazi, M., Abbasi, A., and Ramezani, S. (2014). Expression analysis of the genes involved in accumulation and remobilization of assimilates in wheat stem under terminal drought stress. *Plant Growth Regulation*, 1-12.
- Kim, H. K., Luquet, D., van Oosterom, E., Dingkuhn, M., and Hammer, G. (2010). Regulation of tillering in sorghum: genotypic effects. *Annals of Botany* **106**, 69-78.
- Kim, J.-Y., Mahé, A., Brangeon, J., and Prioul, J.-L. (2000). A maize vacuolar invertase, *IVR2*, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiology* **124**, 71-84.
- Kirchberger, S., Leroch, M., Huynen, M. A., Wahl, M., Neuhaus, H. E., and Tjaden, J. (2007). Molecular and biochemical analysis of the plastidic ADP-Glucose transporter (*ZmBT1*) from *Zea mays*. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 22481-22491.
- Kjeldahl, J. (1883). A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Journal of Analytical Chemistry* **22**, 366.
- Klaus *et al.* (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. The International Barley Genome Sequencing Consortium. *Nature* **491**, 711-716.
- Klein, D., Morcuende, R., Stitt, M., and Krapp, A. (2000). Regulation of nitrate reductase expression in leaves by nitrate and nitrogen metabolism is completely overridden when sugars fall below a critical level. *Plant, Cell and Environment* **23**, 863-871.
- Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 235-246.
- Kolbe, A., Tiessen, A., Schluepmann, H., Paul, M., Ulrich, S., and Geigenberger, P. (2005). Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-Glucose pyrophosphorylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11118-11123.
- Komor, E. (2000). The physiology of sucrose storage in sugarcane. *Developments in Crop Science* **26**, 35-53.
- Koroleva, O. A., Farrar, J. F., Deri Tomos, A., and Pollock, C. J. (1998). Carbohydrates in individual cells of epidermis, mesophyll, and bundle sheath in barley leaves with changed export or photosynthetic rate. *Plant Physiology* **118**, 1525-1532.
- Koroleva, O. A., Farrar, J. F., Tomos, A. D., and Pollock, C. J. (1997). Patterns of solute in individual mesophyll, bundle sheath and epidermal cells of barley leaves induced to accumulate carbohydrate. *New Phytologist* **136**, 97-104.
- Lam, H.-M., Coschigano, K., Schultz, C., Melo-Oliveira, R., Tjaden, G., Oliveira, I., Ngai, N., Hsieh, M.-H., and Coruzzi, G. (1995). Use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *The Plant Cell* **7**, 887.
- Lambeck, I., Chi, J.-C., Krizowski, S., Mueller, S., Mehlmer, N., Teige, M., Fischer, K., and Schwarz, G. (2010). Kinetic analysis of 14-3-3-inhibited Arabidopsis thaliana nitrate reductase. *Biochemistry* **49**, 8177-8186.
- Lambeck, I. C., Fischer-Schrader, K., Niks, D., Roeper, J., Chi, J.-C., Hille, R., and Schwarz, G. (2012). Molecular mechanism of 14-3-3 protein-mediated inhibition of plant nitrate reductase. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 4562-4571.
- Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., Van Laere, A., Rabijns, A., and Van den Ende, W. (2009). Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *Journal of Experimental Botany* **60**, 727-740.
- Larson, R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**, 969-978.

- Larsson, M., Larsson, C.-M., Whitford, P. N., and Clarkson, D. T. (1989). Influence of osmotic stress on nitrate reductase activity in wheat (*Triticum aestivum* L.) and the role of abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* **40**, 1265-1271.
- Lasseur, B., Lothier, J., Djoumad, A., De Coninck, B., Smeekens, S., Van Laere, A., Morvan-Bertrand, A., Van den Ende, W., and Prud'homme, M.-P. (2006). Molecular and functional characterization of a cDNA encoding fructan:fructan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT)/fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Journal of Experimental Botany* **57**, 2719-2734.
- Lasseur, B., Lothier, J., Wiemken, A., Van Laere, A., Morvan-Bertrand, A., Ende, W. V. d., and Prud'homme, M.-P. (2011). Towards a better understanding of the generation of fructan structure diversity in plants: molecular and functional characterization of a sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) cDNA from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Journal of Experimental Botany* **62**, 1871-1885.
- Lawlor, D. (1995). The effects of water deficit on photosynthesis. *Environment and Plant Metabolism. Flexibility and Acclimation*, 129-160.
- Lawlor, D. W. (1993). "Photosynthesis: Molecular, Physiological and Environmental Processes", 2nd Edition. Longman scientific and technical, Harlow, UK.
- Lawlor, D. W. (2002). Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: Stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany* **89**, 871-885.
- Lawlor, D. W., and Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* **25**, 275-294.
- Lawlor, D. W., and Tezara, W. (2009). Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany* **103**, 561-579.
- Le Roy, K., Vergauwen, R., Struyf, T., Yuan, S., Lammens, W., Mátrai, J., De Maeyer, M., and Van den Ende, W. (2013). Understanding the role of defective invertases in plants: Tobacco Nin88 fails to degrade sucrose. *Plant Physiology* **161**, 1670-1681.
- Lecoq, J., Wery, J., Turc, O., and Tardieu, F. (1995). Expansion of pea leaves subjected to short water deficit: cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development. *Journal of Experimental Botany* **46**, 1093-1101.
- Ledent, J.-F., and Stoy, V. (1988). Yield of winter-wheat, a comparison of genotypes from 1910 to 1976. *Cereal Research Communications* **16**, 151-156.
- Lee, S., Scott, W., and Love, B. (1989). Sources of screenings in malting barley in relation to the pattern of tillering. In "Proceedings Annual Conference-Agronomy Society of New Zealand (New Zealand)", Vol. 19, pp. 43-54.
- Lee, S. C., and Luan, S. (2012). ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, Cell and Environment* **35**, 53-60.
- Lei, Y., Yin, C., and Li, C. (2006). Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiologia Plantarum* **127**, 182-191.
- Li, H., Cai, J., Jiang, D., Liu, F., Dai, T., and Cao, W. (2013). Carbohydrates accumulation and remobilization in wheat plants as influenced by combined waterlogging and shading stress during grain filling. *Journal of Agronomy and Crop Science* **199**, 38-48.
- Li, Y., Schwarz, P. B., Barr, J. M., and Horsley, R. D. (2008). Factors predicting malt extract within a single barley cultivar. *Journal of Cereal Science* **48**, 531-538.
- Lilley, J. M., and Fukai, S. (1994). Effect of timing and severity of water deficit on four diverse rice cultivars III. Phenological development, crop growth and grain yield. *Field Crops Research* **37**, 225-234.
- Lillo, C., Meyer, C., Lea, U. S., Provan, F., and Olstedal, S. (2004). Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1275-1282.
- Lin, Y., Hwang, C. F., Brown, J. B., and Cheng, C. L. (1994). 5' Proximal regions of Arabidopsis nitrate reductase genes direct nitrate-induced transcription in transgenic tobacco. *Plant Physiology* **106**, 477-484.

