

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**EFFECTOS DEL DÉFICIT HÍDRICO EN  
CINCO CULTIVARES DE TRIGO**

**por**

**Oswaldo PÉREZ GONZÁLEZ**

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

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
noviembre 2015

## **PÁGINA DE APROBACIÓN**

Tesis aprobada por el tribunal integrado por el Dr. Omar Borsani, Dr. Andrés Berger y Dr. Daniel Miralles el 1° de octubre de 2015. Autor: Osvaldo Pérez González.  
Directora Dra. Marina Castro y Co-director Ing. Agr. Luis Viega.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Facultad de Agronomía por impulsar la formación de posgrado y especialmente al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), que en convenio de capacitación con la Facultad, hizo posible que por medio de una beca realizara los estudios de magister.

Por su colaboración, mis agradecimientos se extienden a mis tutores Marina Castro y Luis Viega, a los docentes Lucía Gutiérrez y Esteban Hoffman, a Jarislav von Zitzewitz, y a Daniel Vázquez, Marcelo Maidana y Mario Lema de INIA La Estanzuela.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
<b>PÁGINA DE APROBACIÓN</b> .....	II
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	III
<b>RESUMEN</b> .....	VI
<b>SUMMARY</b> .....	VII
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	1
<b>1.1. MARCO CONCEPTUAL</b> .....	1
<b>1.2. HIPÓTESIS</b> .....	4
<b>1.3. OBJETIVOS</b> .....	4
<b>1.3.1. <u>Objetivo general</u></b> .....	4
<b>1.3.2. <u>Objetivos específicos</u></b> .....	4
<b>1.4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
<b>1.4.1. <u>Sequía y estrés por déficit hídrico</u></b> .....	5
<b>1.4.2. <u>Caracterización del déficit hídrico en trigo</u></b> .....	6
<b>1.4.3. <u>Mecanismos de resistencia a estrés por déficit hídrico</u></b> .....	8
<b>1.4.4. <u>Cuantificación del estrés hídrico</u></b> .....	9
<b>1.4.4.1. Déficit de presión de vapor (DPV)</b> .....	9
<b>1.4.4.2. Potencial hídrico (<math>\Psi_w</math>)</b> .....	10
<b>1.4.4.3. Contenido relativo de agua (CRA)</b> .....	11
<b>1.4.5. <u>Ajuste osmótico (AO)</u></b> .....	12
<b>1.4.6. <u>Conductancia estomática (<math>g_s</math>)</u></b> .....	14
<b>1.4.7. <u>Efectos generales del estrés por déficit hídrico</u></b> .....	18
<b>1.4.8. <u>Efectos del estrés por déficit hídrico pos antesis en trigo</u></b> .....	19
<b>1.4.8.1. Efectos en la planta</b> .....	19
<b>1.4.8.2. Efectos en el peso y tamaño de grano</b> .....	20

	Página
1.4.8.3. Efectos en la calidad industrial del grano.....	22
1.4.9. <u>Caracteres morfo-fisiológicos y marcadores bioquímicos y moleculares de resistencia a estrés por déficit hídrico</u> .....	25
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	27
2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
2.2. MATERIAL VEGETAL.....	28
2.3. CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	28
2.4. TRATAMIENTOS DE AGUA DE RIEGO.....	30
2.5. DETERMINACIONES.....	31
2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
3. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....	35
4. <u>CONCLUSIONES</u> .....	67
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	68
6. <u>ANEXO</u> .....	84
A Mild Water Deficit after Anthesis Differently Affects the Response of Wheat Cultivars in their Relative Water Content, Stomatal Conductance, and Kernel Weight.....	85

## RESUMEN

El aumento de la temperatura atmosférica y la alteración del ciclo hidrológico son la principal amenaza del cambio climático al cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.). Además, cuando en Sudamérica ocurre el evento *La Niña*, el riesgo de estrés por sequía aumenta en una mayor área del cultivo de trigo durante el llenado de grano. El objetivo fue estudiar la respuesta de cinco cultivares de trigo bajo el efecto de dos niveles de agua de riego (Control y Estrés), desde la antesis a la madurez fisiológica. El experimento se realizó en invernáculo utilizando los cultivares de trigo pan de tipo primaveral Baguette Premium 11, Biointa 1001, LE 2249, LE 2331 y LE 2333; todos ellos cultivados en Argentina y Uruguay. Mediciones repetidas en el tiempo de contenido relativo de agua (CRA) y de conductancia estomática ( $g_s$ ) se realizaron durante el período de estrés. Mientras que rendimiento de grano y sus componentes, peso y largo de raíces, eficiencia de uso de agua de riego, porcentaje de proteína en el grano, y dos caracteres reológicos (altura de mixograma y tiempo de mezclado) se determinaron a la cosecha. El cultivar LE 2333 no fue afectado por el déficit hídrico. Mientras, Baguette Premium 11 y LE 2249 fueron poco afectados en rendimiento de grano. En cambio, LE 2331 y Biointa 1001 fueron los cultivares más afectados al disminuir el rendimiento de grano 21,0 % ( $P=0,0206$ ) y 21,2 % ( $P=0,0284$ ), respectivamente. Solo los cultivares LE 2249 y LE 2331 disminuyeron su peso de grano ( $P=0,0361$  y  $P=0,0001$ , respectivamente), y solo LE 2331 también disminuyó su índice de cosecha ( $P=0,0039$ ). Sin embargo, un umbral temprano de estrés en el cultivar Biointa 1001 causó que el CRA y peso de grano no se afectaran. Mientras, un umbral tardío de estrés en LE 2331 causó que ambos caracteres se afectaran, como también se afectó la  $g_s$ . Cultivares con el último tipo de respuesta, serían más apropiados para regiones con suelos profundos y o con alta probabilidad de lluvias después de la antesis.

**Palabras clave:** *T. aestivum*, sequía, estrés hídrico, estrés abiótico, relaciones hídricas

## WATER DEFICIT EFFECTS IN FIVE WHEAT CULTIVARS

### SUMMARY

The increase in atmospheric temperature and alteration of the hydrological cycle are the main threats of climate change to wheat crop (*Triticum aestivum* L.). Furthermore, when in South America *La Niña* event occurs, the risk of drought stress increases in a greater wheat crop area during grain filling. The aim was to study the response of five wheat cultivars under the effect of two levels of irrigation (Control and Stress), from anthesis to physiological maturity. The experiment was conducted in a greenhouse using the spring bread wheat cultivars Baguette Premium 11, Biointa 1001, LE 2249, LE 2331 and LE 2333; all of them grown in Argentina and Uruguay. Repeated measurements in time of relative water content (RWC), and of stomatal conductance ( $g_s$ ) were carried out during the stress period. While, grain yield and its components, weight and length of roots, irrigation water use efficiency, percentage of grain protein, and two rheological traits (mixogram height and mixing time) were determined, at harvest. The cultivar LE 2333 was not affected by the water deficit. Meanwhile, Baguette Premium 11 and LE 2249 were little affected in grain yield. Instead, LE 2331 and Biointa 1001 were the most affected cultivars by decreasing the grain yield 21.0 % ( $P=0.0206$ ) and 21.2 % ( $P=0.0284$ ), respectively. Only the cultivars LE 2249 and LE 2331 decreased their kernel weight ( $P=0.0361$  and  $P=0.0001$ , respectively), and only LE 2331 also decreased its harvest index ( $P=0.0039$ ). However, an early stress threshold in Biointa 1001 caused that kernel weight and RWC were not affected. Whilst, a belated stress threshold in LE 2331 caused that both traits were affected, as was also the  $g_s$ . Cultivars with the latter type of response would be more suitable for regions with deep soils and/or with high probability of rain after anthesis.

**Keywords:** *T. aestivum*, drought stress, water stress, abiotic stress, water relations

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. MARCO CONCEPTUAL

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es el cultivo que ocupa la mayor área de siembra del mundo y es el que produce más toneladas de grano luego del maíz y el arroz (FAOSTAT, 2013). Como cultivo primordial en la provisión de calorías para el consumo humano, es importante la tasa a la que crece su rendimiento potencial en las distintas regiones del mundo. En los últimos años, se ha observado que la tasa de crecimiento relativa del rendimiento potencial de trigo es de 0,9 % por año, mientras que la del maíz es de 1,6 % (Fischer y Edmeades, 2010). Si bien la brecha entre el rendimiento potencial y comercial de trigo aún es significativa, una tasa de crecimiento de 0,9 % es insuficiente para alimentar a una población mundial que crece a un ritmo de 1,1 % anual. La población mundial se incrementará en casi 70 millones de habitantes por año en los próximos diez años, estimándose que para el año 2050 la población ascenderá a más de 9,4 billones de personas (U.S. Census Bureau, 2015).

La mayor demanda de alimentos no solamente se debe al crecimiento de la población per se, se debe también al creciente consumo de calorías por habitante, especialmente de aquellos países altamente poblados con economías emergentes, como son el caso de China, Federación de Rusia y Brasil (El Banco Mundial 2015, U.S. Census Bureau 2015, FAOSTAT 2011). Aproximadamente el 50 % del consumo mundial de trigo es realizado por China, India, Estados Unidos de América, Pakistán y Federación de Rusia (FAOSTAT, 2011).

Otro factor que amenaza la seguridad de alimentos es la dinámica del clima, más comúnmente denominada por el término “cambio climático”. La causa del cambio climático ha sido adjudicada mayormente al “calentamiento global” (IPCC, 2001). Este último término hace referencia al efecto que provocan las emisiones antropógenas de gases de efecto invernadero (GEI). El vapor de agua, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano, óxido nitroso, ozono, y los clorofluorocarbonos (estos últimos de origen únicamente industrial), son GEI cuya concentración en la atmósfera es modificada por la actividad del hombre. Debido a la quema de combustibles fósiles y el



cambio en el uso del suelo (especialmente la deforestación), el CO<sub>2</sub> aumentó su concentración en la atmósfera un 35 % en los últimos 250 años (Forster *et al.*, 2007). Los GEI por naturaleza absorben en el espectro del infrarrojo parte de la porción de la radiación solar que es irradiada por la superficie terrestre. La energía absorbida genera calor, por lo que mayores emisiones antropógenas explicarían en gran medida el aumento de la temperatura de la Tierra y por ende el cambio climático. El término “cambio climático” se distingue del término “calentamiento global” en que el primero es de significado más amplio que el solo cambio de la temperatura, y en que el último es de origen antropógeno mientras que el primero puede o no serlo.

Actualmente la comunidad científica no tiene un completo consenso sobre la relación causa efecto entre el desarrollo económico industrial de una población creciente y el cambio climático. No obstante, sí hay un consenso generalizado en que el clima está cambiando con celeridad a escala de la civilización humana, por lo que ese cambio representa una amenaza a la seguridad alimentaria.

La temperatura es el parámetro que con mayor certidumbre ha sido modificado por el cambio climático. Se ha registrado que la temperatura de la superficie de la Tierra se incrementó  $0,74 \pm 0,18$  °C entre el año 1906 y 2005. Para similar período (1900-2005), menor certidumbre ha habido respecto a tendencias de la precipitación. En el hemisferio Norte por encima de la latitud 30° la precipitación se incrementó, a la vez que han sido más húmedos el Este de Norteamérica y Sudamérica, y el Noreste de Europa y Asia Central (Trenberth *et al.*, 2007). La mayor humedad de la atmósfera se atribuye a que una mayor temperatura de la superficie terrestre ha aumentado la presión de vapor de agua de la atmósfera, de acuerdo con la ecuación de Clausius–Clapeyron (Held y Soden 2006, Trenberth *et al.* 2003). A pesar de que en varias regiones aumentó la precipitación y la humedad de la atmósfera, sobre todo desde la década de 1970, las regiones de Sahel, Sudeste de África y Mediterráneo han sido más secas, así como la precipitación ha tendido a disminuir en los trópicos entre las latitudes 10° Norte y 10° Sur. (Trenberth *et al.*, 2007).

Un efecto importante del cambio climático es la alteración del ciclo hidrológico, especialmente de las características de la precipitación y de los eventos extremos, en lo que se refiere a la cantidad, frecuencia, intensidad, duración y tipo en que

sucedan (Trenberth *et al.*, 2003). La tendencia ha sido que las regiones húmedas se vuelven más húmedas y que las regiones secas se vuelven más secas, donde con mayor frecuencia e intensidad se alternan períodos de inundaciones y sequías, lo que a su vez se relaciona con el incremento y varianza temporal del patrón de evaporación menos precipitación (Held y Soden, 2006). A su vez, estas tendencias climáticas y eventos meteorológicos alteran la ocurrencia y distribución geográfica de enfermedades y plagas.

Relacionado al aumento de la temperatura global y a la alteración del ciclo hidrológico, la sequía es la principal amenaza del cambio climático al cultivo de trigo a nivel mundial. Desde la década de 1970, especialmente en los trópicos y subtropicales, los períodos de sequía han sido más frecuentes, intensos y de mayor extensión geográfica (Trenberth *et al.*, 2007). Según el índice de severidad de sequía de Palmer (*PDSI*), menor precipitación y mayor temperatura aumentan la evapotranspiración (*ET*) y contribuyen a que en más regiones ocurran períodos de sequía (Palmer, 1965). Tanto los registros como las proyecciones de los modelos climáticos indican que la tendencia es que con el aumento de la temperatura, aumentan las precipitaciones y su intensidad, aunque una gran proporción de las regiones subtropicales será afectada por condiciones de sequía (Meehl *et al.* 2007, Trenberth *et al.* 2003, Hennessy *et al.* 1997).

Finalmente, una insuficiente tasa de crecimiento relativa (0,9) del rendimiento potencial de trigo, en relación con una creciente demanda mundial de alimentos, determina que el aumento de la producción se deberá obtener en gran parte por un aumento del área de siembra hacia zonas con restricciones para su cultivo. Bajo los efectos del cambio climático, la extensión del cultivo de trigo hacia zonas marginales, conlleva a que en varias de las regiones del mundo aumente el riesgo de sequía y de que el cultivo de trigo sufra de estrés por déficit hídrico en alguna etapa de su desarrollo.

Para mitigar las pérdidas de rendimiento y calidad del cultivo de trigo ante el estrés por déficit hídrico, una de las alternativas disponibles son la identificación, selección y mejoramiento genético de germoplasma con resistencia a sequía. Para ello es necesario conocer los efectos que el déficit hídrico provoca en los caracteres

morfológicos, fisiológicos y reológicos del cultivo de trigo. A su vez, ese conocimiento colabora en la comprensión de cómo operan las bases genéticas y moleculares en los mecanismos de la resistencia y adaptación al estrés.

## **1.2. HIPÓTESIS**

Las hipótesis de trabajo fueron: 1) el estrés por déficit hídrico afecta el rendimiento y la aptitud industrial del grano de trigo de manera diferencial según el genotipo cultivado; y 2) pueden identificarse caracteres que expliquen mejor los efectos del déficit hídrico en el rendimiento y en la aptitud industrial.

## **1.3. OBJETIVOS**

### **1.3.1. Objetivo general**

El objetivo general fue caracterizar la respuesta de cinco cultivares de trigo a un estrés por déficit hídrico en condiciones de invernáculo desde anthesis a madurez fisiológica.