- Liu, F., Jensen, C. R., and Andersen, M. N. (2004). Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implication in altering pod set. *Field Crops Research* **86**, 1-13.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* **25**, 402-408.
- Livingston, D., Hinch, D., and Heyer, A. (2009). Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 2007-2023.
- Logemann, J., Schell, J., and Willmitzer, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant-tissues. *Analytical Biochemistry* **163**, 16-20.
- Loss, S. P., Kirby, E. J. M., Siddique, K. H. M., and Perry, M. W. (1989). Grain growth and development of old and modern Australian wheats. *Field Crops Research* **21**, 131-146.
- Lu, C., and Zhang, J. (1999). Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1199-1206.
- Lunn, J., Feil, R., Hendriks, J., Gibon, Y., Morcuende, R., Osuna, D., Scheible, W., Carillo, P., Hajirezaei, M., and Stitt, M. (2006). Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADP-Glucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* **397**, 139-148.
- Lunn, J. E. (2007). Compartmentation in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **58**, 35-47.
- Lunn, J. E., and Ap Rees, T. (1990). Apparent equilibrium constant and mass-action ratio for sucrose-phosphate synthase in seeds of *Pisum sativum*. *Biochemical Journal* **267**, 739-743.
- Lunn, J. E., and MacRae, E. (2003). New complexities in the synthesis of sucrose. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 208-214.
- MacKintosh, C. (1992). Regulation of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1137**, 121-126.
- Mackintosh, C., Douglas, P., and Lillo, C. (1995). Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Plant Physiology* **107**, 451-457.
- MacRae, E., and Lunn, J. (2012). Photosynthetic sucrose biosynthesis: An evolutionary perspective. In "Photosynthesis" (J. J. Eaton-Rye, B. C. Tripathy and T. D. Sharkey, eds.), Vol. 34, pp. 675-702. Springer Netherlands.
- Mahan, J. R., Oliver, M. J., and Sherman, T. D. (1998). Nitrate reductase activity during desiccation and rehydration of the desiccation-tolerant moss *Tortula ruralis*. *Environmental and Experimental Botany* **39**, 67-76.
- Mansfield, T., Hetherington, A., and Atkinson, C. (1990). Some current aspects of stomatal physiology. *Annual Review of Plant Biology* **41**, 55-75.
- Maroco, J. P., Rodrigues, M. L., Lopes, C., and Chaves, M. M. (2002). Limitations to leaf photosynthesis in field-grown grapevine under drought-metabolic and modelling approaches. *Functional Plant Biology* **29**, 451-459.
- Marok, M. A., Tarrago, L., Ksas, B., Henri, P., Abrous-Belbachir, O., Havaux, M., and Rey, P. (2013). A drought-sensitive barley variety displays oxidative stress and strongly increased contents in low-molecular weight antioxidant compounds during water deficit compared to a tolerant variety. *Journal of Plant Physiology* **170**, 633-645.
- Marschall, M., Proctor, M. C. F., and Smirnov, N. (1998). Carbohydrate composition and invertase activity of the leafy liverwort *Porella platyphylla*. *New Phytologist* **138**, 343-353.
- Marschner, H. (1995). "Mineral Nutrition of Higher Plants", 2nd Edition. Academic Press, London.
- Martín Del Molino, I. M., Rojo, B., Martínez-Carrasco, R., and Pérez, P. (1988). Amino acid composition of wheat grain. 1: Changes during development. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **42**, 29-37.
- Martínez-Carrasco, R., Cervantes, E., Pérez, P., Morcuende, R., and Del Molino, I. M. M. (1993). Effect of sink size on photosynthesis and carbohydrate content of leaves of three spring wheat varieties. *Physiologia Plantarum* **89**, 453-459.
- Martínez-Noël, G., Tognetti, J., Salerno, G., Wiemken, A., and Pontis, H. (2009). Protein phosphatase activity and sucrose-mediated induction of fructan synthesis in wheat. *Planta* **230**, 1071-1079.

- Mathews, K. L., Chapman, S. C., Trethowan, R., Singh, R. P., Crossa, J., Pfeiffer, W., van Ginkel, M., and DeLacy, I. (2006). Global adaptation of spring bread and durum wheat lines near-isogenic for major reduced height genes. *Crop Science* **46**, 603-613.
- Matin, M. A., Brown, J. H., and Ferguson, H. (1989). Leaf water potential, relative water content, and diffusive resistance as screening techniques for drought resistance in barley. *Agronomy Journal* **81**, 100-105.
- Matt, P., Geiger, M., Walch-Liu, P., Engels, C., Krapp, A., and Stitt, M. (2001). Elevated carbon dioxide increases nitrate uptake and nitrate reductase activity when tobacco is growing on nitrate, but increases ammonium uptake and inhibits nitrate reductase activity when tobacco is growing on ammonium nitrate. *Plant, Cell and Environment* **24**, 1119-1137.
- Matus, I., Corey, A., Filichkin, T., Hayes, P. M., Vales, M. I., Kling, J., Riera-Lizarazu, O., Sato, K., Powell, W., and Waugh, R. (2003). Development and characterization of recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) using *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* as a source of donor alleles in a *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* background. *Genome* **46**, 1010-1023.
- Matus, I. A., and Hayes, P. M. (2002). Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome* **45**, 1095-1106.
- Maydup, M. L., Antonietta, M., Guimet, J. J., and Tambussi, E. A. (2012). The contribution of green parts of the ear to grain filling in old and modern cultivars of bread wheat (*Triticum aestivum* L.): Evidence for genetic gains over the past century. *Field Crops Research* **134**, 208-215.
- McCleary, B., and Blakeney, A. (1999). Measurement of inulin and oligofructan. *Cereal Foods World* **44**, 398-406.
- McCullough, D. E., and Hunt, L. A. (1989). Respiration and dry matter accumulation around the time of anthesis in field stands of winter wheat (*Triticum aestivum*). *Annals of Botany* **63**, 321-329.
- McIntyre, C., Casu, R., Rattey, A., Dreccer, M., Kam, J., Van Herwaarden, A., Shorter, R., and Xue, G. (2011). Linked gene networks involved in nitrogen and carbon metabolism and levels of water-soluble carbohydrate accumulation in wheat stems. *Functional and Integrative Genomics* **11**, 585-597.
- McWilliams, D. (2003). "Drought strategies for cotton," Cooperative Extension Service Circular 582, College of Agriculture and Home Economics, New Mexico State University, USA.
- Medrano, H., and Flexas, J. (2000). Fijación del dióxido de carbono y biosíntesis de fotoasimilados. In "Fundamentos de Fisiología Vegetal", (J. Azcón-Bieto, M. Talón, eds.), pp. 173-187. McGraw-Hill-Interamericana. Barcelona, España.
- Méndez, A. M., Castillo, D., Del Pozo, A., Matus, I., and Morcuende, R. (2011). Differences in stem soluble carbohydrate contents among recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) of barley under drought in a Mediterranean-type environment. *Agronomy research* **9**, 433.
- Mercier, V., Bussi, C., Lescourret, F., and Génard, M. (2009). Effects of different irrigation regimes applied during the final stage of rapid growth on an early maturing peach cultivar. *Irrigation Science* **27**, 297-306.
- Meyer, R. F., and Boyer, J. S. (1981). Osmoregulation, solute distribution, and growth in soybean seedlings having low water potentials. *Planta* **151**, 482-489.
- Mi, G., Tang, L., Zhang, F., and Zhang, J. (2002). Carbohydrate storage and utilization during grain filling as regulated by nitrogen application in two wheat cultivars. *Journal of Plant Nutrition* **25**, 213-229.
- Miller, A. J., Fan, X., Shen, Q., and Smith, S. J. (2008). Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany* **59**, 111-119.
- Mitchell, J. H., Rebetzke, G. J., Chapman, S. C., and Fukai, S. (2013). Evaluation of reduced-tillering (*tin*) wheat lines in managed, terminal water deficit environments. *Journal of Experimental Botany* **64**, 3439-3451.
- Molina Cano, J. L., García del Moral, L. F., Ramos, J. M., Benasayag, H., and Brufau, J. (1989). "La cebada. Morfología, fisiología, genética, agronomía y usos industriales", MAPA, Publicaciones de Extensión Agraria, Madrid.
- Morcuende, R., Kostadinova, S., Pérez, P., Del Molino, I. M. M., and Martínez-Carrasco, R. (2004). Nitrate is a negative signal for fructan synthesis, and the fructosyltransferase-inducing

- trehalose inhibits nitrogen and carbon assimilation in excised barley leaves. *New Phytologist* **161**, 749-759.
- Morcuende, R., Kostadinova, S., Pérez, P., and Martínez-Carrasco, R. (2005). Fructan synthesis is inhibited by phosphate in warm-grown, but not in cold-treated, excised barley leaves. *New Phytologist* **168**, 567-574.
- Morcuende, R., Krapp, A., Hurry, V., and Stitt, M. (1998). Sucrose-feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of α -oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. *Planta* **206**, 394-409.
- Morgan, J. M. (1992). Osmotic components and properties associated with genotypic differences in osmoregulation in wheat. *Functional Plant Biology* **19**, 67-76.
- Morison, J. I. L. (1987). Intercellular CO₂ concentration and stomatal response to CO₂. In "Stomatal Function" (E. Zeiger, G. Farquhar and I. Cowan, eds.), pp. 229-251. University Press, Stanford.
- Morison, J. I. L. (1998). Stomatal response to increased CO₂ concentration. *Journal of Experimental Botany* **49**, 443-452.
- Müller-Röber, B., Koßmann, J., Hannah, L. C., Willmitzer, L., and Sonnewald, U. (1990). One of two different ADP-Glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. *Molecular and General Genetics MGG* **224**, 136-146.
- Müller, B., Pantin, F., Génard, M., Turc, O., Freixes, S., Piques, M., and Gibon, Y. (2011). Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1715-1729.
- Müller, C., Scheible, W. R., Stitt, M., and Krapp, A. (2001). Influence of malate and 2-oxoglutarate on the *NIA* transcript level and nitrate reductase activity in tobacco leaves. *Plant, Cell and Environment* **24**, 191-203.
- Müller, J., Aeschbacher, R. A., Sprenger, N., Boller, T., and Wiemken, A. (2000). Disaccharide-mediated regulation of sucrose:fructan-6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. *Plant Physiology* **123**, 265-274.
- Munns, R., Passioura, J. B., Guo, J., Chazen, O., and Cramer, G. R. (2000). Water relations and leaf expansion: importance of time scale. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1495-1504.
- Muñoz, F. J., Baroja-Fernández, E., Morán-Zorzano, M. T., Viale, A. M., Etxeberria, E., Alonso-Casajús, N., and Pozueta-Romero, J. (2005). Sucrose synthase controls both intracellular ADP-Glucose levels and transitory starch biosynthesis in source leaves. *Plant and Cell Physiology* **46**, 1366-1376.
- Nagaraj, V. J., Altenbach, D., Galati, V., Lüscher, M., Meyer, A. D., Boller, T., and Wiemken, A. (2004). Distinct regulation of sucrose: sucrose-1-fructosyltransferase (1-SST) and sucrose: fructan-6-fructosyltransferase (6-SFT), the key enzymes of fructan synthesis in barley leaves: 1-SST as the pacemaker. *New Phytologist* **161**, 735-748.
- Nagaraj, V. J., Galati, V., Lüscher, M., Boller, T., and Wiemken, A. (2005). Cloning and functional characterization of a cDNA encoding barley soluble acid invertase (HvINV1). *Plant Science* **168**, 249-258.
- Nagaraj, V. J., Riedl, R., Boller, T., Wiemken, A., and Meyer, A. D. (2001). Light and sugar regulation of the barley sucrose : fructan 6-fructosyltransferase promoter. *Journal of Plant Physiology* **158**, 1601-1607.
- Nayyar, H., and Walia, D. P. (2004). Genotypic variation in wheat in response to water stress and abscisic acid-induced accumulation of osmolytes in developing grains. *Journal of Agronomy and Crop Science* **190**, 39-45.
- Neuhaus, H. E., Häusler, R. E., and Sonnewald, U. (2005). No need to shift the paradigm on the metabolic pathway to transitory starch in leaves. *Trends in Plant Science* **10**, 154-156.
- Nevo, E., and Chen, G. (2010). Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, Cell and Environment* **33**, 670-685.
- Nevo, E., and Shewry, P. (1992). Origin, evolution, population genetics and resources for breeding of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in the Fertile Crescent. *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*, 19-43.
- Nielsen, T. H., Krapp, A., Röper-Schwarz, U., and Stitt, M. (1998). The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP-Glucose

- pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen. *Plant, Cell and Environment* **21**, 443-454.
- Nielsen, T. H., Rung, J. H., and Villadsen, D. (2004). Fructose-2,6-bisphosphate: a traffic signal in plant metabolism. *Trends in Plant Science* **9**, 556-563.
- Niyogi, K. K. (2000). Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 455-460.
- Nonami, H. (1998). Plant water relations and control of cell elongation at low water potentials. *Journal of Plant Research* **111**, 373-382.
- Noorka, I., and Noorka (2013). Water stress tolerance, its relationship to stem reserve mobilization and potence ratio in spring wheat. *American Journal of Plant Sciences* **04**, 231-237.
- Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., and Stitt, M. (2010). Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Molecular Plant* **3**, 973-996.
- Okita, T. W., Nakata, P. A., Anderson, J. M., Sowokinos, J., Morell, M., and Preiss, J. (1990). The subunit structure of potato tuber ADP-Glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology* **93**, 785-790.
- Osuna, D., Usadel, B., Morcuende, R., Gibon, Y., Bläsing, O. E., Höhne, M., Günter, M., Kamlage, B., Trethewey, R., Scheible, W.-R., and Stitt, M. (2007). Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal* **49**, 463-491.
- Ozturk, Z. N., Talamé, V., Deyholos, M., Michalowski, C. B., Galbraith, D. W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R., and Bohnert, H. J. (2002). Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology* **48**, 551-573.
- Panković, D., Sakač, Z., Kevrešan, S., and Plesničar, M. (1999). Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: photosynthesis, electron transport and carbon metabolism. *Journal of Experimental Botany* **50**, 128-138.
- Parry, M. A. J., Andralojc, P. J., Khan, S., Lea, P. J., and Keys, A. J. (2002). Rubisco activity: Effects of drought stress. *Annals of Botany* **89**, 833-839.
- Parsons, R., Weyers, J. D. B., Lawson, T., and Godber, I. M. (1998). Rapid and straightforward estimates of photosynthetic characteristics using a portable gas exchange system. *Photosynthetica* **34**, 265-279.
- Peltonen-Sainio, P., Kangas, A., Salo, Y., and Jauhiainen, L. (2007). Grain number dominates grain weight in temperate cereal yield determination: Evidence based on 30 years of multi-location trials. *Field Crops Research* **100**, 179-188.
- Pelleschi, S., Rocher, J. P., and Prioul, J. L. (1997). Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant, Cell and Environment* **20**, 493-503.
- Pelloux, J., Jolivet, Y., Fontaine, V., Banvoy, J., and Dizengremel, P. (2001). Changes in Rubisco and Rubisco activase gene expression and polypeptide content in *Pinus halepensis* M. subjected to ozone and drought. *Plant, Cell and Environment* **24**, 123-131.
- Peng, S., Yang, J., Laza, R. C., Sanico, A. L., Visperas, R. M., and Son, T. T. (2003). Physiological bases of eterosis and crop management strategies for hybrid rice in the tropics. In "Hybrid Rice for Food Security, Poverty Alleviation, and Environmental Protection " (S. Virmani, C. Mao and B. Harby, eds.), pp. 153-70, Los Baños, the Philippines: International Rice Research Institute.
- Penning de Vries, F. (1975). Use of assimilates in higher plants. In "Photosynthesis and Productivity in Different Environments", (J. P. Cooper, ed.), pp. 541-557. Cambridge University Press.
- Pereira, J. S., and Chaves, M. (1993). Plant water deficit in Mediterranean ecosystems. In "Plant Responses yo Water Deficit - From Cell to Community" (J. A. C. Smith and H. Griffiths, eds.), pp. 237-251. BIOS Scientific Publcatons, Oxford, U.K.
- Pérez, P., Alonso, A., Zita, G., Morcuende, R., and Martínez-Carrasco, R. (2011). Down-regulation of Rubisco activity under combined increases of CO₂ and temperature minimized by changes in Rubisco k_{cat} in wheat. *Plant Growth Regulation* **65**, 439-447.
- Pérez, P., Morcuende, R., Martín del Molino, I., and Martínez-Carrasco, R. (2005). Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO₂, temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environmental and Experimental Botany* **53**, 13-27.