### **1.3.2. Objetivos específicos**

1. Caracterizar la respuesta de los cultivares a un déficit hídrico pos anthesis en el crecimiento radicular y en el rendimiento, peso y aptitud industrial del grano.
2. Caracterizar la respuesta fisiológica de los cultivares a un déficit hídrico pos anthesis a través de la eficiencia de uso del agua (EUA) de riego y los parámetros contenido relativo de agua y conductancia estomática.

## 1.4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.4.1. Sequía y estrés por déficit hídrico

La sequía es la ausencia prolongada o insuficiencia acentuada de precipitación, o bien una insuficiencia que origina escasez de agua para alguna actividad o grupo de personas, o también un período de condiciones meteorológicas anormalmente secas suficientemente prolongado para que la ausencia de precipitación ocasione un importante desequilibrio hidrológico (Heim, 2002). La sequía se ha definido de distintas maneras. La *sequía agrícola* denota un déficit de humedad en el metro más externo de espesor del suelo (la zona radicular), que afecta los cultivos; la *sequía meteorológica* se identifica principalmente mediante un déficit prolongado de precipitación; y la *sequía hidrológica* se caracteriza por un caudal fluvial o por un nivel lacustre y freático inferior a los valores normales (IPCC, 2007). Las *mega sequías* son sequías prolongadas y extensas que duran mucho más de lo normal, generalmente un decenio como mínimo (IPCC, 2007).

En cuanto a estrés por déficit hídrico se entiende cuando un país constriñe su desarrollo porque la cantidad de agua dulce de que dispone es insuficiente en proporción al agua que detrae (IPCC, 2007). En las evaluaciones a escala mundial, se dice frecuentemente que una cuenca padece estrés hídrico cuando su disponibilidad de agua por habitante es inferior a 1.000 m<sup>3</sup> por año (sobre la base del promedio de la escorrentía por largos períodos). Un indicador de estrés hídrico utilizado también en ocasiones es un volumen de detracción de agua superior al 20 % del agua renovable disponible. Un cultivo experimenta estrés por déficit hídrico cuando la cantidad de agua disponible en el suelo, y por ende la *ET* real, son menores que la demanda de *ET* potencial ( $ET_c$ ) (IPCC, 2007).

De las definiciones anteriores puede decirse que cuando un cultivo en condiciones de sequía agrícola experimenta estrés por déficit hídrico, su *ET* disminuye respecto a su  $ET_c$ . Realizando el cociente entre la  $ET_c$  de un cultivo y la *ET* de referencia ( $ET_0$ ) se determina el coeficiente para ese cultivo ( $K_c$ ). La  $ET_0$  es un parámetro climático de una pastura hipotética que independientemente de las características del

suelo y de las condiciones de cultivo, se determina por la temperatura del aire, la radiación neta en la superficie, la velocidad del viento, y la humedad relativa (Allen *et al.*, 1994). A su vez, el cociente entre la  $ET$  real de un cultivo y su  $ET_c$  determina el coeficiente de estrés hídrico de ese cultivo ( $K_s$ ). De modo que cuanto mayor es el estrés por déficit hídrico de un cultivo, menor es su coeficiente  $K_s$ . Para cualquier cultivo el coeficiente  $K_s$  siempre será menor ó igual a uno.

Como señala el índice  $PDSI$  de Palmer (1965), menor precipitación y mayor temperatura aumentan la  $ET$ . Sin embargo, cuando la humedad del suelo disminuye por debajo de la capacidad de las raíces de extraer agua, la  $ET$  se restringe. Esa restricción es la diferencia entre la  $ET$  y la  $ET_c$  de un cultivo.

Hasta el comienzo de la década de 1980, la precipitación fue el parámetro dominante del cambio en el balance de agua terrestre; después, el calentamiento global y los cambios inducidos en la nubosidad, radiación solar neta, velocidad del viento y humedad cobraron mayor importancia (Dai, 2011). De modo que en el contexto del cambio climático cobra importancia el aumento de la demanda de vapor de agua ( $ET$ ). Si el suministro de agua de la atmósfera (*i.e.*, precipitación) sobre una región es igual o menor al incremento de  $ET$ , entonces se incrementarían las condiciones de sequía (Dai, 2011).

#### **1.4.2. Caracterización del déficit hídrico en trigo**

A partir del año 1988 el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), implementó un plan estratégico para clasificar en mega-ambientes las regiones del mundo donde se cultiva trigo (Rajaram, 1995). Un mega-ambiente es un área no necesariamente contigua, pudiendo ser incluso transcontinental, que se define por similitud de estreses bióticos y abióticos, requerimientos del sistema de cultivo, preferencias de los consumidores, y por volumen de producción. En el año 1993 el CIMMYT caracterizó doce mega-ambientes (ME1 a ME12), los que a su vez se agruparon en tres grandes grupos de acuerdo a los rasgos genéticos de la especie: en trigos primaverales (ME1-ME6), trigos facultativos (ME7-ME9), y trigos invernales (ME10-12). Los trigos invernales evolucionaron para soportar bajas temperaturas

invernales y requieren de horas de frío para florecer (*i.e.*, vernalización); se siembran y crecen en otoño, y desde antes del invierno permanecen inactivos hasta que reanudan un rápido crecimiento en la primavera. Los trigos facultativos no son tan tolerantes al frío como los invernales, y se caracterizan por no requerir una exposición prolongada a temperaturas frías para inducir la floración. Finalmente, los trigos primaverales tienen un ciclo continuo de crecimiento y no requieren de horas de frío para florecer.

Basado en esta clasificación de mega-ambientes, tres son los patrones de déficit hídrico identificados en la producción del cultivo de trigo en condiciones de secano (Rajaram *et al.*, 1996): 1) cuando el cultivo utiliza la reserva de agua dejada por las lluvias de los monzones en el verano anterior, ello ocurre en parte de Australia e India subcontinental (ME4C); 2) déficit temprano previo a la antesis, en parte del cono sur de Sudamérica (ME4B); y 3) déficit tardío pos antesis, que comúnmente ocurre en las regiones del Mediterráneo (ME4A); Diyarbakir, Turquía; y Texas, EE.UU (ME9); y Colorado y Kansas, EE.UU (ME12).

Los patrones de déficit hídrico que fueron identificados en esos mega-ambientes fueron caracterizados según condiciones climáticas normalizadas de una serie de años. Cuando se generan condiciones de sequía, otros mega-ambientes pueden ajustarse a los patrones de déficit hídrico definidos anteriormente. Por ejemplo esto sucede con la manifestación cíclica del fenómeno climático denominado El Niño-Oscilación del Sur (ENOS). ENOS es un sistema de interacciones entre el Océano Pacífico ecuatorial y la atmósfera, por el que se superponen corrientes de agua cálida y fría que alteran la temperatura de la superficie oceánica (IRI 2015, Glantz, citado por Trenberth 1997). ENOS tiene tres fases, de acuerdo a los índices *NIÑO 3 Index* y *NIÑO 3.4 Index*. Una es la fase cálida denominada “El Niño”, cuando la media móvil de la temperatura de cinco meses del océano Pacífico ecuatorial se desvía durante seis meses consecutivos  $+0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*NIÑO 3*  $90^{\circ}\text{O}$ – $150^{\circ}\text{O}$  y  $5^{\circ}\text{S}$ – $5^{\circ}\text{N}$ ) o  $+0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*NIÑO 3.4*  $120^{\circ}\text{O}$ – $170^{\circ}\text{O}$  y  $5^{\circ}\text{S}$ – $5^{\circ}\text{N}$ ), otra es la fase fría denominada “La Niña”, cuando la temperatura se desvía  $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  o  $-0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*NIÑO 3* y *NIÑO 3.4*), y una tercera e intermedia es la denominada fase neutral (IRI 2015, Trenberth 1997). Según la región del mundo, La Niña o El Niño pueden provocar inundaciones o condiciones de sequía

entre otros eventos extremos. Por ejemplo, al sur de Paraguay, noreste de Argentina, sureste de Brasil y Uruguay, La Niña ha provocado precipitaciones por debajo de lo normal particularmente de octubre a diciembre (Grimm *et al.* 2000, Pisciottano *et al.* 1994). Luego del ciclo estacional, el fenómeno ENOS es la principal causa de la variabilidad del clima en el mundo (Trenberth *et al.*, 2002).

Normalmente, el estrés por déficit hídrico en trigo ocurre en varios de los mega-ambientes de cultivo y cíclicamente, aunque de manera errática, cuando el fenómeno ENOS se manifiesta aumentando la extensión e intensidad de las condiciones de sequía. Con mayor frecuencia el estrés por déficit hídrico en trigo también está ocurriendo por los efectos del cambio climático, y por la extensión de su cultivo hacia áreas marginales en consecuencia con la creciente demanda mundial de alimentos.

#### **1.4.3. Mecanismos de resistencia a estrés por déficit hídrico**

En un sentido biológico estrés es un factor externo que actúa o ejerce un efecto sobre un organismo, mientras que tensión o deformación es el cambio físico o químico que se produce cuando un organismo es afectado por un determinado estrés (Levitt, 1980). Cuando el efecto de un estrés es reversible se dice que la tensión en el organismo es elástica, y cuando ese efecto es irreversible, la tensión en el organismo es plástica provocándosele un daño físico o cambio químico. No obstante la tensión plástica es irreversible, el daño o cambio puede ser reparado a expensas de un costo de energía metabólica. Cuando sucede un punto de ruptura de la tensión plástica la planta muere. Las resistencias a la tensión elástica y a la tensión plástica son lo que se define como resistencia al estrés (Levitt, 1980).

Blum (2005) en acuerdo con Levitt (1980) clasifican en dos los mecanismos de la resistencia al estrés, incluido el estrés por déficit hídrico: 1) cuando las plantas evitan el estrés, y 2) cuando las plantas toleran el estrés. Las plantas evitan el estrés cuando previenen o reducen la penetración del estrés dentro de los tejidos. Evitan un equilibrio termodinámico con el estrés, por ejemplo estableciendo barreras físicas metabólicas o químicas que excluyen al estrés de las células (*i.e.*, estado estacionario

o *steady state* en inglés, un concepto distinto de equilibrio termodinámico). Cuando las plantas evitan el estrés, también evitan la tensión. Por otro lado, cuando las plantas toleran el estrés, es cuando son capaces de sobrellevar el estrés reduciendo o eliminando la tensión. Las plantas tolerantes al estrés tienen la habilidad de establecer un equilibrio termodinámico con el estrés sin sufrir daño, o tienen la habilidad de repararlo en caso de sufrirlo.

La evasión o escape al estrés no es un mecanismo o tipo de resistencia (Levitt, 1980). El escape es una adaptación de las plantas a estreses estacionales. Mientras las plantas que evitan el estrés previenen o reducen su ingreso, las plantas que escapan al estrés completan su ciclo o etapa fenológica susceptible antes o después de que el estrés suceda.

En las especies de plantas superiores como el trigo, el mecanismo principal de resistencia al déficit hídrico es el de evitar el estrés. Esto es porque las plantas mantienen una humedad relativa cercana al 100 % en un ambiente donde la humedad relativa del aire es generalmente muy inferior (Levitt, 1980).

#### **1.4.4. Cuantificación del estrés hídrico**

##### **1.4.4.1. Déficit de presión de vapor (DPV)**

El déficit de presión de vapor (DPV) indica el déficit de saturación de agua de la atmósfera ( $S_d$ ):

$$S_d = \rho_0 - \rho$$

donde  $\rho_0$  es la presión de vapor del agua pura a la temperatura del aire, y  $\rho$  es la presión de vapor del aire (Levitt, 1980). Según el objetivo y la precisión deseada para  $\rho_0$  también puede considerarse la temperatura de la hoja o del dosel en vez de la del aire.

En la medida que el DPV indica el déficit de saturación de agua de la atmósfera, cuanto mayor es su incremento entonces también es mayor la tasa de transpira-



ción ( $T$ ) de las plantas. A su vez, en la medida que el suelo no puede cubrir la demanda de agua de las plantas, entonces menor es el potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) de esas plantas; por lo que valores inferiores de DPV pueden indicar indirectamente déficit hídrico.

En condiciones de déficit hídrico y de alto DPV las plantas regulan su tasa de  $T$  cerrando parcialmente sus estomas (Monteith, 1995). A la concentración normal de  $\text{CO}_2$  del aire, el DPV aumenta la tasa de  $T$  e indirectamente reduce la conductancia estomática ( $g_s$ ). Sin embargo, en experimentos a bajas concentraciones de  $\text{CO}_2$  (0 a  $50 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ), en *Glycine max*, *Chenopodium album* y *Abutilon theophrasti*, no se observó efecto del DPV sobre la  $g_s$  (Bunce, 1997).

En general las plantas crecen bien en el rango de 0,80 a 0,95 kPa de DPV (López-Morales *et al.*, 2008). En invernáculo, por encima de 1,25 kPa la temperatura es muy alta y o la humedad relativa es muy baja, y por debajo de 0,45 kPa la temperatura es muy baja y o la humedad es muy alta. De este modo, en la medida que el DPV disminuye (*i.e.*, menor demanda atmosférica de agua), la tasa de  $T$  se reduce aun cuando las plantas mantienen sus estomas abiertos.

#### 1.4.4.2. Potencial hídrico ( $\Psi_w$ )

El estado hídrico de las plantas y la disponibilidad de agua del suelo pueden ser estimados por el  $\Psi_w$ . En condiciones normales de crecimiento, el  $\Psi_w$  en hojas maduras de trigo y cebada oscila entre  $-0,35 \text{ MPa}$  y  $-0,45 \text{ MPa}$ , respectivamente (Boyer *et al.*, 2008).

Cuando el  $\Psi_w$  se mide en las células de las plantas este se compone por:

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g$$

donde  $\Psi_s$ ,  $\Psi_p$  y  $\Psi_g$  son los potenciales de soluto, de presión y gravitacional respectivamente (Taiz y Zeiger, 2002). El  $\Psi_s$  siempre es negativo y señala el efecto de los solutos disueltos en la reducción del  $\Psi_w$  respecto al agua pura de referencia. El  $\Psi_p$  puede ser positivo o negativo, generalmente es positivo dentro de las células (poten-

cial de turgencia), y negativo en los espacios intercelulares y el xilema. Los gradientes de presiones son responsables del movimiento del agua desde las células al xilema. Finalmente, el  $\Psi_g$  es función de la altura a la que se transporta el agua. Generalmente, a nivel celular el  $\Psi_g$  se desprecia por su magnitud comparada a  $\Psi_s$  y  $\Psi_p$  (Taiz y Zeiger, 2002).

Algunos autores también consideran el potencial de matriz ( $\Psi_m$ ) como un componente del  $\Psi_w$  en las plantas. Sin embargo, el  $\Psi_m$  solo influye en el  $\Psi_w$  cuando éste se aproxima a  $-14$  MPa, potencial al que la mayor parte de las plantas ya han muerto (Tyree, 2003). Si bien el  $\Psi_m$  usualmente es ignorado por los fisiólogos de plantas, cobra importancia cuando el  $\Psi_w$  es medido en el suelo. El  $\Psi_m$  en el suelo se representa por las fuerzas de adsorción y capilaridad, fuerzas que generan la suspensión coloide entre las fases suelo y agua (Tyree, 2003). Salvo en suelos salinos donde el  $\Psi_s$  puede ser relevante, en la medida que el suelo contiene menos agua, el  $\Psi_m$  es aproximadamente igual al  $\Psi_w$  (Tyree, 2003).