- Pérez, P., Morcuende, R., Martín del Molino, I., Sánchez de la Puente, L., and Martínez-Carrasco, R. (2001). Contrasting responses of photosynthesis and carbon metabolism to low temperatures in tall fescue and clovers. *Physiologia Plantarum* **112**, 478-486.
- Peshev, D., Vergauwen, R., Moglia, A., Hideg, É., and Van den Ende, W. (2013). Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: A role for fructans?. *Journal of Experimental Botany* **64**, 1025-1038.
- Pilon-Smits, E., Ebskamp, M., Paul, M. J., Jeuken, M., Weisbeek, P. J., and Smeekens, S. (1995). Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology* **107**, 125-130.
- Pilon-Smits, E. A. H., Hwang, S., Mel Lytle, C., Zhu, Y., Tai, J. C., Bravo, R. C., Chen, Y., Leustek, T., and Terry, N. (1999). Overexpression of ATP sulfurylase in indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. *Plant Physiology* **119**, 123-132.
- Pinheiro, C., and Chaves, M. M. (2011). Photosynthesis and drought: Can we make metabolic connections from available data?. *Journal of Experimental Botany* **62**, 869-882.
- Pinheiro, C., Chaves, M. M., and Ricardo, C. P. (2001). Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of *Lupinus albus* L. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1063-1070.
- Piques, M., Schulze, W. X., Höhne, M., Usadel, B., Gibon, Y., Rohwer, J., and Stitt, M. (2009). Ribosome and transcript copy numbers, polysome occupancy and enzyme dynamics in *Arabidopsis*. *Molecular Systems Biology* **5**, 1-17.
- Plaut, Z., Butow, B. J., Blumenthal, C. S., and Wrigley, C. W. (2004). Transport of dry matter into developing wheat kernels and its contribution to grain yield under post-anthesis water deficit and elevated temperature. *Field Crops Research* **86**, 185-198.
- Pollock, C. J., and Cairns, A. J. (1991). Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 77-101.
- Poorter, H., and Evans, J. R. (1998). Photosynthetic nitrogen-use efficiency of species that differ inherently in specific leaf area. *Oecologia* **116**, 26-37.
- Quick, W. P., Chaves, M. M., Wendler, R., David, M., Rodrigues, M. L., Passaharinho, J. A., Pereira, J. S., Adcock, M. D., Leegood, R. C., and Stitt, M. (1992). The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant, Cell and Environment* **15**, 25-35.
- Ramel, F., Sulmon, C., Gouesbet, G., and Couée, I. (2009). Natural variation reveals relationships between pre-stress carbohydrate nutritional status and subsequent responses to xenobiotic and oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* **104**, 1323-1337.
- Ramirez-Vallejo, P., and Kelly, J. (1998). Traits related to drought resistance in common bean. *Euphytica* **99**, 127-136.
- Rampino, P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G., and Perrotta, C. (2006). Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant, Cell and Environment* **29**, 2143-2152.
- Rao, R. S. P., Andersen, J. R., Dionisio, G., and Boelt, B. (2011). Fructan accumulation and transcription of candidate genes during cold acclimation in three varieties of *Poa pratensis*. *Journal of Plant Physiology* **168**, 344-351.
- Rapacz, M., Wolanin, B., Hura, K., and Tyrka, M. (2008). The effects of cold acclimation on photosynthetic apparatus and the expression of *COR14b* in four genotypes of barley (*Hordeum vulgare*) contrasting in their tolerance to freezing and high-light treatment in cold conditions. *Annals of Botany* **101**, 689-699.
- Rawson, H., Hindmarsh, J., Fischer, R., and Stockman, Y. (1983). Changes in leaf photosynthesis with plant ontogeny and relationships with yield per ear in wheat cultivars and 120 progeny. *Functional Plant Biology* **10**, 503-514.
- Rebetzke, G. J., van Herwaarden, A. F., Jenkins, C., Weiss, M., Lewis, D., Ruuska, S., Tabe, L., Fettell, N. A., and Richards, R. A. (2008). Quantitative trait loci for water-soluble carbohydrates and associations with agronomic traits in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* **59**, 891-905.

- Reda, M., and Kłobus, G. (2008). Effect of different oxygen availability on the nitrate reductase activity in *Cucumis sativus* roots. *Biologia Plantarum* **52**, 674-680.
- Reimholz, R., Geigenberger, P., and Stitt, M. (1994). Sucrose-phosphate synthase is regulated via metabolites and protein phosphorylation in potato tubers, in a manner analogous to the enzyme in leaves. *Planta* **192**, 480-488.
- Reymond, M., Muller, B., Leonardi, A., Charcosset, A., and Tardieu, F. (2003). Combining Quantitative Trait Loci analysis and an ecophysiological model to analyze the genetic variability of the responses of maize leaf growth to temperature and water deficit. *Plant Physiology* **131**, 664-675.
- Reynolds, M., Calderini, D., Condon, A., and Vargas, M. (2007). Association of source/sink traits with yield, biomass and radiation use efficiency among random sister lines from three wheat crosses in a high yield environment. *Journal of Agricultural Science* **145**, 3.
- Reynolds, M., Dreccer, F., and Trethowan, R. (2006). Drought-adaptive traits derived from wheat wild relatives and landraces. *Journal of Experimental Botany*, 1-10.
- Reynolds, M. P., Mujeeb-Kazi, A., and Sawkins, M. (2005). Prospects for utilising plant-adaptive mechanisms to improve wheat and other crops in drought- and salinity-prone environments. *Annals of Applied Biology* **146**, 239-259.
- Riccardi, F., Gazeau, P., de Vienne, D., and Zivy, M. (1998). Protein changes in response to progressive water deficit in maize: Quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiology* **117**, 1253-1263.
- Richards, R. A., Rebetzke, G. J., Condon, A. G., and van Herwaarden, A. F. (2002). Breeding opportunities for increasing the efficiency of water use and crop yield in temperate cereals. *Crop Science* **42**, 111-121.
- Richards, R. A., and Townley-Smith, T. F. (1987). Variation in leaf area development and its effect on water use, yield and harvest index of droughted wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* **38**, 983-992.
- Ritchie, S. W., Nguyen, H. T., and Holaday, A. S. (1990). Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science* **30**, 105-111.
- Ritsema, T., Brodmann, D., Diks, S. H., Bos, C. L., Nagaraj, V., Pieterse, C. M., Boller, T., Wiemken, A., and Peppelenbosch, M. P. (2009). Are small GTPases signal hubs in sugar-mediated induction of fructan biosynthesis?. *PLoS ONE* **4**, 1-11.
- Ritsema, T., and Smeekens, S. (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 223-230.
- Rizza, F., Badeck, F. W., Cattivelli, L., Lidestri, O., Di Fonzo, N., and Stanca, A. M. (2004). Use of a water stress index to identify barley genotypes adapted to rainfed and irrigated conditions. *Crop Science* **44**.
- Rodrigues, M. L., Pacheco, C. M. A., and Chaves, M. M. (1995). Soil-plant water relations, root distribution and biomass partitioning in *Lupinus albus* L. under drought conditions. *Journal of Experimental Botany* **46**, 947-956.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 675-709.
- Roth, A., Lüscher, M., Sprenger, N., Boller, T., and Wiemken, A. (1997). Fructan and fructan-metabolizing enzymes in the growth zone of barley leaves. *New Phytologist* **136**, 73-79.
- Rouphael, Y., Cardarelli, M., Schwarz, D., Franken, P., and Colla, G. (2012). Effects of drought on nutrient uptake and assimilation in vegetable crops. In "Plant Responses to Drought Stress" (R. Aroca, ed.), pp. 171-195. Springer Berlin Heidelberg.
- Ruuska, S. A., Lewis, D. C., Kennedy, G., Furbank, R. T., Jenkins, C. L. D., and Tabe, L. M. (2008). Large scale transcriptome analysis of the effects of nitrogen nutrition on accumulation of stem carbohydrate reserves in reproductive stage wheat. *Plant Molecular Biology* **66**, 15-32.
- Ruuska, S. A., Rebetzke, G. J., Van Herwaarden, A. F., Richards, R. A., Fettell, N. A., Tabe, L., and Jenkins, C. L. D. (2006). Genotypic variation in water-soluble carbohydrate accumulation in wheat. *Functional Plant Biology* **33**, 799-809.

- Ruuska, S. A., Schwender, J., and Ohlrogge, J. B. (2004). The capacity of green oilseeds to utilize photosynthesis to drive biosynthetic processes. *Plant Physiology* **136**, 2700-2709.
- Saibo, N. J. M., Lourenço, T., and Oliveira, M. M. (2009). Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany* **103**, 609-623.
- Saini, H. S., and Westgate, M. E. (1999). Reproductive development in grain crops during drought. In "Advances in Agronomy" (D. Sparks, ed.), Vol. 68, pp. 59-96. Academic Press.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning," Cold Spring Harbor Laboratory press New York.
- Sánchez-Rodríguez, J. (1998). Estudio de la fotosíntesis y las relaciones hídricas en *Casuarina equisetifolia* Forst. & Forst. *Universidad de Salamanca, Facultad de Biología Tesis Doctoral*, 263p.
- Sánchez-Rodríguez, J., Martínez-Carrasco, R., and Pérez, P. (1997). Photosynthetic electron transport and carbon-reduction-cycle enzyme activities under long-term drought stress in *Casuarina equisetifolia* Forst. & Forst. *Photosynthesis Research* **52**, 255-262.
- Sánchez-Rodríguez, J., Pérez, P., and Martínez-Carrasco, R. (1999). Photosynthesis, carbohydrate levels and chlorophyll fluorescence-estimated intercellular CO₂ in water-stressed *Casuarina equisetifolia* Forst. & Forst. *Plant, Cell and Environment* **22**, 867-873.
- Sanders, G., and Arndt, S. (2012). Osmotic adjustment under drought conditions. In "Plant Responses to Drought Stress" (R. Aroca, ed.), pp. 199-229. Springer Berlin Heidelberg.
- Sauter, A., Davies, W. J., and Hartung, W. (2001). The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1991-1997.
- Scofield, G. N., Ruuska, S. A., Aoki, N., Lewis, D. C., Tabe, L. M., and Jenkins, C. L. D. (2009). Starch storage in the stems of wheat plants: localization and temporal changes. *Annals of Botany* **103**, 859-868.
- Scheible, W.-R., González-Fontes, A., Morcuende, R., Lauerer, M., Geiger, M., Glaab, J., Gojon, A., Schulze, E.-D., and Stitt, M. (1997a). Tobacco mutants with a decreased number of functional nia genes compensate by modifying the diurnal regulation of transcription, post-translational modification and turnover of nitrate reductase. *Planta* **203**, 304-319.
- Scheible, W.-R., Lauerer, M., Schulze, E.-D., Caboche, M., and Stitt, M. (1997b). Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *The Plant Journal* **11**, 671-691.
- Scheible, W.-R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M. K., and Stitt, M. (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiology* **136**, 2483-2499.
- Scheible, W. R., Gonzalez-Fontes, A., Lauerer, M., Muller-Rober, B., Caboche, M., and Stitt, M. (1997c). Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *The Plant Cell* **9**, 783-798.
- Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols* **3**, 1101-1108.
- Schnorr, K., Juricek, M., Huang, C., Culley, D., and Kleinhofs, A. (1991). Analysis of barley nitrate reductase cDNA and genomic clones. *Molecular and General Genetics MGG* **227**, 411-416.
- Schnyder, H. (1993). The role of carbohydrate storage and redistribution in the source-sink relations of wheat and barley during grain filling-a review. *New Phytologist* **123**, 233-245.
- Scholl, R. L., Harper, J. E., and Hageman, R. H. (1974). Improvements of the nitrite color development in assays of nitrate reductase by phenazine methosulfate and zinc acetate. *Plant Physiology* **53**, 825-828.
- Schonfeld, M. A., Johnson, R. C., Carver, B. F., and Mornhinweg, D. W. (1988). Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Science* **28**, 526-531.
- Schulte, D., Close, T. J., Graner, A., Langridge, P., Matsumoto, T., Muehlbauer, G., Sato, K., Schulman, A. H., Waugh, R., Wise, R. P., and Stein, N. (2009). The international barley sequencing

- consortium-At the threshold of efficient access to the barley genome. *Plant Physiology* **149**, 142-147.
- Sečenji, M., Lendvai, Á., Miskolczi, P., Kocsy, G., Gallé, Á., Szúcs, A., Hoffmann, B., Sárvári, É., Schweizer, P., Stein, N., Dudits, D., and Györgyey, J. (2010). Differences in root functions during long-term drought adaptation: comparison of active gene sets of two wheat genotypes. *Plant Biology* **12**, 871-882.
- Shangguan, Z., Shao, M., and Dyckmans, J. (1999). Interaction of osmotic adjustment and photosynthesis in winter wheat under soil drought. *Journal of Plant Physiology* **154**, 753-758.
- Sharkey, T. D. (1985). O₂-insensitive photosynthesis in C₃ plants : Its occurrence and a possible explanation. *Plant Physiology* **78**, 71-75.
- Sharkey, T. D. (1990). Water stress effects on photosynthesis. *Photosynthetica* **24**, 651-651.
- Sharp, R. E., Wu, Y., Voetberg, G. S., Saab, I. N., and LeNoble, M. E. (1994). Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials. *Journal of Experimental Botany* **45**, 1743-1751.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **58**, 221-227.
- Simmen, U., Obenland, D., Boller, T., and Wiemken, A. (1993). Fructan synthesis in excised barley leaves (identification of two sucrose-sucrose fructosyltransferases induced by light and their separation from constitutive invertases). *Plant Physiology* **101**, 459-468.
- Sims, I. M., Pollock, C. J., and Horgan, R. (1992). Structural analysis of oligomeric fructans from excised leaves of *Lolium temulentum*. *Phytochemistry* **31**, 2989-2992.
- Sinclair, T. R., and Ludlow, M. M. (1985). Who taught plants thermodynamics?. The unfulfilled potential of plant water potential. *Functional Plant Biology* **12**, 213-217.
- Singh, I. D., and Stoskopf, N. C. (1971). Harvest index in cereals. *Agronomy Journal* **63**, 224-226.
- Slewinski, T. L. (2012). Non-structural carbohydrate partitioning in grass stems: a target to increase yield stability, stress tolerance, and biofuel production. *Journal of Experimental Botany* **63**, 4647-4670.
- Smirnov, N., and Stewart, G. R. (1985). Nitrate assimilation and translocation by higher plants: Comparative physiology and ecological consequences. *Physiologia Plantarum* **64**, 133-140.
- Smith, A. M., and Stitt, M. (2007). Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell and Environment* **30**, 1126-1149.
- Socias, X., Correia, M. J., Chaves, M., and Medrano, H. (1997). The role of abscisic acid and water relations in drought responses of subterranean clover. *Journal of Experimental Botany* **48**, 1281-1288.
- Sokolov, L., Déjardin, A., and Kleczkowski, L. (1998). Sugars and light/dark exposure trigger differential regulation of ADP-Glucose pyrophosphorylase genes in *Arabidopsis thaliana* (thale cress). *Biochemical Journal* **336**, 681-687.
- Sorrells, M. E., and Wilson, W. A. (1997). Direct classification and selection of superior alleles for crop improvement. *Crop Science* **37**, 691-697.
- Souza, R. P., Machado, E. C., Silva, J. A. B., Lagôa, A. M. M. A., and Silveira, J. A. G. (2004). Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environmental and Experimental Botany* **51**, 45-56.
- Sprenger, N., Bortlik, K., Brandt, A., Boller, T., and Wiemken, A. (1995). Purification, cloning, and functional expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 11652-11656.
- Sprenger, N., Schellenbaum, L., Van Dun, K., Boller, T., and Wiemken, A. (1997). Fructan synthesis in transgenic tobacco and chicory plants expressing barley sucrose:fructan 6-fructosyltransferase. *FEBS Letters* **400**, 355-358.
- Stanca, A. M., Romagosa, I., Takeda, K., Lundborg, T., Terzi, V., and Cattivelli, L. (2003). Chapter 9: Diversity in abiotic stress tolerances. In "Diversity in Barley (*Hordeum vulgare*)" (R. Von Bothmer, T. Van Hintum, H. Knüpfner and K. Sato, eds.), Vol. 7, pp. 179-199. Elsevier.