#### **1.4.4.3. Contenido relativo de agua (CRA)**

El contenido relativo de agua (CRA) tiene su origen en el concepto “turgencia relativa” desarrollado por Weatherley (1950). La técnica y cálculo del CRA en hojas de plantas de algodón que desarrolló Weatherley, es un indicador que sirve como guía para conocer el balance entre la  $T$  y la absorción de agua que una planta realiza a un tiempo dado (*i.e.*, estatus de agua). Posteriormente, la técnica original para determinar el CRA fue cuestionada por varios autores. En consecuencia Barrs y Weatherley (1962) revisaron la técnica y la redefinieron para calcular el CRA como:

$$\text{CRA} = [(Peso Fresco - Peso Seco) / (Peso Turgente - Peso Seco)] \times 100$$

donde porcentualmente el CRA relaciona el status de agua que tiene la hoja de una planta a un tiempo dado respecto a la cantidad de agua que esa misma hoja podría llegar a contener. En hojas bandera de trigo sin historia de estrés hídrico, el CRA osciló entre 94,5 y 97,5 % (Izanloo *et al.*, 2008). Lo anterior fue coincidente con lo

observado por Boyer *et al.* (2008) y con la observación de Morgan (1995), de que en plantas bien regadas el CRA nunca alcanza el 100 %. Cuando esas hojas se someten a un estrés hídrico, el CRA puede reducirse hasta un 40 % (Morgan, citado por Boyer *et al.*, 2008).

Mientras un cambio en el CRA puede ser debido a un cambio en el contenido de agua de un tejido, éste también puede ir acompañado de ajuste osmótico (AO). Esto último, implica que como respuesta a un déficit hídrico, las plantas mantienen su turgencia por un incremento neto de los solutos en las células de las hojas. De modo que, ante un estrés hídrico o salino, las plantas con mayor capacidad de realizar AO, son capaces de disminuir en mayor grado su  $\Psi_s$  que su  $\Psi_w$ , lo que se traduce en un mantenimiento o incluso un incremento de su  $\Psi_p$  para lograr un contenido de agua similar al de plantas no estresadas (Boyer *et al.*, 2008).

En la medida que las plantas tienen mayor capacidad de efectuar AO, mayor es la subestimación del status de agua de una planta cuando se mide el CRA. Esto es debido a que cuando las hojas se hidratan a turgencia completa (*Peso Turgente*), ingresa más agua que la que presentan hojas a turgencia completa que no realizaron AO (Boyer *et al.*, 2008). Siendo más específico, la hidratación de las células es excesiva a la vez que ocurre una secreción de agua desde el simplasto hacia el apoplasto (*i.e.*, mayor es el denominador para el cálculo de CRA, *Peso Turgente* – *Peso Seco*). En la práctica, una planta sometida a un estrés por déficit hídrico que presente un bajo CRA, no necesariamente significa que esa planta no se encuentre turgente. De modo que la interpretación del CRA debería acompañarse de la medición y análisis de otros parámetros.

#### **1.4.5. Ajuste osmótico (AO)**

De acuerdo con la clasificación de Levitt (1980), el AO es un mecanismo de resistencia que evita los estreses hídrico y salino. En la medida que las plantas son capaces de realizar AO, a la vez son capaces de mantener su productividad. Por ello es que el AO es uno de los caracteres de plantas cultivadas más ampliamente reconocido en la literatura como componente de la resistencia al estrés por déficit hídrico

(Blum *et al.*, 1999). En trigo y otros cultivos se ha identificado que el AO es un carácter con sustancial diversidad genotípica (Babu *et al.*, 1999 citando a varios autores).

El AO es un carácter complejo de estimar para el que se requiere a su vez determinar el CRA y el  $\Psi_s$  de hojas a distintos  $\Psi_w$ . Babu *et al.* (1999) compararon experimentalmente en cultivares de arroz cuatro métodos de estimación del AO. De acuerdo a esos autores, el método de Morgan (1992) si bien es complejo por la demanda de tiempo y material vegetal, tiene la ventaja de tener una alta correlación con los resultados de los demás métodos, a su vez que también correlaciona altamente con caracteres fenotípicos como muerte foliar (correlación negativa) y con reanimación pos rehidratación foliar (correlación positiva). Para una estimación más rápida y sencilla del AO, Babu *et al.* (1999) recomendaron el método de rehidratación de Jones y Turner (1978), método posteriormente empleado por varios autores. Más recientemente, se utiliza también al aminoácido prolina como un marcador de AO luego de que Ma y Turner (2006) determinaran en colza (*Brassica* sp.) una correlación ( $r$ ) de 0,96 entre ambos caracteres.

Para estimar el AO de diferentes cultivares de trigo, Morgan (1992) midió los  $\Psi_s$  a turgencia completa (CRA= 95 %) y a turgencia cero (CRA= 70 %) en el tejido descongelado de hojas bandera y en la savia luego de prensado el tejido. Los resultados indicaron que según la capacidad de osmoregulación de los cultivares estudiados, el AO tuvo un rango de 0,09 a 0,57 MPa en el tejido descongelado y de 0,18 a 1,35 MPa en la savia.

Una revisión de Turner (1986) y estudios más recientes (*e.g.* Izanloo *et al.*, 2008), indican que a mayor capacidad de AO de las hojas, mayor es el mantenimiento de la  $g_s$  y de la fotosíntesis. El mismo autor también señala que el AO demora el inicio del enrollamiento de las hojas, esto es porque si bien el  $\Psi_w$  de las hojas disminuye, su turgencia se mantiene. Por otro lado, el AO ocurre también en raíces, habiéndose asignado un rol en el mantenimiento de la elongación de ápices radiculares de maíz en condiciones de estrés por déficit hídrico (Sharp *et al.* 2004, Sharp *et al.* 1988). El AO, además del mantenimiento de la turgencia y de las funciones ce-

lulares durante un período de déficit hídrico, podría permitir que las plantas se recuperen más rápido una vez finalizado dicho estrés (Izanloo *et al.*, 2008).

Finalmente respecto al AO y su relación con el CRA, éste último es un indicador menos sensible que el  $\Psi_p$  (*i.e.*,  $\Psi_w - \Psi_s$ ) para detectar diferencias genotípicas en la osmoregulación (Morgan, 1995). No obstante, el AO es un indicador mucho más difícil y costoso de determinar que el CRA.

#### **1.4.6. Conductancia estomática ( $g_s$ )**

La  $g_s$  indica la facilidad con que el flujo de vapor de agua es transpirado por la planta y en sentido contrario indica la facilidad con que el flujo de  $\text{CO}_2$  ingresa desde la atmósfera hacia la cámara sub-estomática. Inversamente, la resistencia estomática ( $r_s$ ) indica la dificultad de difusión de los flujos de vapor de agua y  $\text{CO}_2$ , en uno y otro sentido respectivamente. Normalmente, la  $g_s$  se expresa en  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que la  $r_s$  se expresa en  $\text{m}^2 \text{s mol}^{-1}$ , de agua o  $\text{CO}_2$  respectivamente. La  $g_s$  es función del número, tamaño y grado de apertura de los estomas de las hojas de una planta. Siendo que en condiciones normales los flujos de  $\text{CO}_2$  y de vapor de agua por la cutícula son despreciables (Boyer *et al.* 1997, Dugger 1952), las plantas tienen el permanente compromiso de mantener un balance entre la tasa de  $T$  y la tasa de difusión de  $\text{CO}_2$  (*i.e.*, estomas más o menos cerrados).

Por esta razón, desde mediados de los años setenta los programas de mejoramiento comenzaron a interesarse en incorporar caracteres relacionados con la  $g_s$  para la selección indirecta de variedades de cultivos con mayor resistencia al estrés por déficit hídrico y con mayor potencial de rendimiento (Jones, 1987). Se ha reportado que la  $g_s$  presenta una heredabilidad en el rango de 0,5 a 0,8 con alta correlación genética con rendimiento (Vilhemsén, citado por Reynolds *et al.*, 2001b).

La  $g_s$  es un carácter que está relacionado con cuán capaces son las raíces de extraer agua del perfil del suelo (Reynolds *et al.*, 2001a). La  $g_s$  también está relacionada con resistencia a estrés térmico (Reynolds *et al.*, 1994), como también lo están el contenido de clorofila y el retraso de la senescencia de hojas (*stay-green* en

inglés). Esto es porque en genotipos de alta  $g_s$ , una mayor  $T$  les permite enfriar el dosel y potencialmente asimilar una mayor cantidad de  $\text{CO}_2$ .

La  $g_s$  o su inverso la  $r_s$  pueden estimarse sin dañar la planta con instrumentos portátiles, como son los porómetros y los analizadores de gases por infrarrojo (*IRGA*). Comparando especificaciones entre los manuales de un *IRGA* (e.g. LI-6400XT, LI-COR Biosciences, Inc.) y de un porómetro (e.g. SC-1, Decagon Devices, Inc.), se desprende que el primer instrumento es más preciso que el segundo. No obstante, los porómetros son instrumentos también adecuados para mediciones comparativas y a la vez, son más económicos, fáciles y prácticos de manipular que los *IRGA*.

Los porómetros de difusión de estado estacionario (*steady-state diffusion porometer*), estiman la  $g_s$  en serie. Esto es cuando la hoja de una planta se coloca en una cámara en contacto con dos sensores de conductancia conocida. En ambos sensores se mide la humedad, la distancia entre ambos y la temperatura del aire para calcular el flujo de vapor de agua. Otra clase de porómetros son los de flujo viscoso o flujo de masa. Las prestaciones de ambas clases de porómetros fueron discutidas por Rebetzke *et al.* (2000), quienes señalaron que las mediciones de  $g_s$  con ambos instrumentos presentaron una alta correlación con las mediciones obtenidas con un *IRGA*, esto al estudiar el fenotipo de la progenie F2 de un cruzamiento entre dos cultivares de trigo contrastantes. No obstante, también señalaron que el porómetro de estado estacionario tiene la limitante de ser muy lento para el estudio de grandes poblaciones. La demora de tiempo entre las mediciones de  $g_s$  causa desvíos debidos a la oscilación horaria de la radiación, temperatura del aire, DPV y  $\Psi_w$  de la hoja (Rebetzke *et al.* 2000, Clarke y Clarke 1996, McDermitt 1990, Jones 1977).

El trigo es parte del tercio de especies de plantas anfiestomáticas, es decir que presenta estomas a ambos lados de la hoja (Meidner y Mansfield, citados por Rebetzke *et al.*, 2000). En dos variedades de trigo invernal se observó que la  $g_s$  de las hojas puede presentarse con mayor frecuencia de distribución en un ratio de 1,5 entre los lados adaxial y abaxial (Xing-guo *et al.*, 1996). El ratio dependió del estado de desarrollo, siendo máximo a espigazón (Z 5.0 en la escala de Zadoks *et al.*, 1974), aunque se observó que las  $g_s$  adaxial y abaxial son máximas durante el llenado de

grano. Los autores también observaron que la  $g_s$  decrece exponencialmente desde la parte superior a la parte inferior del dosel, a la vez que los cambios de  $g_s$  durante el día son más drásticos en la parte superior. Finalmente, observaron que la  $g_s$  decrece desde la parte basal adaxial de las hojas hacia la parte apical, e inversamente por el lado abaxial, la  $g_s$  decrece desde la parte apical a la basal. Sobre la base de coeficientes de correlación y medias de las mediciones, los autores sugirieron que la  $g_s$  sea medida en la parte media y apical del lado adaxial, y media y basal del lado abaxial. Resultados de Clarke y Clarke (1996) y de otros trabajos citados por estos autores, señalan también que la  $g_s$  en trigo es mayor en el lado adaxial de las hojas.

De acuerdo con la clasificación de Levitt (1980), así como AO, enrollamiento de hojas, reducción del área foliar y radiación absorbida, el ajuste de la  $g_s$  se corresponde también con el mecanismo de resistencia que evita el estrés por déficit hídrico. Esto ocurre cuando la planta cierra parcialmente sus estomas para reducir la pérdida de agua y mantener su  $\Psi_w$  (Turner, 1986). Sin embargo, especialmente en las especies de metabolismo C3 como el trigo, donde el aparato fotosintético no está saturado de  $\text{CO}_2$ , el cierre de estomas reduce la tasa asimilación de  $\text{CO}_2$  y la fotosíntesis neta. En ese sentido, los valores de  $g_s$  en el rango de 200 a 250  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$  son los que maximizan la EUA (Martin y Ruiz-Torres, 1992). Una mayor EUA en períodos juveniles puede ayudar a que el agua sea mejor utilizada durante el llenado de grano (Passioura, 1977). Solo cultivares que cierran sus estomas en respuesta a un severo estrés hídrico pueden no resentir su rendimiento, respecto a cultivares que permanentemente muestren baja  $g_s$  (Jones, 1987). De este modo, la selección de genotipos por alta EUA puede no ser un buen criterio de selección para mejorar los rendimientos en ambientes de estrés hídrico. La producción de las plantas depende de su EUA, pero mayormente de su capacidad de sostener la  $T$  (Blum, 1993).

Si bien la  $g_s$  disminuye en respuesta al DPV, la respuesta es mayormente gobernada por la tasa de  $T$  (Monteith 1995, Mott y Parkhurst 1991). Según estos autores, la regulación de la  $g_s$  es un mecanismo de retroalimentación negativo (*feedback*) o hidro-pasivo según la literatura. Este tipo de mecanismo depende de la tasa de  $T$ , la cual es función de la radiación, temperatura, concentración de  $\text{CO}_2$  y contenido de agua del suelo. De este modo, el mecanismo hidro-pasivo propone que

cuando la tasa de  $T$  es mayor, el agua del suelo es deficitaria lo que provoca a su vez una disminución del  $\Psi_w$  de la hoja. No obstante, los autores no desestimaron la hipótesis de que en condiciones de alto DPV, tanto la tasa de  $T$  como la  $g_s$  disminuirían por un cierre irregular de los estomas (comúnmente *patchy closure of stomata*).

Otro mecanismo propuesto para explicar la regulación de la  $g_s$  es el denominado hidro-activo o *feed-forward* según la literatura. Este mecanismo explica que la reducción de la turgencia de las células guardianas de los estomas es mediada por una disminución del  $\Psi_w$  de la planta y por el aumento de la tasa de síntesis de la hormona ácido abscísico (ABA), así como de su liberación desde los cloroplastos hacia el apoplasto (Taiz y Zeiger, 2002). A su vez, varios reportes han indicado que la regulación de la tasa de  $T$  mediada por ABA, sería una respuesta a los cambios de DPV que ocurren entre la hoja y la atmósfera (Xue, citado por Streck 2003, Bunce 1998, 1997, Dodd *et al.* 1996, Farquhar 1978).

Ambos mecanismos de regulación de la  $g_s$  son discutidos en una revisión de Streck (2003). El autor reporta haber observado que si bien la hoja bandera cierra sus estomas cuando se incrementa el DPV, no sucede lo mismo con las hojas inferiores. También señaló que la respuesta de una planta al DPV, además de ser mediada por la posición de las hojas, también puede serlo por el historial de disponibilidad de agua del suelo. Sobre esa base, Streck (2003) planteó la hipótesis de que si ambos mecanismos son correctos, el mecanismo hidro-pasivo puede suceder en el corto plazo como respuesta a un alto DPV durante el día, mientras que el mecanismo regulado por ABA puede ser una respuesta de mayor plazo en plantas que tuvieron un historial de déficit hídrico.