- Stitt, M., Huber, S., and Kerr, P. (1987). Control of photosynthetic sucrose formation. In "The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise" (M. Hatch and N. Boardman, eds.), Vol. 8, pp. 327-409. Academic, New York.
- Stitt, M., Lilley, R. M., Gerhardt, R., and Heldt, H. W. (1989). Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. In "Methods in Enzymology" (B. F. Sidney Fleischer, ed.), Vol. 174, pp. 518-552. Academic Press.
- Stitt, M., Lunn, J., and Usadel, B. (2010). Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism - more than the icing on the cake. *The Plant Journal* **61**, 1067-1091.
- Stitt, M., Müller, C., Matt, P., Gibon, Y., Carillo, P., Morcuende, R., Scheible, W. R., and Krapp, A. (2002). Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany* **53**, 959-970.
- Sulpice, R., Pyl, E.-T., Ishihara, H., Trenkamp, S., Steinfath, M., Witucka-Wall, H., Gibon, Y., Usadel, B., Poree, F., Piques, M. C., Von Korff, M., Steinhäuser, M. C., Keurentjes, J. J. B., Guenther, M., Hoehne, M., Selbig, J., Fernie, A. R., Altmann, T., and Stitt, M. (2009). Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 10348-10353.
- Sulpice, R., Trenkamp, S., Steinfath, M., Usadel, B., Gibon, Y., Witucka-Wall, H., Pyl, E.-T., Tschoep, H., Steinhäuser, M. C., Guenther, M., Hoehne, M., Rohwer, J. M., Altmann, T., Fernie, A. R., and Stitt, M. (2010). Network analysis of enzyme activities and metabolite levels and their relationship to biomass in a large panel of Arabidopsis accessions. *The Plant Cell* **22**, 2872-2893.
- Szydlowski, N., Ragel, P., Raynaud, S., Lucas, M. M., Roldán, I., Montero, M., Muñoz, F. J., Ovecka, M., Bahaji, A., Planchot, V., Pozueta-Romero, J., D'Hulst, C., and Mérida, A. (2009). Starch granule initiation in Arabidopsis requires the presence of either class IV or class III starch synthases. *The Plant Cell* **21**, 2443-2457.
- Tahara, M., Carver, B., Johnson, R., and Smith, E. (1990). Relationship between relative water content during reproductive development and winter wheat grain yield. *Euphytica* **49**, 255-262.
- Taiz, L., and Zeiger, E. (2006a). Photosynthesis: carbon reactions. In "Plant Physiology" (S. Associates, ed.), 4th Edition, pp. 159-195. Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Taiz, L., and Zeiger, E. (2006b). Stress physiology, water deficit and drought tolerance. In "Plant Physiology" (S. Associates, ed.), 4th Edition, pp. 672-680. Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Tambussi, E. A., Bort, J., and Araus, J. L. (2007). Water use efficiency in C₃ cereals under Mediterranean conditions: a review of physiological aspects. *Annals of Applied Biology* **150**, 307-321.
- Tanksley, S. D., and Nelson, J. C. (1996). Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theoretical and Applied Genetics* **92**, 191-203.
- Tardieu, F., Granier, C., and Muller, B. (1999). Modelling leaf expansion in a fluctuating environment: are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate?. *New Phytologist* **143**, 33-43.
- Tardieu, F., Reymond, M., Hamard, P., Granier, C., and Muller, B. (2000). Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: A synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1505-1514.
- Tardieu, F., Reymond, M., Muller, B., Granier, C., Simonneau, T., Sadok, W., and Welcker, C. (2005). Linking physiological and genetic analyses of the control of leaf growth under changing environmental conditions. *Australian Journal of Agricultural Research* **56**, 937-946.
- Tardieu, F., and Simonneau, T. (1998). Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany* **49**, 419-432.
- Terashima, I. (1992). Anatomy of non-uniform leaf photosynthesis. *Photosynthesis Research* **31**, 195-212.
- Tetlow, I. J., Davies, E. J., Vardy, K. A., Bowsher, C. G., Burrell, M. M., and Emes, M. J. (2003). Subcellular localization of ADP-Glucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm

- and analysis of the properties of a plastidial isoform. *Journal of Experimental Botany* **54**, 715-725.
- Tetlow, I. J., Morell, M. K., and Emes, M. J. (2004). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2131-2145.
- Teulat, B., Borries, C., and This, D. (2001). New QTLs identified for plant water status, water-soluble carbohydrate and osmotic adjustment in a barley population grown in a growth-chamber under two water regimes. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 161-170.
- Teulat, B., Monneveux, P., Wery, J., Borries, C., Souyris, I., Charrier, A., and This, D. (1997). Relationships between relative water content and growth parameters under water stress in barley: a QTL study. *New Phytologist* **137**, 99-107.
- Teulat, B., Zoumarou-Wallis, N., Rotter, B., Ben Salem, M., Bahri, H., and This, D. (2003). QTL for relative water content in field-grown barley and their stability across Mediterranean environments. *Theoretical and Applied Genetics* **108**, 181-188.
- Tezara, W., Mitchell, V., Driscoll, S., and Lawlor, D. (1999). Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* **401**, 914-917.
- Tezara, W., Mitchell, V., Driscoll, S. P., and Lawlor, D. W. (2002). Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1781-1791.
- Thomas, H., and James, A. R. (1999). Partitioning of sugars in *Lolium perenne* (perennial ryegrass) during drought and on rewatering. *New Phytologist* **142**, 295-305.
- Thomas, W. (2002). Chapter 8: Molecular marker-assisted versus conventional selection in barley breeding. In "Barley Science. Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality." (G. A. Slafer, J. L. Molina-Cano, R. Savin, J. L. Araus and I. Romagosa, eds.), pp. 177-203. Food Products Press, New York.
- Tiessen, A., Nerlich, A., Faix, B., Hümmer, C., Fox, S., Trafford, K., Weber, H., Weschke, W., and Geigenberger, P. (2012). Subcellular analysis of starch metabolism in developing barley seeds using a non-aqueous fractionation method. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2071-2087.
- Tiessen, A., Prescha, K., Branscheid, A., Palacios, N., McKibbin, R., Halford, N. G., and Geigenberger, P. (2003). Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-Glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *The Plant Journal* **35**, 490-500.
- Tjaden, J., Möhlmann, T., Kampfenkel, K., Henrichs, G., and Neuhaus, H. E. (1998). Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch. *The Plant Journal* **16**, 531-540.
- Toroser, D., and Huber, S. C. (1997). Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic-stress activation of sucrose-phosphate synthase in spinach leaves. *Plant Physiology* **114**, 947-955.
- Trouverie, J., Thévenot, C., Rocher, J. P., Sotta, B., and Prioul, J. L. (2003). The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2177-2186.
- Turk, S. C. H. J., de Roos, K., Scotti, P. A., Van Dun, K., Weisbeek, P., and Smeekens, S. C. M. (1997). The vacuolar sorting domain of sporamin transports GUS, but not levansucrase, to the plant vacuole. *New Phytologist* **136**, 29-38.
- Udvardi, M. K., Czechowski, T., and Scheible, W.-R. (2008). Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *The Plant Cell* **20**, 1736-1737.
- Ullrich, S. E. (2010). Significance, adaptation, production, and trade of barley. In "Barley: Production, Improvement, and Uses" (S. Ullrich, ed.), pp. 3-13. Wiley-Blackwell, Oxford. UK.
- Van den Boogaard, R., Veneklaas, E., Peacock, J., and Lambers, H. (1996). Yield and water use of wheat (*Triticum aestivum*) in a Mediterranean environment: Cultivar differences and sowing density effects. *Plant and Soil* **181**, 251-262.
- Van den Ende, W., Clerens, S., Vergauwen, R., Van Riet, L., Van Laere, A., Yoshida, M., and Kawakami, A. (2003). Fructan 1-exohydrolases. β -(2,1)-Trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat?. Purification, characterization, mass mapping, and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiology* **131**, 621-631.

- Van den Ende, W., Coopman, M., Clerens, S., Vergauwen, R., Le Roy, K., Lammens, W., and Van Laere, A. (2011). Unexpected presence of graminan- and levan-type fructans in the evergreen frost-hardy eudicot *Pachysandra terminalis* (Buxaceae): Purification, cloning, and functional analysis of a 6-SST/6-SFT enzyme. *Plant Physiology* **155**, 603-614.
- Van den Ende, W., De Coninck, B., and Van Laere, A. (2004). Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense?. *Trends in Plant Science* **9**, 523-528.
- Van den Ende, W., Yoshida, M., Clerens, S., Vergauwen, R., and Kawakami, A. (2005). Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist* **166**, 917-932.
- Van Herwaarden, A. F., Richards, R. A., Farquhar, G. D., and Angus, J. F. (1998). 'Haying-off', the negative grain yield response of dryland wheat to nitrogen fertiliser III. The influence of water deficit and heat shock. *Australian Journal of Agricultural Research* **49**, 1095-1110.
- Van Laere, A., and Van den Ende, W. (2002). Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell and Environment* **25**, 803-813.
- Van Volkenburgh, E., and Davies, W. J. (1983). Inhibition of light-stimulated leaf expansion by abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* **34**, 835-845.
- Vavasseur, A., and Raghavendra, A. S. (2005). Guard cell metabolism and CO₂ sensing. *New Phytologist* **165**, 665-682.
- Verspreet, J., Cimini, S., Vergauwen, R., Dornez, E., Locato, V., Le Roy, K., De Gara, L., Van den Ende, W., Delcour, J. A., and Courtin, C. M. (2013). Fructan metabolism in developing wheat (*Triticum aestivum* L.) kernels. *Plant and Cell Physiology* **54**(12), 2047-2057.
- Vidal, E. A., and Gutiérrez, R. A. (2008). A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 521-529.
- Vidmar, J. J., Zhuo, D., Siddiqi, M. Y., Schjoerring, J. K., Touraine, B., and Glass, A. D. M. (2000). Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiology* **123**, 307-318.
- Vijn, I., and Smeekens, S. (1999). Fructan: More than a reserve carbohydrate?. *Plant Physiology* **120**, 351-360.
- Villadsen, D., and Nielsen, T. (2001). N-terminal truncation affects the kinetics and structure of fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* **359**, 591-597.
- Villadsen, D., Rung, J. H., and Nielsen, T. H. (2005). Osmotic stress changes carbohydrate partitioning and fructose-2,6-bisphosphate metabolism in barley leaves. *Functional Plant Biology* **32**, 1033-1043.
- Vincent, D., Lapierre, C., Pollet, B., Cornic, G., Negroni, L., and Zivy, M. (2005). Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiology* **137**, 949-960.
- Vincentz, M., Moureaux, T., Leydecker, M.-T., Vaucheret, H., and Caboche, M. (1993). Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *The Plant Journal* **3**, 315-324.
- Virgona, J., and Barlow, E. (1991). Drought stress induces changes in the non-structural carbohydrate composition of wheat stems. *Functional Plant Biology* **18**, 239-247.
- Vogel, O. A., Allan, R. E., and Peterson, C. J. (1963). Plant and performance characteristics of semidwarf winter wheats producing most efficiently in Eastern Washington *Agronomy Journal* **55**, 397-398.
- Volaire, F., and Lelièvre, F. (1997). Production, persistence, and water-soluble carbohydrate accumulation in 21 contrasting populations of *Dactylis glomerata* L. subjected to severe drought in the south of France. *Australian Journal of Agricultural Research* **48**, 933-944.
- Volaire, F., Thomas, H., Bertagne, N., Bourgeois, E., Gautier, M.-F., and Lelièvre, F. (1998). Survival and recovery of perennial forage grasses under prolonged Mediterranean drought: II. Water status, solute accumulation, abscisic acid concentration and accumulation of dehydrin transcripts in bases of immature leaves. *New Phytologist* **140**, 451-460.

- Voltas, J., Romagosa, I., and Araus, J. L. (1998). Growth and final weight of central and lateral barley grains under mediterranean conditions as influenced by sink strength. *Crop Science* **38**, 84-89.
- Von Bothmer, R., and Komatsuda, T. (2010). Barley origin and related species. In "Barley: Production, Improvement, and Uses" (S. Ullrich, ed.), pp. 14-62. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Von Bothmer, R., Sato, K., Knüpfper, H., and Van Hintum, T. (2003a). Chapter 1: Barley diversity - an introduction. In "Diversity in Barley (*Hordeum vulgare*)" (R. Von Bothmer, T. Van Hintum, H. Knüpfper and K. Sato, eds.), Vol. 7, pp. 3-8. Elsevier.
- Von Bothmer, R., Sato, K., Komatsuda, T., Yasuda, S., and Fischbeck, G. (2003b). Chapter 2: The domestication of cultivated barley. In "Diversity in Barley (*Hordeum vulgare*)" (R. Von Bothmer, T. Van Hintum, H. Knüpfper and K. Sato, eds.), Vol. 7, pp. 9-27. Elsevier.
- Von Wettstein, D., Gough, S., and Kannangara, C. G. (1995). Chlorophyll biosynthesis. *The Plant Cell* **7**, 1039.
- Wagner, W. (1986). Regulation of fructan metabolism in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel). *Plant Physiology* **81**, 444.
- Wagner, W., and Wiemken, A. (1989). Fructan metabolism in expanded primary leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel): Change upon ageing and spatial organization along the leaf blade. *Journal of Plant Physiology* **134**, 237-242.
- Wagner, W., Wiemken, A., and Matile, P. (1986). Regulation of fructan metabolism in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel). *Plant Physiology* **81**, 444-447.
- Wang, C., Van den Ende, W., and Tillberg, J.-E. (2000). Fructan accumulation induced by nitrogen deficiency in barley leaves correlates with the level of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase mRNA. *Planta* **211**, 701-707.
- Wang, R., Okamoto, M., Xing, X., and Crawford, N. M. (2003). Microarray analysis of the nitrate response in Arabidopsis roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiology* **132**, 556-567.
- Wang, T., Chen, L., Zhao, M., Tian, Q., and Zhang, W.-H. (2011). Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *BMC Genomics* **12**, 367.
- Wardlaw, I., and Willenbrink, J. (1994). Carbohydrate storage and mobilisation by the culm of wheat between heading and grain maturity: the relation to sucrose synthase and sucrose-phosphate synthase. *Functional Plant Biology* **21**, 255-271.
- Wardlaw, I. F., and Willenbrink, J. (2000). Mobilization of fructan reserves and changes in enzyme activities in wheat stems correlate with water stress during kernel filling. *New Phytologist* **148**, 413-422.
- Weber, H., Borisjuk, L., and Wobus, U. (2005). Molecular physiology of legume seed development. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 253-279.
- Weiner, H., Weiner, H., and Stitt, M. (1993). Sucrose-phosphate synthase phosphatase, a type 2A protein phosphatase, changes its sensitivity towards inhibition by inorganic phosphate in spinach leaves. *FEBS Letters* **333**, 159-164.
- Weldearegay, D. F., Yan, F., Jiang, D., and Liu, F. (2012). Independent and combined effects of soil warming and drought stress during anthesis on seed set and grain yield in two spring wheat varieties. *Journal of Agronomy and Crop Science* **198**, 245-253.
- Wery, J., Silim, S. N., Knights, E. J., Malhotra, R. S., and Cousin, R. (1994). Screening techniques and sources of tolerance to extremes of moisture and air temperature in cool season food legumes. *Euphytica* **73**, 73-83.
- Weschke, W., Panitz, R., Gubatz, S., Wang, Q., Radchuk, R., Weber, H., and Wobus, U. (2003). The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *The Plant Journal* **33**, 395-411.
- Weyens, G., Ritsema, T., Van Dun, K., Meyer, D., Lommel, M., Lathouwers, J., Rosquin, I., Denys, P., Tossens, A., Nijs, M., Turk, S., Gerrits, N., Bink, S., Walraven, B., Lefèbvre, M., and Smeekens, S. (2004). Production of tailor-made fructans in sugar beet by expression of onion fructosyltransferase genes. *Plant Biotechnology Journal* **2**, 321-327.