No obstante la hipótesis de Streck (2003), sobre la convivencia de dos mecanismos que explican la regulación de la  $g_s$  (hidro-pasivo e hidro-activo), existe una relación causa–efecto del DPV en el sistema atmósfera–planta–suelo que determina que la  $g_s$  sea regulada por la hormona ABA. Si bien aún no se ha dilucidado cómo es que ocurre esa relación causa–efecto, es sabido que el ABA se sintetiza en las raíces y hojas adultas en respuesta a suelos con déficit hídrico, y que su concentración en el xilema regula la  $g_s$  (Zhang *et al.*, 2006a).



En un experimento de riego con árboles de arce rojo (*Acer rubrum* L.), Pettijohn *et al.* (2009) modelaron el estrés hídrico y las implicancias de ambos mecanismos de regulación de la  $g_s$  (hidro-pasivo e hidro-activo). Los autores concluyeron que ambos mecanismos de regulación ocurren, pero no en función a respuestas de corto o largo plazo (Streck, 2003), sino según ocurra o no un déficit hídrico en el suelo. Según Pettijohn *et al.* (2009), cuando el  $\Psi_w$  del suelo no es limitante solo intervendría el mecanismo hidro-activo, es decir que el ajuste de los estomas sería función de la relación causa–efecto entre el DPV y la hormona ABA. Mientras que en la medida que el  $\Psi_w$  del suelo es limitante, intervendrían ambos mecanismos (hidro-activo e hidro-pasivo). A su vez, según Pettijohn *et al.* (2009) el mecanismo hidro-pasivo no ocurriría como consecuencia directa del incremento del DPV durante el día (Streck, 2003), sino por un desfase entre la tasa de  $T$  y la tasa de absorción de agua. Esto es, que con las horas del día el  $\Psi_w$  de la planta disminuye por una disminución del  $\Psi_w$  del suelo.

#### **1.4.7. Efectos generales del estrés por déficit hídrico**

En las plantas, el efecto del estrés por déficit hídrico puede dividirse en tres niveles: 1) Leve, deshidratación de 8 a 10 % del nivel de saturación; 2) Moderado, deshidratación de 10 a 20 % o  $\Psi_w$  entre  $-1,2$  a  $-1,5$  MPa; y 3) Severo,  $\Psi_w$  por debajo de  $-1,5$  MPa (Hsiao, 1973). No obstante, esta clasificación no contempla el AO que puedan realizar las plantas. En todo caso, la mayor parte de las plantas superiores mueren cuando pierden de 40 a 90 % de su contenido normal de agua (Schröder, Höfler, citados por Levitt, 1980).

Las células guardianas, responsables de la apertura y cierre de los estomas, son sensibles al cierre desde los primeros niveles de déficit hídrico (leve y moderado). Mientras que el marchitamiento celular sucede solo cuando el déficit hídrico llega a su tercer nivel (severo). La pérdida de turgencia tiene dos efectos celulares principales: 1) inhibición del crecimiento, y 2) cierre estomático. Otros efectos son cambios en las propiedades de las membranas y disminución del espacio intercelular.

La disminución de la tasa de crecimiento celular ocurre antes que la disminución de las tasas de fotosíntesis y de respiración (Boyer, 1970). A su vez, de los componentes del crecimiento celular: elongación, división y diferenciación, es la elongación la que primero se ve afectada por el estrés hídrico (Hsiao, 1973).

Los estreses por déficit hídrico moderado inhiben el crecimiento celular de las plantas provocando una disminución del área foliar y del tamaño de los estomas. Contrariamente, la densidad de los estomas se incrementa, aunque su número total se reduce debido a la disminución del área foliar (Zhang *et al.* 2006b, McCree y Davis 1974). Estas respuestas son por tanto un mecanismo de adaptación de las plantas (Spence *et al.*, 1986). Dado que la  $g_s$  es proporcional al cuadrado del radio efectivo de los poros de los estomas (Nobel, citado por Maherali *et al.*, 2002), células guardianas pequeñas permitirían que los estomas permanecieran abiertos en condiciones de déficit hídrico y mantuvieran así un balance entre la asimilación de CO<sub>2</sub> y la pérdida de agua.

#### **1.4.8. Efectos del estrés por déficit hídrico pos antesis en trigo**

##### **1.4.8.1. Efectos en la planta**

El déficit hídrico que ocurre desde antesis y durante el llenado de grano (Z 6.5 a Z 9.0), es uno de los tres patrones de déficit hídrico que ocurren en la producción del cultivo de trigo en condiciones de secano (Rajaram *et al.*, 1996). Este patrón asociado a las regiones del Mediterráneo, también puede observarse en años de primaveras secas en parte de Argentina y Uruguay.

Cuando el déficit hídrico sucede durante el llenado de grano de trigo, se afecta la concreción del rendimiento potencial fijado entre la iniciación floral y espiguilla terminal, momento este último en el que se terminó de definir el número potencial de espiguillas por espiga (Slafer y Rawson, 1994). El inicio de la senescencia puede adelantarse y o su tasa incrementarse, promoviendo que más temprano y rápido los carbohidratos de los tallos se movilicen para su deposición en los granos (Izanloo *et al.* 2008, Yang *et al.* 2007, Nicolas y Turner 1993, Simane *et al.* 1993). El compo-

nente de rendimiento que es afectado por el déficit hídrico desde antesis y durante el llenado de grano es el peso de grano (Kobata *et al.* 1992, Hochman 1982). Estréses más severos y o que comiencen más temprano pueden afectar también la fertilidad de los tallos y el número de granos (Izanloo *et al.*, 2008).

Cambios importantes de la planta en condiciones de estrés hídrico son la morfología y crecimiento de sus raíces, sobretodo en suelos de pobre estructura física donde las raíces adventicias (de la corona) no pueden penetrar y establecerse. Es en ese tipo de suelos donde mejor puede observarse cómo las raíces seminales existentes se extienden hacia lo profundo del suelo, allí donde está el agua (Blum 2005, Asseng *et al.* 1998). Las raíces de trigo pueden seguir creciendo en profundidad luego de antesis, sobre todo en aquellos cultivares con resistencia a estrés hídrico (Manschadi *et al.*, 2006).

Finalmente, el cociente entre la biomasa aérea y la radicular decrece, esto es porque se reduce la biomasa aérea, mientras que los cambios radiculares son más bien morfológicos que de incremento de su biomasa (Blum, 2005). En el mismo sentido, Sharp *et al.* (1988) observaron que el estrés hídrico provocó que las raíces de plantas de maíz crecieran en extensión pero a la vez disminuyendo su grosor.

#### **1.4.8.2. Efectos en el peso y tamaño de grano**

Cuando el peso y tamaño de grano son afectados, disminuye el rendimiento y se afecta la calidad industrial del grano y la calidad de su uso como semilla (Marshall *et al.*, 1986). Los mismos autores identificaron que el peso y tamaño de grano dependen principalmente del largo de grano. La relación del peso con el largo de grano fue observada también por Tashiro y Wardlaw (1990), quienes identificaron que ambos caracteres son afectados cuando se ejerce un estrés térmico pos antesis.

Si bien no identificaron relaciones causa–efecto, Lizana *et al.* (2010) identificaron fuertes correlaciones del largo de grano con su peso y tamaño ( $r^2=0,94$ ,  $P<0,01$  y  $r^2=0,98$ ,  $P<0,01$ , respectivamente), y del peso de grano con su contenido estabilizado de agua ( $r^2=0,88$ ,  $P<0,01$ ). A su vez, observaron que los mayores incrementos en el largo, contenido de agua, volumen y peso de grano, ocurrieron durante el primer ter-

cio del llenado de grano. De los anteriores caracteres, el largo de grano fue el que más temprano alcanzó a estabilizar su crecimiento, observaciones también realizadas por Hasan *et al.* (2011).

Por otra parte, Lizana *et al.* (2010) observaron en dos experimentos, que las tasas de acumulación de agua fueron 35 y 46 % superiores a las tasas de acumulación de materia seca. Ello indicó que el crecimiento del grano precede a la acumulación de materia seca y que cuando las diferencias fueron mayores, éstas se debieron a una tasa de llenado de grano más lenta, la que a su vez se habría debido a una temperatura media del ambiente menor (15,5 vs. 16,7 °C).

En 1992 McQueen-Mason *et al.* identificaron que la elongación celular es regulada por las expansinas, una familia de proteínas que actúan relajando las cadenas de celulosa y hemicelulosa de las paredes celulares en respuesta a la presión de turgencia (Calderini, 2011). A su vez, estudios de la expresión génica de las expansinas se realizaron durante el llenado de grano (Lizana *et al.* 2010, Lin *et al.* 2005). Usando el pericarpio como fuente de ARN, Lizana *et al.* (2010) estudiaron la expresión de cinco expansinas (*pTaExpA4*, *pTaExpA6*, *pTaExpA6-a*, *pTaExpA6-b* y *pTaExpA8*) durante la primera mitad del llenado de grano (de 24 a 325 °C día pos anthesis). Este periodo fue equivalente al 54 % del llenado de grano y 100 % del crecimiento del largo de grano. En un segundo experimento, extendieron su período de estudio de 41 a 470 °Cd PA, equivalente al 67 y 100 % del llenado y largo de grano, respectivamente. Como resultado, observaron que la expresión de las expansinas declinó después de los 360 °Cd PA. Contrariamente, identificaron que la máxima expresión de las expansinas ocurrió antes de 247 °Cd PA, cuando también fueron máximas la tasa de acumulación de agua y la tasa de crecimiento del largo de grano.

La expresión y actividad de las expansinas no solo son controladas por claves intrínsecas al desarrollo, sino también por señales ambientales como el estrés por déficit hídrico (Zhao *et al.*, 2012). En tales condiciones, se ha observado que la expresión de las expansinas es mediada por las hormonas ABA y ácido indol-3-acético (IAA), observándose que cuanto mayor es la resistencia al estrés hídrico, mayor es la actividad de las expansinas y mayor es la expansión de las paredes celulares.

Basándose en estudios previos (Lizana *et al.* 2010, Ugarte *et al.* 2007, Calderini y Reynolds 2000, Calderini *et al.* 1999), Hasan *et al.* (2011) sostuvieron la hipótesis de que el peso potencial de grano de trigo es determinado previo a la antesis, luego de observar por dos años una asociación lineal y positiva entre el peso de carpelo a la polinización y el peso final de grano ( $r^2=0,79$ ,  $P<0,01$  y  $r^2=0,86$ ,  $P<0,01$ , primer y segundo año respectivamente). El carpelo, parte femenina de la flor, en el trigo crece rápidamente entre embuche y antesis (Z 4.0 a Z 6.0). Altas temperaturas durante ese periodo, afectan el número de granos pero también el crecimiento del carpelo y el peso final del grano (Ugarte *et al.* 2007, Calderini *et al.* 1999).

Tomando la hipótesis anterior sobre el efecto de la temperatura en la definición del peso y tamaño de grano, un déficit hídrico previo a la antesis podría tener también un efecto mayor que un déficit hídrico durante el llenado de grano. Considerando ello, como la antesis en flores, espiguillas y espigas es a destiempo (Tashiro y Wardlaw 1990, Evans *et al.* 1972), un déficit hídrico pos antesis podría ejercer un estrés mayor en aquellos cultivares con un desfase mayor en la emisión de sus tallos fértiles (*i.e.*, de-sincronización).

Finalmente, un menor peso y tamaño de grano se correlaciona con una disminución del rendimiento del grano a su molienda (Marshall *et al.*, 1986). Ello conlleva a que el estrés por déficit hídrico pos antesis disminuye no solo el rendimiento de grano (Kobata *et al.* 1992, Hochman 1982), sino también el rendimiento de harina debido a un menor peso hectolítrico (*i.e.*, kg de grano en un volumen de 100 L).

#### **1.4.8.3. Efectos en la calidad industrial del grano**

El estrés por déficit hídrico pos antesis afecta también la calidad industrial del grano (Ozturk y Aydin, 2004), comprendida ésta por atributos de calidad física, molinera y de aptitud industrial. El parámetro que mejor indica los atributos de calidad física es el peso hectolítrico (Vázquez, 2009). El peso hectolítrico del grano trillado depende del grado de impurezas, del daño físico-mecánico y por insectos, de la afectación de enfermedades, y también de la forma y peso del grano como fue indicado por Marshall *et al.* (1986). Respecto a calidad molinera, el parámetro que mejor se rela-

ciona con la correcta separación del endosperma del grano es la textura o dureza (Vázquez, 2009), la cual en cambio depende mayormente del genotipo de trigo empleado (Turner *et al.* 2004, Morris 2002, Law *et al.* 1978). Finalmente, y como la calidad física, la aptitud industrial del grano también es afectada en condiciones de estrés por déficit hídrico (Guttieri *et al.*, 2001). En relación con ello, un efecto del déficit hídrico es que el porcentaje de proteína se incrementa, resultado de que la tasa de deposición de nitrógeno en el grano se reduce más lentamente que la tasa de deposición de carbohidratos (Ozturk y Aydin, 2004).

Por aptitud industrial de trigo se entiende a la calidad que debe tener su harina, según el producto que con ella se quiera elaborar. Es decir que una harina puede ser buena para un producto y mala para otro. Una de las posibles formas de clasificar las harinas de trigo según su aptitud industrial es: en harinas duras (para la elaboración de pastas), harinas con fuerza de masa (para la elaboración de panificados de leudado), y harinas débiles (para la elaboración de pastas frescas y galletitas entre otros horneados).

El principal componente que influye en la mejora de la aptitud industrial y nutricional de la harina de trigo es el contenido y composición de la proteína en el grano (Shewry, 2007). Un estudio realizado con una colección de 12.613 trigos determinó que el porcentaje de proteína en el grano puede oscilar entre 7 y 22 %. Los autores concluyeron que la mayor parte de esa variación no se correspondió a factores genéticos, sino al ambiente y sus interacciones con el genotipo (Vogel *et al.*, 1973). El amplio rango de proteína señalado se estrecha cuando el cultivo de trigo se circunscribe a una determinada región, genotipos cultivados, ambiente de producción y manejo realizado. Al respecto, y a modo de ejemplo, estudios de caracterización y de interacción genotipo por ambiente de parámetros de calidad industrial de trigos, fueron realizados para el centro del Cono Sur de Sudamérica por Abbate *et al.* (2010) y Ernst *et al.* (2001). En esta región, así como en Canadá y el norte de Estados Unidos, se cultivan trigos duros rojos primaverales, categoría ésta traducida de la clasificación utilizada por Estados Unidos y de mayor difusión internacional (*hard red spring wheats*). Es un tipo de trigos de textura dura, característica ésta relacionada con un mayor contenido de proteína en el grano (Turner *et al.*, 2004). Siendo por esta

razón, preferidos por la industria automatizada para la elaboración de panificados con volumen de masa, productos para los que se requiere un porcentaje de proteína en el grano superior a 12,5 % (Turner *et al.*, 2004).

Mientras que la cantidad de proteína se define fundamentalmente por el ambiente, su composición es mayormente definida por el genotipo (Guttieri *et al.*, 2001). No obstante, para la composición de la proteína se han reportado interacciones significativas entre el genotipo y el ambiente de producción (Huebner *et al.*, 1997). Las gliadinas y gluteninas son la porción más importante de la proteína en el grano, en contacto con el agua permiten que se forme el gluten, responsable éste de conferirle a la harina propiedades de elasticidad y viscosidad para la elaboración de panificados de leudado. Estas propiedades promueven la coherencia de la masa (*i.e.*, aglutinamiento de la proteína con el almidón) y la retención del dióxido de carbono desprendido por la fermentación causada por las levaduras (Vázquez 2009, Shewry *et al.* 1995). Las gliadinas son proteínas monoméricas, mientras que las gluteninas son poliméricas y con una estructura tridimensional más compleja, lo que permite que sean las proteínas más importantes para la formación del gluten. A su vez, las gluteninas se dividen en unidades de bajo y alto peso molecular, siendo las segundas las que le dan elasticidad y fuerza a la masa (Shewry *et al.*, 1995).

La fertilización con nitrógeno promueve un incremento del contenido de proteína en el grano, mientras se incrementa la deposición de gliadinas y gluteninas, es mayor el estímulo a la deposición de gliadinas que a gluteninas, y a la deposición de gluteninas de alto peso que a las de bajo peso molecular (Saint Pierre *et al.* 2008, Triboï *et al.* 2000). A diferencia de que con la fertilización de nitrógeno, cuando en pos anthesis ocurre un estrés por déficit hídrico, la deposición total de proteína en el grano se reduce si bien la concentración también se incrementa, y similarmente, la deposición de gliadinas se favorece con relación a la deposición de gluteninas (Saint Pierre *et al.* 2008, Triboï *et al.* 2003, Panozzo *et al.* 2001). El efecto que ejerce un estrés por déficit hídrico en la composición de la proteína en el grano es menor que el efecto que ejerce la fertilización con nitrógeno (Saint Pierre *et al.*, 2008). No obstante, en la literatura hay resultados contradictorios respecto a la respuesta que tiene un incremento de nitrógeno y o un déficit hídrico en la composición de la proteína.

Al respecto, Triboï *et al.* (2000) señaló que ello podría deberse a diferencias genóticas entre cultivares y a variaciones en la tasa y duración de la deposición de nitrógeno a proteína. Un estudio de Panozzo *et al.* (2001) señaló que la deposición de gluteninas en el grano es posterior a la de gliadinas. Ello indica que también importa el momento de ocurrencia y la intensidad de los efectos ambientales.

La composición de la proteína afecta las propiedades reológicas de la masa (*i.e.*, propiedades de amasado, respuesta de la masa a una fuerza o deformación aplicada). Los instrumentos con los que empíricamente se analizan las propiedades reológicas de las harinas son: el extensógrafo, el texturómetro, el alveógrafo, el farinógrafo y el mixógrafo (Vázquez, 2009). Uno de los de más amplio uso es el mixógrafo, instrumento éste que genera un gráfico llamado mixograma a partir del análisis de una mezcla de harina y agua. El mixograma indica el tiempo de mezclado necesario para lograr la máxima consistencia de la masa, esto es la altura del mixograma. Cuanto mayor es la consistencia de la masa, mejor es la absorción de agua que tiene una harina, una propiedad deseada por la industria relacionada a mayor contenido de proteína (Vázquez, 2009).

#### **1.4.9. Caracteres morfo-fisiológicos y marcadores bioquímicos y moleculares de resistencia a estrés hídrico**

La genética de la resistencia al estrés por déficit hídrico es compleja y está relacionada también con los estreses abióticos salinidad y temperatura de congelamiento (Kasuga *et al.*, 1999). Dada esa complejidad, es difícil identificar qué caracteres morfo-fisiológicos y o qué marcadores bioquímicos están mejor asociados con la respuesta al estrés por déficit hídrico.

Como caracteres fisiológicos más importantes se han citado: fecha de anthesis, más una estrategia de escape que un mecanismo de resistencia; *stay-green*, concepto relacionado con el contenido de clorofila y el inicio y tasa de senescencia (Verma *et al.*, 2004);  $\Psi_w$ , CRA y AO, indicadores de status hídrico; la  $g_s$ ; y la EUA (Condon *et al.*, 2002). En tanto como caracteres morfológicos puede citarse a las ceras, pubescencia y enrollamiento de hojas (Reynolds *et al.*, 2001a), y arquitectura de hojas y



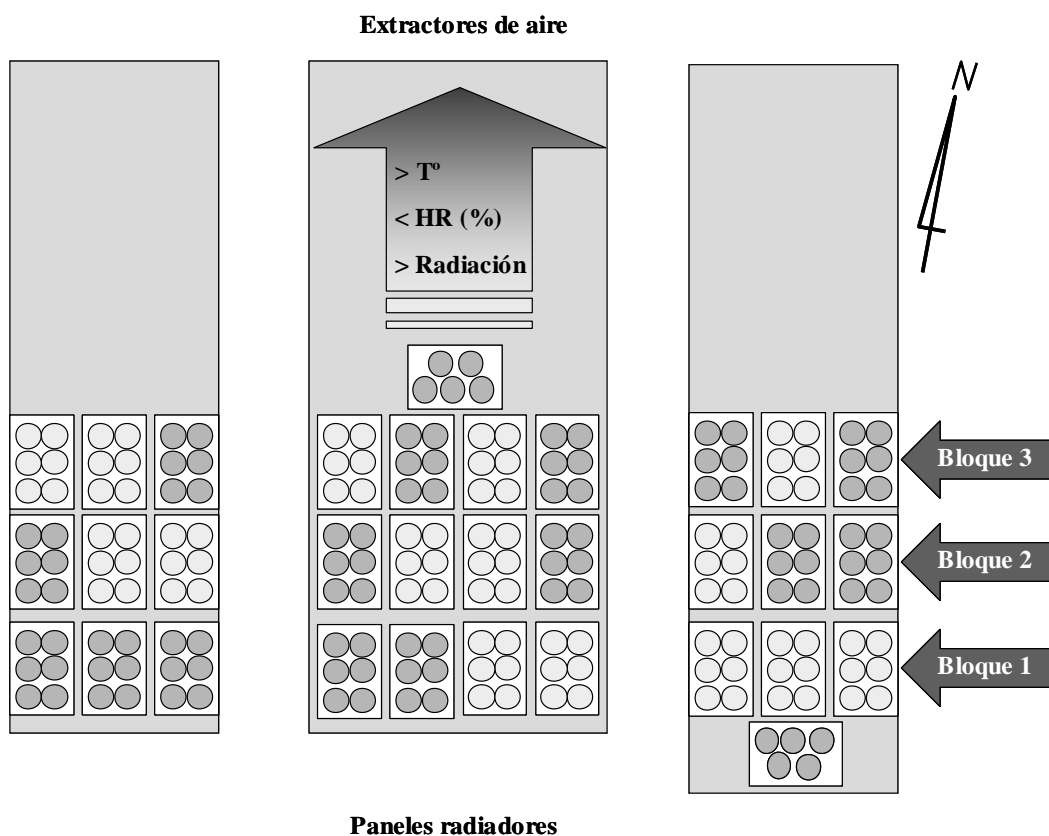
raíces (Manschadi *et al.*, 2006). Finalmente, como marcadores bioquímicos importantes se han citado a los carbohidratos solubles del tallo (Yang *et al.*, 2007); la hormona ABA (Sharp *et al.*, 2004); la prolina, un aminoácido que actúa en múltiples funciones (*e.g.* osmoprotección) (Szabados y Saviouré 2010, Kemble y MacPherson 1954); y las dehidrinas, una familia de proteínas que actúan como factores de protección de macromoléculas (Vaseva *et al.* 2010, Dure *et al.* 1989).

Por otro lado, el estrés hídrico induce la expresión de varios genes, siendo esa expresión en algunos casos regulada por la hormona ABA (Secenji *et al.*, 2005). Los productos génicos pueden clasificarse en dos tipos: las proteínas que regulan la expresión génica y las señales de transducción en respuesta al estrés hídrico (*e.g.* factores de transcripción), y las proteínas que tienen una función directa en la protección de las células al estrés hídrico, como por ejemplo la prolina y las dehidrinas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento fue realizado en condiciones de invernáculo en la estación experimental INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay (34°20'15" S; 57°41'29" O). El diseño experimental fue de bloques completos al azar con tres repeticiones y arreglo factorial de tratamientos, donde cinco cultivares de trigo fueron sometidos a dos niveles de agua de riego entre antesis y madurez fisiológica. La unidad experimental consistió de 24 plantas contenidas en seis macetas colocadas sobre una bandeja, cuatro plantas por maceta (Figura 1).



**Figura 1.** Croquis del experimento de riego en invernáculo cerrado con sistema de refrigeración y ventilación de aire. En la parte superior e inferior de la figura se señala la posición de los extractores y paneles que refrigeran el aire. Los tratamientos de Control y Estrés son señalados en gris oscuro y claro respectivamente.

## **2.2. MATERIAL VEGETAL**

Se utilizaron cinco cultivares de trigo pan, de tipo primaveral, textura dura y cariopse rojo y ámbar. Estas características son propias de la clase de trigos que son cultivados en Argentina y Uruguay. Los cultivares utilizados fueron LE 2249 (INIA Churrinche), LE 2331 (INIA Don Alberto), LE 2333 (INIA Carpintero) Baguette Premium 11 y Biointa 1001. Los tres primeros fueron obtenidos por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA Uruguay), Biointa 1001 por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA Argentina) y Baguette Premium 11 de origen francés por C.C. Benoist. Excepto éste último, que presenta un ciclo intermedio largo, los otros cuatro cultivares son de ciclo fenológico intermedio corto.

Los cultivares LE 2249, Baguette Premium 11 y Biointa 1001 se escogieron por ser de referencia comercial y desempeño conocido en Argentina y Uruguay, mientras que LE 2331 y LE 2333 se escogieron por su promisorio desempeño y reciente liberación comercial (INASE Argentina 2012a, Castro *et al.* 2010). Los cultivares Biointa 1001 y Baguette Premium 11 también fueron escogidos porque en 2008 ocuparían la mayor área de siembra del cultivo de trigo en Uruguay (Esteban Hoffman, comunicación personal, 9 de junio de 2008). Posteriormente, una encuesta oficial estimó que 120.000 ha equivalentes al 26 % del área que se cultivaría con trigo en Uruguay se sembrarían con esos dos cultivares (MGAP, 2008). Finalmente, los cinco cultivares también se escogieron porque en dos experimentos anteriores tuvieron una respuesta diferencial a estrés por déficit hídrico (Hoffman *et al.* 2011, Castro y Vázquez 2010).

## **2.3. CONDICIONES DE CRECIMIENTO**

El experimento se instaló en un invernáculo cerrado con sistema de ventilación electro hidráulico reductor del efecto invernadero, en el que por un extremo del invernáculo fluye aire que evapora el agua de los paneles de radiación, y por el otro, extractores lo retiran con mayor temperatura y menor humedad (sistema *Fan and*

*Pad Evaporative Cooling System*). Un gradiente de mayor radiación ocurre también en el invernáculo por la posición de éste respecto al sol (Figura 1).

La metodología para instrumentar la unidad experimental fue adaptada de experiencias previas de Hoffman *et al.* (2011). Las macetas utilizadas para contener el sustrato y el material vegetal fueron tubos de PVC de 0,16 m de diámetro interior y 0,30 m de alto. En la base de cada tubo se colocó una rejilla metálica de malla fina para contener el sustrato. A su vez, las macetas (tubos de PVC) fueron colocadas sobre bandejas plásticas de base impermeable con medidas de 0,60×0,40×0,10 m. El sustrato utilizado fue una mezcla (1:1:1) de tierra franco arcillo limosa, arena, y sustrato orgánico (BioFer Almacigos, Riverfilco S.A., Montevideo, Uruguay).

La siembra se efectuó el 27 de junio de 2008 con ocho semillas por maceta. La germinación comenzó el 30 de junio y la emergencia se completó entre el 4 y 10 de julio. El 16 y 17 de julio las plántulas se ralearon a cuatro por maceta. De siembra a final de ciclo, las plantas tuvieron suministro de 8 a 6 horas de luz artificial con lámparas de vapor de sodio de alta presión (SON-T 400 W, Philips, Bélgica).

Al inicio de macollaje (Z 2.2), en base a los análisis de una muestra de la mezcla del sustrato utilizado, el 24 de julio se fertilizó cada maceta con una solución de 0,5 mL de N-P-K (12-8-5, fertilizante foliar NPK micronutrientes, Industria Sulfúrica S.A., San José, Uruguay) en 0,42 L de agua. Hacia el fin del encañado (Z3.7 a Z 3.9), el 13 de agosto se aplicó la misma dosis de fertilizante pero en la bandeja y diluido en 5 L de agua ( $\approx 0,83$  L por maceta).

Para el control de trips (INSECTA: Thysanoptera) se realizaron cinco aspersiones alternando dos principios activos, Malathion ( $1,2$  mL p.a.  $L^{-1}$ ) y Acephate ( $1$  g p.a.  $L^{-1}$ ). Para el control de ácaros (ARACHNIDA: Prostigmata) se asperjó Clofentezine ( $0,18$  mL p.a.  $L^{-1}$ ). Finalmente, se controló oídio (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) asperjando azufre mojable ( $4$  g  $L^{-1}$ , Beltrame & Cia, Montevideo, Uruguay). El cultivar Baguette Premium 11 fue más afectado por el hongo debido a que los demás cultivares ya casi habían completado su ciclo.

## 2.4. TRATAMIENTOS DE AGUA DE RIEGO

El experimento fue regado una o dos veces por semana de acuerdo a la *ET* promedio ponderada de los cinco cultivares. Cuando el 50 % de las plantas de cada cultivar y de cada bloque llegaron al estado de antesis, se comenzaron a aplicar dos niveles de agua de riego: 1) Control y 2) Estrés. El tratamiento Estrés fue regado con el 50 % del agua regada a su respectivo Control. Ambos tratamientos de riego fueron aplicados hasta que las unidades experimentales del Control alcanzaron la madurez fisiológica.

Si bien los tratamientos de riego se realizaron durante el llenado de grano, un control estricto del volumen de agua regada se realizó desde la siembra. Primero, a una muestra de sustrato mezcla de 4,5 kg (cantidad equivalente a la contenida en cada maceta del experimento), se le determinó la humedad (12,8 %) en estufa. Posteriormente, la muestra seca del sustrato mezcla se colocó en una maceta extra al experimento y muy lentamente se la saturó con agua. Después de 24 horas, luego de que el sustrato en la maceta dejó de escurrir, por diferencias de peso se determinó su máxima capacidad de retención de agua (1 L maceta<sup>-1</sup>).

Los riegos a la siembra, emergencia y con la primera fertilización fueron realizados en las macetas, mientras que los otros riegos fueron realizados en las bandejas. El riego en la bandeja promovió el crecimiento de las raíces hacia donde estaba el agua y el ascenso capilar del agua por diferencias de  $\Psi_m$ . Los dos primeros riegos a la siembra y emergencia fueron realizados con una cantidad arbitraria de agua (0,5 L por maceta). A partir del tercer riego al estado de plántula (11 de julio), el volumen de agua de riego comenzó a reponerse de acuerdo a la *ET* promedio estimada de los cinco cultivares.