- Wheeler, R. M., Mackowiak, C. L., Yorio, N. C., and Sager, J. C. (1999). Effects of CO₂ on stomatal conductance: Do stomata open at very high CO₂ concentrations?. *Annals of Botany* **83**, 243-251.
- Wiemken, A., Sprenger, N., and Boller, T. (1995). Fructan: an extension of sucrose by sucrose. In "Sucrose Metabolism, Biochemistry, Physiology and Molecular Biology" (H. G. Pontis, G. L. Salerno and E. J. Echeverria, eds.), Proceedings of the International Symposium on Sucrose Metabolism, pp. 179-189. American Society of Plant Physiologists, Argentina.
- Wilkinson, S., and Davies, W. J. (2010). Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell and Environment* **33**, 510-525.
- Willenbrink, J., Bonnett, G. D., Willenbrink, S., and Wardlaw, I. F. (1998). Changes of enzyme activities associated with the mobilization of carbohydrate reserves (fructans) from the stem of wheat during kernel filling. *New Phytologist* **139**, 471-478.
- Wingler, A., Fritzius, T., Wiemken, A., Boller, T., and Aeschbacher, R. A. (2000). Trehalose induces the ADP-Glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* **124**, 105-114.
- Winter, H., and Huber, S. C. (2000). Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Plant Sciences* **19**, 31-67.
- Xie, W., and Nevo, E. (2008). Wild emmer: genetic resources, gene mapping and potential for wheat improvement. *Euphytica* **164**, 603-614.
- Xiong, L., Wang, R.-G., Mao, G., and Koczan, J. M. (2006). Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiology* **142**, 1065-1074.
- Xu, Z., Zhou, G., and Shimizu, H. (2009). Are plant growth and photosynthesis limited by pre-drought following rewatering in grass?. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3737-3749.
- Xue, G.-P., Kooiker, M., Drenth, J., and McIntyre, C. L. (2011). TaMYB13 is a transcriptional activator of fructosyltransferase genes involved in β -2,6-linked fructan synthesis in wheat. *The Plant Journal* **68**, 857-870.
- Xue, G.-P., McIntyre, C. L., Glassop, D., and Shorter, R. (2008a). Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. *Plant Molecular Biology* **67**, 197-214.
- Xue, G., McIntyre, C. L., Jenkins, C. L. D., Glassop, D., Van Herwaarden, A. F., and Shorter, R. (2008b). Molecular dissection of variation in carbohydrate metabolism related to water-soluble carbohydrate accumulation in stems of wheat. *Plant Physiology* **146**, 441-454.
- Xue, G., McIntyre, C. L., Rattey, A. R., Van Herwaarden, A. F., and Shorter, R. (2009). Use of dry matter content as a rapid and low-cost estimate for ranking genotypic differences in water-soluble carbohydrate concentrations in the stem and leaf sheath of *Triticum aestivum*. *Crop and Pasture Science* **60**, 51-59.
- Yang, J., Peng, S., Visperas, R., Sanico, A., Zhu, Q., and Gu, S. (2000). Grain filling pattern and cytokinin content in the grains and roots of rice plants. *Plant Growth Regulation* **30**, 261-270.
- Yang, J., and Zhang, J. (2006). Grain filling of cereals under soil drying. *New Phytologist* **169**, 223-236.
- Yang, J., Zhang, J., Wang, Z., Zhu, Q., and Liu, L. (2004). Activities of fructan- and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta* **220**, 331-343.
- Yoshida, M., Kawakami, A., Ende, W., Norio, S., Noureddine, B., and Shuichi, O. (2007). Graminan metabolism in cereals: wheat as a model system. *Recent Advances in Fructooligosaccharides Research*, 201-212.
- Yu, X., Bai, G., Liu, S., Luo, N., Wang, Y., Richmond, D. S., Pijut, P. M., Jackson, S. A., Yu, J., and Jiang, Y. (2013). Association of candidate genes with drought tolerance traits in diverse perennial ryegrass accessions. *Journal of Experimental Botany* **64** (6), 1537-1551.
- Yunusa, I. A. M., and Sedgley, R. H. (1992). Reduced tillering spring wheats for heavy textured soils in a semi-arid mediterranean environment. *Journal of Agronomy and Crop Science* **168**, 159-168.
- Zadoks, J. C., Chang, T. T., and Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* **14**, 415-421.

- Zeeman, S. C., Delatte, T., Messerli, G., Umhang, M., Stettler, M., Mettler, T., Streb, S., Reinhold, H., and Kötting, O. (2007). Starch breakdown: recent discoveries suggest distinct pathways and novel mechanisms. *Functional Plant Biology* **34**, 465-473.
- Zhang, G., and Li, C. (2010). "Genetics and Improvement of Barley Malt Quality," 310 p. Springer Berlin Heidelberg, Zhejiang University Press, Hangzhou.
- Zhang, G., Venkatachalam, M., and Hamaker, B. R. (2006). Structural basis for the slow digestion property of native cereal starches. *Biomacromolecules* **7**, 3259-3266.
- Zhang, H., Turner, N. C., and Poole, M. L. (2010). Source-sink balance and manipulating sink-source relations of wheat indicate that the yield potential of wheat is sink-limited in high-rainfall zones. *Crop and Pasture Science* **61**, 852-861.
- Zhang, J., Dell, B., Conocono, E., Waters, I., Setter, T., and Appels, R. (2009). Water deficits in wheat: fructan exohydrolase (1-FEH) mRNA expression and relationship to soluble carbohydrate concentrations in two varieties. *New Phytologist* **181**, 843-850.
- Zhang, J., Nguyen, H. T., and Blum, A. (1999). Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of Experimental Botany* **50**, 291-302.
- Zhu, Q., Sarkis, J., and Geng, Y. (2005). Green supply chain management in China: pressures, practices and performance. *International Journal of Operations and Production Management* **25**, 449-468.
- Zhu, Q., Zhang, Z., Yang, J., and Wang, Z. (1997). Source-sink characteristics related to the yield of inter-subspecific hybrid rice. *Scientia Agricultura Sinica* **30**, 52-59.
- Zhu, X.-G., Long, S. P., and Ort, D. R. (2008). What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass?. *Current Opinion in Biotechnology* **19**, 153-159.
- Zohary, D., and Hopf, M. (2000). "Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe and the Nile Valley", 3rd Edition, 316 p. Oxford University Press
- Zohary, D., Hopf, M., and Weiss, E. (2012). "Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of Domesticated Plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin", 4th Edition, 243 p. Oxford University Press, Oxford.
- Zuther, E., Hoermiller, I. I., and Heyer, A. G. (2011). Evidence against sink limitation by the sucrose-to-starch route in potato plants expressing fructosyltransferases. *Physiologia Plantarum* **143**, 115-125.