La estimación de la *ET* promedio de los cinco cultivares se realizó con diez macetas divididas en dos bandejas testigo (un cultivar por maceta y bandeja). Las bandejas testigo se colocaron a cada lado del experimento (bloques 1 y 3 respectivamente). El volumen de agua a reponer en las bandejas testigo se determinó por diferencias de peso. Esto es, peso de la maceta de referencia a máxima capacidad de retención de agua (1 L maceta<sup>-1</sup>), menos el peso promedio de las macetas de las ban-

dejas testigo antes de cada riego. El volumen de reposición de agua para cada bandeja testigo (cinco macetas), fue prorrateado para regar el tratamiento Control (seis macetas por bandeja). De este modo, el agua regada al tratamiento Control no fue la cantidad óptima requerida por cada cultivar, sino la estimación de la *ET* promedio de los cinco cultivares.

El experimento fue regado por el promedio de *ET* de las bandejas testigo hasta el 13 de agosto. En adelante, el riego fue bloqueado por el incremento del gradiente de *ET* entre bloques, el cual fue provocado por un incremento de la temperatura y una disminución de la humedad del aire en el invernáculo a medida que avanzaba la estación de crecimiento. El flujo de aire alrededor del bloque 1, más cercano a los paneles radiadores, fue más frío y húmedo que el aire alrededor del bloque 3, más próximo a los extractores de aire. De este modo, los bloques 1 y 3 fueron regados de acuerdo a la *ET* de la bandeja testigo más próxima, mientras que el bloque 2 fue regado por el promedio de los bloques 1 y 3.

## 2.5. DETERMINACIONES

Las mediciones repetidas en el tiempo de CRA (%) y  $g_s$  ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) se realizaron desde anthesis a madurez fisiológica. El CRA se determinó según la técnica de Barrs y Weatherley (1962) y la  $g_s$  se midió con un porómetro de difusión del estado estacionario (SC-1, Decagon Devices, Inc., Pullman, WA). El CRA se determinó a secciones de 2 a 3 cm de tres láminas por unidad experimental. Las láminas muestreadas fueron de las hojas inferiores a la hoja bandera (HB-1) del tallo principal de tres plantas de diferentes macetas. A los tres cortes de hoja muestreados se les determinó el peso fresco, turgente y seco. Debido a un error de manipulación, el último muestreo de hojas de Baguette Premium 11 fue desechado. Por su parte, la  $g_s$  se determinó en la parte media adaxial de hojas banderas (HB) del tallo principal de tres plantas de diferentes macetas.

Las mediciones de CRA y  $g_s$  siempre se realizaron por la mañana y antes de cada riego, de modo que en el tratamiento Control el contenido de agua de las macetas siempre estuvo por debajo de 100 % de saturación. Debido a que los tratamientos

de riego comenzaron a realizarse cuando el 50 % de las plantas alcanzaron el estado de antesis, las mediciones por bloque y cultivar no siempre se realizaron el mismo día. En cambio, para cada combinación bloque por cultivar, las mediciones de CRA y  $g_s$  sí se realizaron el mismo día en los tratamientos de Control y Estrés.

Antes de la cosecha se registraron los tallos y espigas planta<sup>-1</sup> del experimento y se realizaron observaciones visuales del efecto del estrés hídrico en espigas, follaje y raíces. Después de la cosecha se determinó materia seca de biomasa aérea y radicular planta<sup>-1</sup>, largo máximo de raíces de cada maceta, granos espiga<sup>-1</sup>, rendimiento planta<sup>-1</sup> y peso de grano. Con esas determinaciones se calculó la relación espigas tallos<sup>-1</sup>, granos planta<sup>-1</sup>, biomasa total planta<sup>-1</sup>, relación biomasa radicular biomasa aérea<sup>-1</sup> (BR BA<sup>-1</sup>), índices de cosecha sobre biomasa aérea y total (IC e ICT respectivamente), y las EUA de riego del rendimiento y de la biomasa aérea (EUA<sub>REND</sub> y EUA<sub>BA</sub> respectivamente). El agua de riego, denominador de la EUA de riego, no se discriminó en agua transpirada y agua evaporada.

El porcentaje de proteína en el grano se determinó con humedad base de 13,5 % por espectrometría del infrarrojo cercano (NIRS). Para ello se utilizó un espectrofotómetro Serie 6500 (FOSS NIRSystem Inc., Silver Spring, MD, EE.UU) calibrado por la técnica de Kjeldahl (método aprobado 46-12, AACC 2000). La molienda del grano se realizó con un molino Perten KT-3100 (Perten Instruments AB, Huddinge, Suecia), y la extracción de la harina con un molino Bühler MLU 202 (Bühler AG, Uzwil, Suiza). Finalmente, los parámetros reológicos altura de mixograma y tiempo de mezclado se determinaron en un mixógrafo (National Manufacturing Co., Lincoln, Nebraska, EE.UU) colocando 10 g de harina por tratamiento (método aprobado 54-40A, AACC 2000). Las técnicas fueron realizadas en el Laboratorio de Calidad de Granos de INIA La Estanzuela.

## 2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los caracteres, excepto CRA y  $g_s$ , se analizaron con el siguiente modelo estadístico (M1):

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + (\alpha\gamma)_{ij} + \beta_k + e_{ijk}$$

donde  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ , y  $e$ , son la media, los tratamientos de riego, los cultivares, los bloques, y los errores, respectivamente. Para determinar si hubo efectos de tratamientos e interacción, a priori se consideró un nivel de significancia de  $P < 0,05$  para todos los caracteres. Las diferencias de medias entre cultivares se identificaron por el test de Tukey cuando los datos fueron balanceados, y por el test de Tukey–Kramer cuando fueron desbalanceados. Además, pruebas de contrastes ortogonales se realizaron para discriminar las interacciones entre cultivares y tratamientos de riego.

Mientras que las mediciones repetidas en el tiempo de CRA y  $g_s$  se analizaron con el modelo estadístico (M2):

$$Y_{ijkn} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + (\alpha\gamma)_{ij} + \beta_k + e(a)_{ijk} + s(\alpha\gamma\beta)_{ijk} + \tau_n + (\alpha\tau)_{in} + (\gamma\tau)_{jn} + (\alpha\gamma\tau)_{ijn} + e(b)_{ijkn}$$

donde los términos que se repiten son iguales al modelo anterior (M1),  $s$  es un efecto aleatorio de las unidades con mediciones repetidas (sujetos),  $\tau$  es el efecto de los días de iniciados los tratamientos de riego (DITR), y  $e(a)$  y  $e(b)$  son los errores  $a$  y  $b$ , respectivamente. Adicionalmente, en el modelo estadístico para la  $g_s$  el DPV se incluyó como covariable. El DPV se calculó con el modelo exponencial empírico de Prenger y Ling (2001), empleando los registros horarios de temperatura y humedad relativa del aire de los momentos en que las mediciones de  $g_s$  fueron realizadas.

En ambos tratamientos (CRA y  $g_s$ ) la estructura de la covarianza de las mediciones repetidas en el tiempo se analizó con diferentes modelos. Para estimar las medias, por su buen ajuste de acuerdo a los indicadores de razón de verosimilitud (LRT) y los criterios de información de Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC), se escogió el modelo *spatial power law* [SP(POW)] con el ajuste de Kenward y Roger, recomendado para mediciones repetidas tomadas a tiempos desiguales, correlaciones que declinan en función del tiempo, datos desbalanceados y múltiples efectos de azar (Littell *et al.*, 2006).

Por otro lado, las mediciones repetidas en el tiempo de CRA se ajustaron iterativamente por mínimos cuadrados al modelo exponencial:  $b_0 + A [1 - e^{(-k * \text{Días de estrés})}]$  (Orskov y McDonald, 1979). El modelo indica cómo el CRA disminuye durante el llenado de grano y cómo la disminución se acelera hacia la senescencia. El

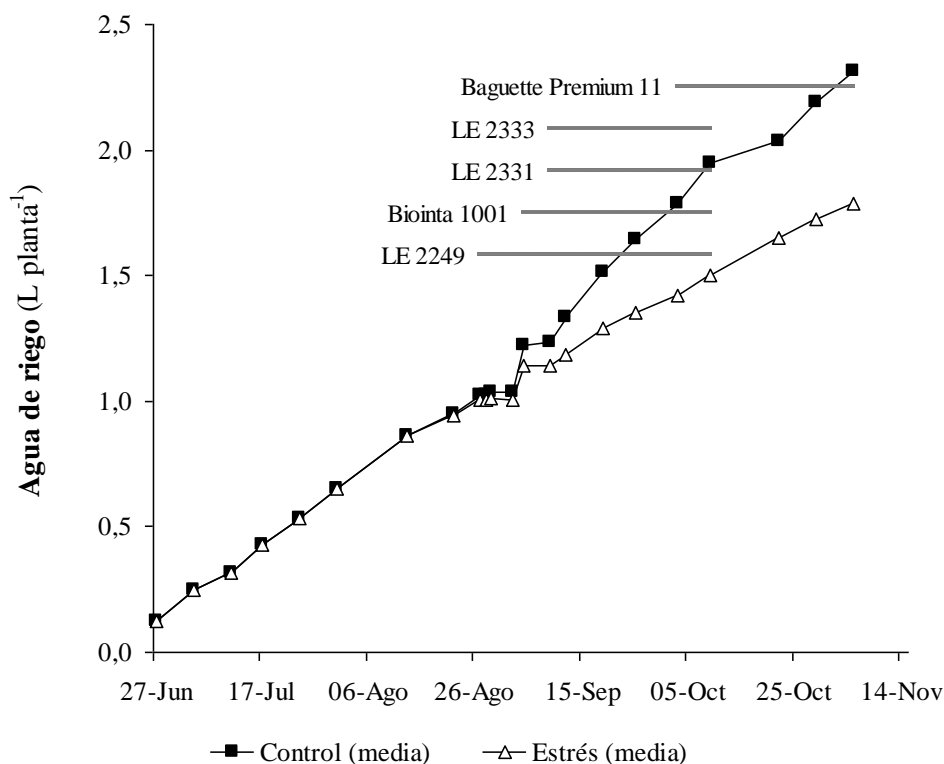


primer parámetro del modelo ( $b_0$ ) indica el CRA a antesis, momento en que se iniciaron los tratamientos de riego (Control y Estrés); el segundo parámetro ( $A$ ) indica la tasa de disminución lineal del CRA; y el tercer parámetro ( $k$ ) indica la disminución exponencial del CRA. Cuanto mayor es el estrés hídrico, mayores son los parámetros  $A$  y  $k$  respectivamente, mientras que mayor es la influencia de  $A$  respecto a  $k$  en la disminución del CRA. Y viceversa, a mayor bienestar hídrico, menor es la influencia de  $A$  respecto a  $k$ . Las diferencias entre tratamientos para los parámetros estimados por el modelo ajustado fueron identificadas con la prueba  $t$  de Welch-Satterthwaite.

Todos los resultados se analizaron con el procedimiento estadístico *PROC MIXED* utilizando el programa SAS<sup>®</sup> versión 9.2 (SAS Institute, Cary, Carolina del Norte, EE.UU). A su vez, los resultados de CRA fueron ajustados al modelo de Orskov y McDonald (1979) usando el programa InfoStat<sup>®</sup> versión 9.0 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la media acumulada de agua de riego se identifican diferencias significativas entre los tratamientos de Control y Estrés ( $P < 0,0001$ ) (Figura 2). También, se identifican diferencias entre cultivares y bloques ( $P < 0,0001$ , datos no mostrados). En cambio, no se identifica interacción entre cultivares y tratamientos de riego ( $P = 0,6049$ , dato mostrado), porque el tratamiento Estrés fue siempre regado al 50 % del Control. El tratamiento Control se regó con una media acumulada de 2 L planta<sup>-1</sup>, mientras que el tratamiento Estrés con 1,5 L planta<sup>-1</sup> (Figura 2). El riego acumulado de agua fue de 2,10, 1,79, 1,72, 1,70 y 1,66 L planta<sup>-1</sup>, para los cultivares Baguette Premium 11, LE 2331, Biointa 1001, LE 2333 y LE 2249, respectivamente (datos no mostrados).



**Figura 2.** Media acumulada de agua regada (L planta<sup>-1</sup>) entre la siembra y madurez fisiológica de cinco cultivares de trigo, según dos tratamientos de riego (Control y Estrés) aplicados durante el llenado de grano de cada cultivar (período señalado por líneas horizontales).

Esas diferencias entre cultivares se deben particularmente a Baguette Premium 11, que muestra un mayor uso de agua de riego ( $P < 0,05$ ) (Figura 2). Esto se relaciona a que este cultivar tuvo un largo de ciclo mayor (126 días) a madurez fisiológica en las condiciones del invernáculo. Por esta razón, el último riego a Baguette Premium 11 se le realizó el 5 de noviembre, mientras que a los otros cultivares se les realizó el 9 de octubre.

Cuatro de los cinco cultivares estudiados acortaron su largo de ciclo porque en el invernáculo estuvieron expuestos a mayores temperaturas y horas de luz que en condiciones de campo (Slafer, 2012). Sin embargo, Baguette Premium 11 no acortó su largo de ciclo, siendo similar al observado en experimentos de campo realizados en los años 2009 (137 días) y 2010 (123 días), en la misma localidad y fechas aproximadas de emergencia (Castro *et al.*, 2011, 2010). El hecho de que Baguette Premium 11 no acortara su ciclo en el invernáculo, es indicativo de su insensibilidad al fotoperíodo. Lo observado es coincidente con el reciente estudio de Gómez *et al.* (2014) y con las descripciones realizadas para este cultivar por el registro de INASE Argentina (2012b).

Por otro lado, en un ambiente donde la temperatura fue mayor a la del campo, el hecho de que Baguette Premium 11 no acortara su largo de ciclo, es indicativo también de que sería un cultivar con ciertos requerimientos de vernalización (Slafer 2012). Al respecto, ha sido reportado que Baguette Premium 11 tiene la combinación alélica *Vrn-A1b*, *vrn-B1* y *vrn-D1*, genes ortólogos del gen de vernalización *VRN-1* localizados en los cromosomas 5A, 5B y 5D respectivamente (Gómez *et al.* 2014, Kohli y Frascina 2009). Otros cultivares con la misma combinación alélica son descritos por Fu *et al.* (2005) como trigos de tipo primaveral. Esto es porque basta con que los alelos del gen *VRN-1* sean dominantes en uno de los tres genomas A, B o D en trigos hexaploides (Yan *et al.*, 2003) para que se expresen requerimientos de vernalización. No obstante, Miranda (2009) y Miralles (2006) definieron a Baguette Premium 11 como un trigo de tipo facultativo, al observar fenotípicamente que requiere de un número, aunque reducido, de horas de frío para inducir la floración.

Basado en los antecedentes reportados y a lo observado en el experimento, es probable que Baguette Premium 11 tenga una combinación invernal en el gen *VRN-*

2, gen éste que actúa epistáticamente como represor del gen *VRN-1* (Fu *et al.* 2005, Yan *et al.* 2003). Una combinación dominante de los genes *VRN-1* y *VRN-2* (primaveral e invernal respectivamente), sumado a su insensibilidad al fotoperíodo, habrían sido las causas de que Baguette Premium 11 tuviera en el experimento un largo de ciclo mayor al esperado.

Es importante destacar que este no fue un experimento donde se retiró el agua durante una etapa concreta, sino que el tratamiento Estrés fue siempre regado (50 % del tratamiento Control). Según las definiciones de Levitt (1980), en vegetales se ha estudiado más la resistencia a la tensión plástica, es decir la que provoca daño físico o cambio químico. De acuerdo a estas definiciones, este experimento en cambio se habría ajustado más al estudio de la resistencia de tipo elástica o reversible.

Los caracteres tallos planta<sup>-1</sup>, espigas planta<sup>-1</sup>, relación espigas tallos<sup>-1</sup>, granos espiga<sup>-1</sup> y granos planta<sup>-1</sup>, no se ven afectados por el tratamiento Estrés (Tabla 1). Esto es porque son componentes del rendimiento que se determinan antes de la anthesis (Kobata *et al.* 1992, Hochman 1982), momento en que comenzaron a aplicarse los tratamientos de riego. En cambio, los tres caracteres mencionados muestran diferencias estadísticamente significativas entre cultivares (Tabla 1).

Un mayor número de tallos planta<sup>-1</sup> se observa en Baguette Premium 11, mientras que un menor número se observa en LE 2249, Biointa 1001 y LE 2333 ( $P < 0,05$ ) (Figura 3A). En el experimento, la tasa de macollaje de los cultivares habría sido menor en relación con la observada en condiciones de cultivo a campo (Hoffman *et al.*, 2007). Esto porque las temperaturas en el invernáculo fueron superiores a los registros medios climáticos (datos no mostrados). Particularmente, el efecto de la temperatura sobre el macollaje ha sido observado en el cultivar LE 2333 (Hoffman *et al.*, 2007). En ese sentido, LE 2333 muestra el menor número de espigas planta<sup>-1</sup> y junto con Baguette Premium 11 también muestran la menor relación espigas tallos<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ ) (Figura 3B y C). Mientras que la menor relación espigas tallos<sup>-1</sup> de LE 2333 se debe a su menor número de espigas planta<sup>-1</sup>, en el cultivar Baguette Premium 11 se debe a su mayor número de tallos planta<sup>-1</sup> (Figura 3A, B y C).

La alta emisión de tallos de Baguette Premium 11, coincidente con lo observado por Hoffman *et al.* (2009, 2008), pudo también deberse a que los requerimien-

tos de vernalización de este cultivar no habrían sido completamente cubiertos, como se señaló anteriormente. De este modo, una fase vegetativa prolongada y una desincronización en la emisión de sus tallos, explicaría su menor relación espigas tallos<sup>-1</sup>, número de granos espiga<sup>-1</sup> y de granos planta<sup>-1</sup> (Figuras 3C, 4A y B).

**Tabla 1.** Análisis de varianza de dos tratamientos de riego (Control y Estrés) y cinco cultivares de trigo (Baguette Premium 11, Biointa 1001, LE 2249, LE 2331 y LE 2333). Se observan las medias mínimas cuadráticas por tratamientos de riego para tallos planta<sup>-1</sup> (TA PL<sup>-1</sup>), espigas planta<sup>-1</sup> (ES PL<sup>-1</sup>), relación espigas tallos<sup>-1</sup> (ES TA<sup>-1</sup>), granos espiga<sup>-1</sup> (GR ES<sup>-1</sup>), granos planta<sup>-1</sup> (GR PL<sup>-1</sup>), peso de grano (PG) y rendimiento planta<sup>-1</sup> (RE PL<sup>-1</sup>).

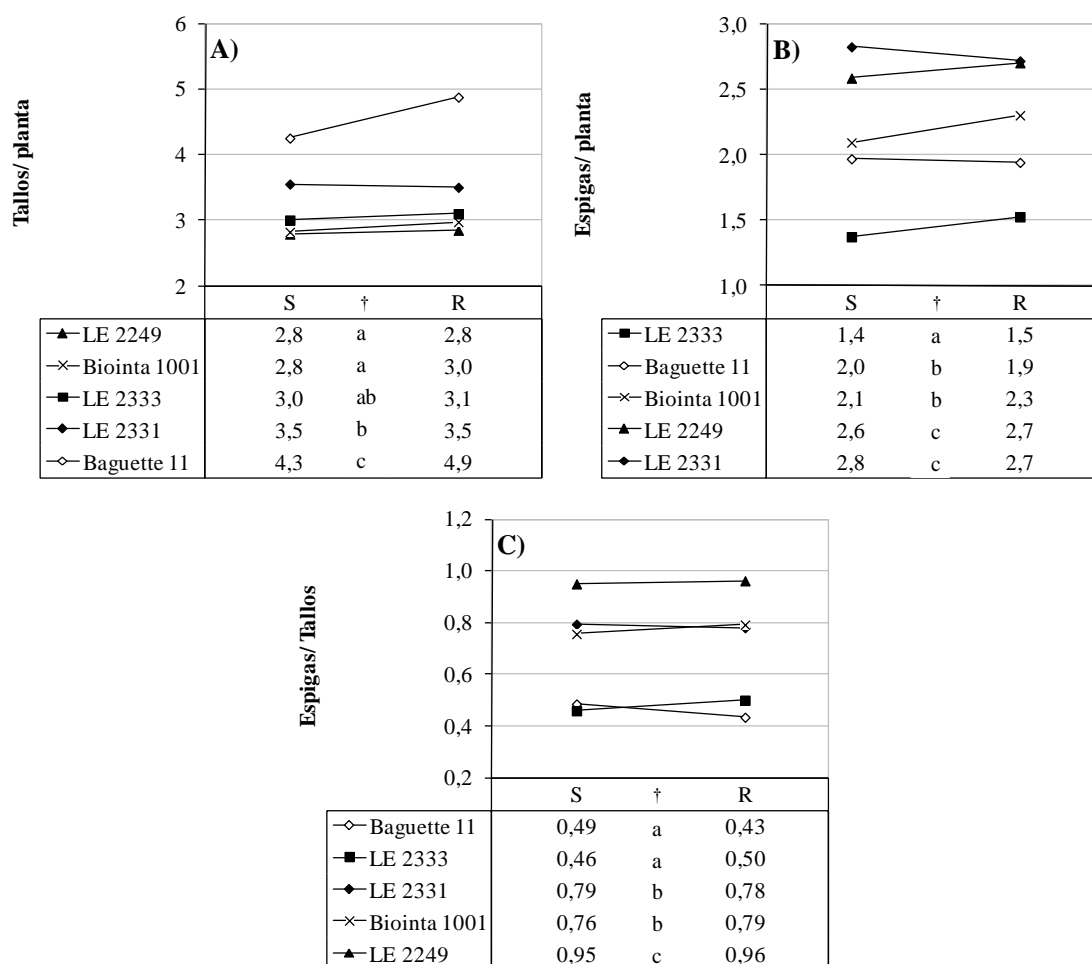
Fuente de var.	g.l.	<i>P &gt; F</i>						
		TA PL <sup>-1</sup>	ES PL <sup>-1</sup>	ES TA <sup>-1</sup>	GR ES <sup>-1</sup>	GR PL <sup>-1</sup>	PG	RE PL <sup>-1</sup>
Bloque	2	<b>0,0013</b>	<b>0,0063</b>	0,7166	0,4883	<b>0,0155</b>	0,2307	<b>0,0194</b>
Riego	1	0,1333	0,3628	0,8396	0,9095	0,3855	<b>0,0005</b>	<b>0,0093</b>
Cultivar	4	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0002</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0002</b>
Riego × Cultivar	4	0,3963	0,6390	0,6892	0,5472	0,7824	<b>0,0188</b>	0,3086

Tratamientos de riego	Medias mínimas cuadráticas							
						mg	g	
Control		3,5	2,2	0,69	30,3	67,0	41,0	2,7
Estrés		3,3	2,2	0,69	30,2	63,7	37,8	2,4

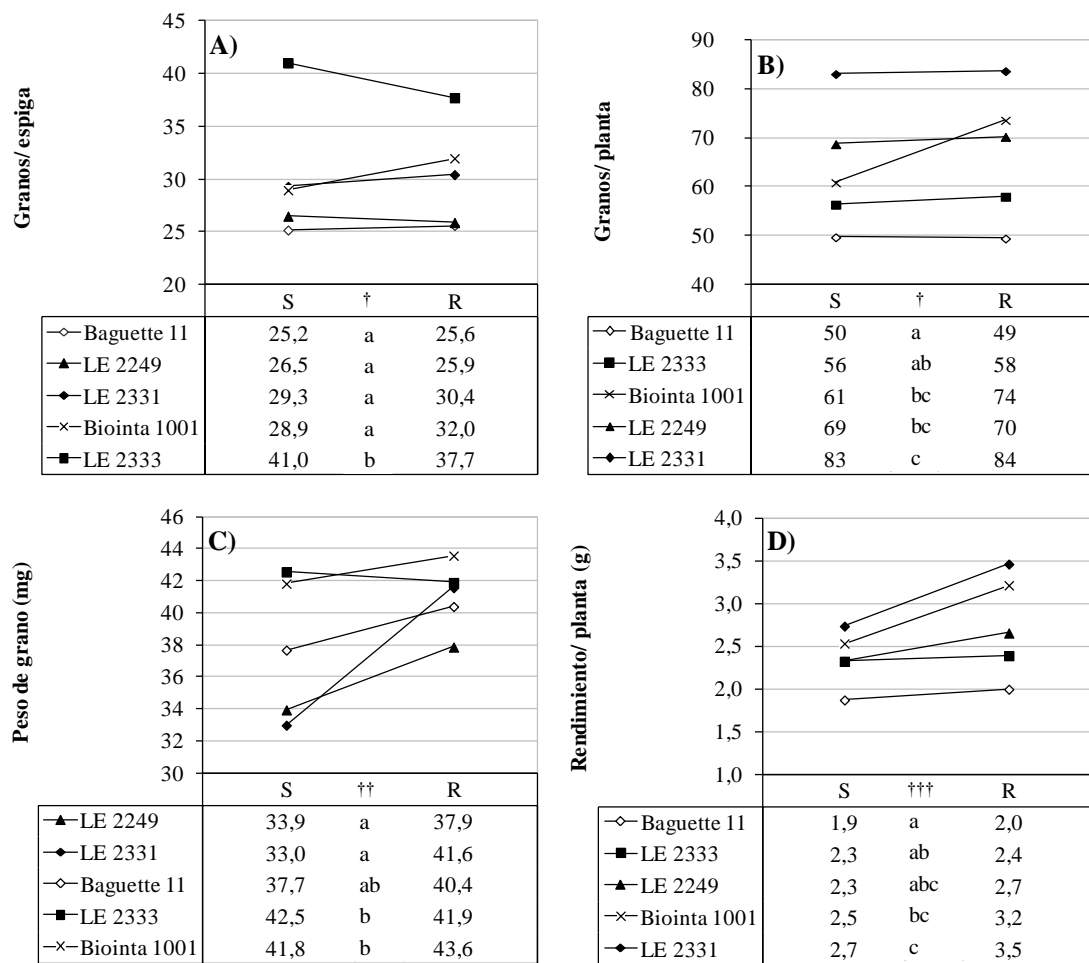
Respecto al componente de granos espiga<sup>-1</sup>, el número de espiguillas por espiga varía considerablemente por efectos de cultivar, fotoperíodo y vernalización (Halse y Weir, 1970). La iniciación floral de un cultivar tiene menor respuesta a la temperatura y el fotoperíodo cuanto mayor son sus requerimientos de vernalización, sobre todo si éstos no son cubiertos. Al respecto, Halse y Weir (1970) observaron menos espiguillas por espiga cuando las semillas de cultivares con requerimientos de vernalización no fueron vernalizadas. De este modo, las inferencias con los resultados de Baguette Premium 11 deberían realizarse teniendo en cuenta que relativo a los demás cultivares, su desarrollo en el invernáculo fue diferente de lo registrado por las eva-

luaciones de campo de Castro *et al.* (2012, 2011, 2010) y por las caracterizaciones de campo e invernáculo de Hoffman *et al.* (2009, 2008).



**Figura 3.** Medias de tratamientos de riego (S: Estrés y R: Control) de cinco cultivares de trigo para A) tallos planta<sup>-1</sup>, B) espigas planta<sup>-1</sup>, y C) relación espigas tallos<sup>-1</sup>. †Las letras minúsculas indican diferencias entre cultivares (media de S y R), identificadas por el test de Tukey–Kramer ( $P < 0,05$ ), datos desbalanceados.

Las mayores medias de espigas planta<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ ) se observan en los cultivares LE 2249 y LE 2331 (2,6 y 2,8 espigas planta<sup>-1</sup>, respectivamente). Mientras que el cultivar LE 2249 la obtiene porque muestra una mayor relación espigas tallos<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ ), LE 2331 la obtiene porque muestra un macollaje superior (Figura 3A y C), resultados también coincidentes con los de Hoffman *et al.* (2009, 2008, 2007).



**Figura 4.** Medias de tratamientos de riego (S: Estrés y R: Control) de cinco cultivares de trigo para A) granos espiga<sup>-1</sup>, B) granos planta<sup>-1</sup>, C) peso de grano, y D) rendimiento planta<sup>-1</sup>. Se identifican diferencias significativas entre: †cultivares, ††cultivares, tratamientos de riego e interacción cultivar por riego, y †††cultivares y tratamientos de riego. Las letras minúsculas indican diferencias entre cultivares (media de S y R), identificadas para A), por el test de Tukey–Kramer ( $P < 0,05$ ), datos desbalanceados; y para B), C) y D), por el test de Tukey ( $P < 0,05$ ), datos balanceados.

Si bien no se observan diferencias significativas en granos planta<sup>-1</sup> (Tabla 1), en el tratamiento Estrés el cultivar Biointa 1001 obtuvo 61 granos planta<sup>-1</sup>, mientras que en el tratamiento Control obtuvo 74 granos planta<sup>-1</sup> (Figura 4B). Esto es indicativo de que Biointa 1001 pudo haber tenido una menor sincronización en la emisión

de tallos fértiles, sugiriendo que las últimas espiguillas en florecer habrían abortado, considerando que el tratamiento Estrés comenzó a 50 % de plantas en antesis. Se ha reportado que en condiciones de altas temperaturas, si bien Biointa 1001 puede tener un inicio temprano de su macollaje, posteriormente se de-sincroniza generando dos estratos de espigas (Hoffman *et al.* (2008, 2007).

En peso de grano y rendimiento planta<sup>-1</sup> se observan diferencias significativas entre cultivares ( $P < 0,0001$  y  $P = 0,0002$ , respectivamente) (Tabla 1). A su vez, ambos caracteres se muestran significativamente afectados por el tratamiento Estrés ( $P = 0,0005$  y  $P = 0,0093$ , respectivamente). Mientras para peso de grano se observa una interacción significativa entre cultivares y tratamientos de riego ( $P = 0,0188$ ), no se observa un efecto significativo para rendimiento planta<sup>-1</sup> ( $P = 0,3086$ ).

La ausencia de interacción entre cultivares y tratamientos de riego para rendimiento planta<sup>-1</sup>, es indicativo de que la disminución de rendimiento atribuible a peso de grano se compensó por los componentes de rendimiento que se definieron antes del inicio del tratamiento Estrés (*i.e.*, espigas planta<sup>-1</sup> y granos espiga<sup>-1</sup>). En ese sentido, se observa que los cultivares con mayor número de granos planta<sup>-1</sup> tienen un menor peso de grano y una mayor disminución del peso por efecto del tratamiento Estrés (Figura 4B y C). También, las diferencias de peso de grano entre cultivares son mayores en el tratamiento Estrés que en el tratamiento Control (Figura 4C). De este modo, cultivares resistentes a un déficit hídrico moderado después de la antesis, podrían difícilmente identificarse si solo se estudia el rendimiento, siendo por lo menos también recomendado estudiar el peso de grano.

El mayor rendimiento planta<sup>-1</sup> en las condiciones del invernáculo se observa en los cultivares LE 2331, Biointa 1001 y LE 2249 ( $P < 0,05$ ) (Figura 4D). También en LE 2249 y LE 2331, se observa una disminución significativa del peso de grano, 10,4 % ( $P = 0,0361$ ) y 20,7 % ( $P = 0,0001$ ), respectivamente (Tabla 2). Si bien la disminución del rendimiento planta<sup>-1</sup> de Biointa 1001 (21,2 %,  $P = 0,0284$ ) es similar a la de LE 2331 (21,0 %,  $P = 0,0206$ ) (Figura 4D), no se observa una disminución del peso de grano de Biointa 1001 ( $P = 0,3262$ ). Por lo tanto, la disminución del rendimiento planta<sup>-1</sup> de Biointa 1001 podría explicarse por una disminución no significativa de todos sus componentes de rendimiento (Figura 4). En tanto, los rendimiento planta<sup>-1</sup>



de LE 2249, Baguette Premium 11 y LE 2333 se ven disminuidos un 12,5 % ( $P=0,2616$ ), 6,3 % ( $P=0,6657$ ) y -0,1 % ( $P=0,9913$ ), respectivamente (Figura 4D).

**Tabla 2.** Contrastes para peso de grano e índice de cosecha sobre la biomasa aérea de la interacción entre dos tratamientos de riego y cinco cultivares de trigo. Las diferencias estimadas entre los tratamientos de riego [ $\Delta$  (Estrés – Control)], se expresan en mg y como porcentaje de disminución respecto al Control.

Cultivar	Peso de grano			Índice de cosecha		
	$\Delta$ (Estrés – Control)		$P >  t $	$\Delta$ (Estrés – Control)		$P >  t $
	mg	% del Control		mg	% del Control	
Baguette Premium 11	-2,72	-6,7	0,1337	0,01494	5,1	0,3238
Biointa 1001	-1,75	-4,0	0,3262	-0,01963	-4,0	0,1992
LE 2249	-3,92	-10,4	<b>0,0361</b>	-0,01399	-2,9	0,3547
LE 2331	-8,59	-20,7	<b>0,0001</b>	-0,04874	-10,1	<b>0,0039</b>
LE 2333	0,66	1,6	0,7063	0,01212	2,6	0,4212

Como en Biointa 1001, no se observa una disminución del peso de grano de los cultivares Baguette Premium 11 y LE 2333 por efecto del tratamiento Estrés (Tabla 2), probablemente porque ambos cultivares mostraron las menores medias de cultivar para granos planta<sup>-1</sup> y rendimiento planta<sup>-1</sup> ( $P<0,05$ ) (Figura 4B y D). Sin embargo, ambos cultivares se diferencian en sus medias de cultivar, 2,0 y 1,5 espigas planta<sup>-1</sup> y 25,4 y 39,4 granos espiga<sup>-1</sup>, respectivamente ( $P<0,05$ ) (Figuras 3B y 4A).

En un experimento realizado en similares condiciones de crecimiento en invernáculo, resultados coincidentes se observaron cuando se estudiaron los efectos de un déficit hídrico durante el llenado de grano de siete cultivares de trigo, dos de ellos Biointa 1001 y LE 2249 (Castro y Vázquez, 2010). El cultivar Biointa 1001 mostró susceptibilidad al déficit hídrico, mientras que LE 2249 mostró una resistencia moderada. A su vez, para peso de grano la interacción entre cultivares y tratamientos de riego también fue significativa. Sin embargo, a diferencia del presente estudio, en ese experimento los granos planta<sup>-1</sup> fueron significativamente afectados. Una diferencia importante fue que en dicho experimento el riego fue detenido en dos oportunidades

durante el periodo de llenado de grano. Por lo tanto, parece ser que un estrés más severo afectaría principalmente a los granos planta<sup>-1</sup>, mientras que un estrés moderado afectaría principalmente al peso de grano.

Los experimentos en invernáculo donde se estudian los efectos del estrés por déficit hídrico y su interacción con los cultivares, tienen como ventajas que permiten homogeneizar tratamientos, evitan eventos meteorológicos, minimizan fluctuaciones del ambiente y mejoran el confort para realizar las mediciones. Como desventaja, se señala el cuidado que debe tenerse al realizar inferencias cuando se intenta extrapolar resultados a condiciones de campo, en gran medida debido al uso de distintos tipos de contenedores en vez del propio suelo (Passioura, 2006, 1977). En este sentido, observando el rendimiento planta<sup>-1</sup> de LE 2333 podría inferirse que se trata de un cultivar resistente al estrés por déficit hídrico. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el macollaje que muestra este cultivar en el invernáculo, no fue el que podría esperarse en condiciones de campo (Hoffman *et al.*, 2007); y que el riego que se realizó fue según el requerimiento promedio de los cinco cultivares. Por lo tanto, con el volumen dado de agua con que se regó el experimento, los cultivares de mayor biomasa total planta<sup>-1</sup> sufrieron un estrés mayor que LE 2333.

Para biomasa aérea planta<sup>-1</sup> y biomasa total planta<sup>-1</sup> se observa una disminución significativa a causa del tratamiento Estrés, 11,0 % ( $P=0,0045$ ) y 11,4 % ( $P=0,0058$ ), respectivamente (Tabla 3). También, para ambos caracteres se observan diferencias significativas entre cultivares ( $P=0,0004$  y  $P=0,0001$ , respectivamente). Sin embargo, no se observa interacción entre cultivares y tratamientos de riego ( $P=0,6067$  y  $P=0,5391$ , respectivamente). Los cultivares LE 2333, LE 2249 y Biointa 1001 muestran los menores valores de biomasa aérea planta<sup>-1</sup> y de biomasa total planta<sup>-1</sup> ( $P<0,05$ ) (Figura 5A y C). En tanto que LE 2331 es un cultivar que muestra una alta producción de biomasa aérea planta<sup>-1</sup>, pero que también realizó una utilización más rápida del agua regada en las bandejas. De este modo, el cultivar LE 2331 no pudo mantener el status hídrico por efecto del tratamiento Estrés y en relación con ello, es que muestra una mayor disminución del peso de grano (Figura 4C, Tabla 2).

**Tabla 3.** Análisis de varianza de dos tratamientos de riego (Control y Estrés) y cinco cultivares de trigo (Baguette Premium 11, Biointa 1001, LE 2249, LE 2331 y LE 2333). Se observan las medias mínimas cuadráticas por tratamientos de riego para materia seca de biomasa aérea planta<sup>-1</sup> (BA PL<sup>-1</sup>), radicular planta<sup>-1</sup> (BR PL<sup>-1</sup>) y total planta<sup>-1</sup> (BT PL<sup>-1</sup>), largo de raíces (LRAIZ), relación biomasa radicular biomasa aérea<sup>-1</sup> (BR BA<sup>-1</sup>), e índices de cosecha sobre biomasa aérea (IC) y total (ICT).

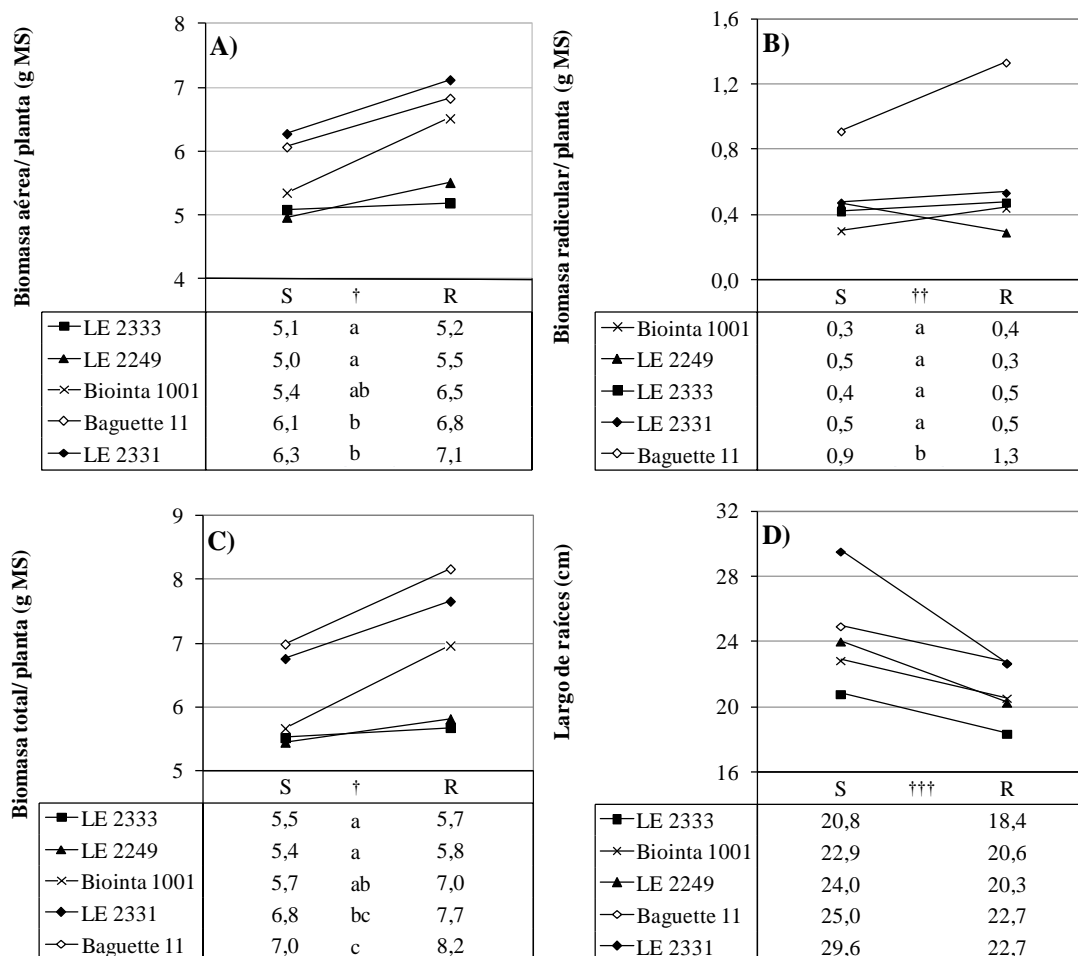
Fuente de var.	g.l.	<i>P &gt; F</i>						
		BA PL <sup>-1</sup>	BR PL <sup>-1</sup>	BT PL <sup>-1</sup>	LRAIZ	BR BA <sup>-1</sup>	IC	ICT
Bloque	2	<b>0,0006</b>	<b>0,0167</b>	<b>0,0003</b>	0,2430	0,1040	0,3575	0,1084
Riego	1	<b>0,0045</b>	0,2833	<b>0,0058</b>	<b>0,0230</b>	0,8573	0,1104	0,1416
Cultivar	4	<b>0,0004</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0001</b>	0,0905	<b>0,0006</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Riego × Cultivar	4	0,6067	0,3689	0,5391	0,8152	0,4165	<b>0,0405</b>	0,0567

Tratamientos de riego	Medias mínimas cuadráticas						
	g			cm			
Control	6,2	0,6	6,9	20,9	0,094	0,442	0,408
Estrés	5,6	0,5	6,1	24,5	0,092	0,431	0,396

En los cinco cultivares se realizó una clasificación visual del efecto que el tratamiento Estrés tuvo en adelantar la senescencia de las hojas; se observaron tonalidades de rojizo verdoso, a rojizo y amarillo. La senescencia es un proceso que involucra la movilización de recursos de la fuente a la fosa cuando es inducida por factores hormonales relacionados con la edad, o prematuramente, por factores ambientales tales como la sequía y la alta temperatura (Verma *et al.* 2004, Chandlee 2001).

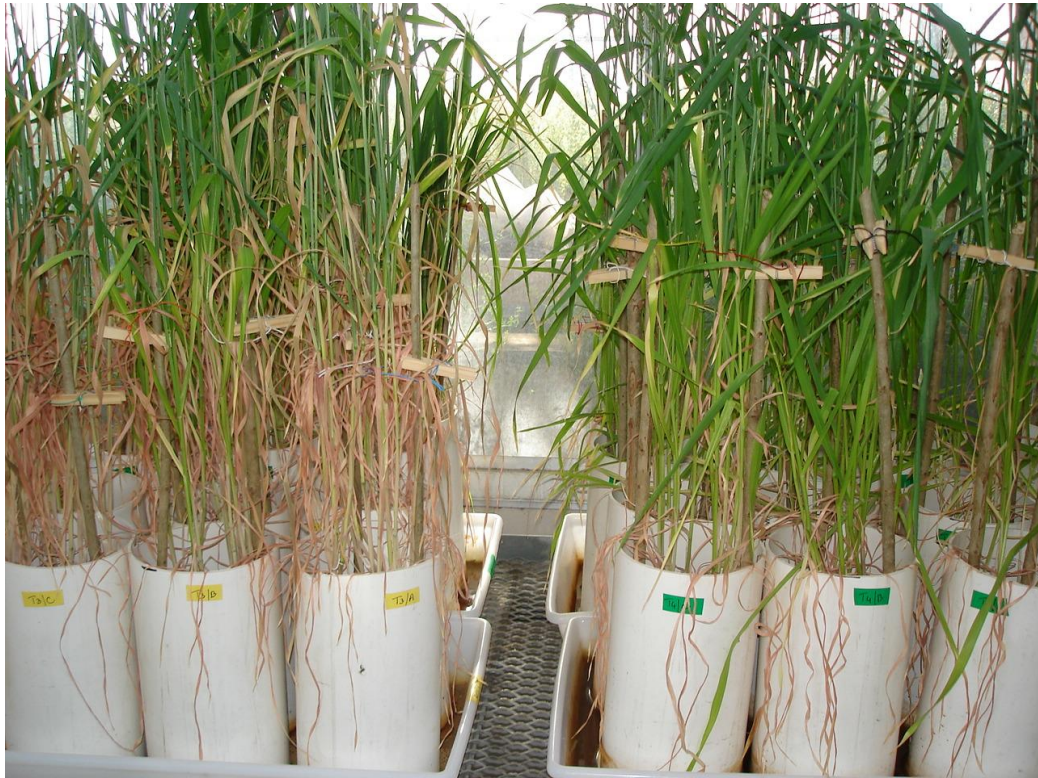
En las hojas inferiores de Biointa 1001 y principalmente de LE 2331, se observó una temprana senescencia mostrada por tonalidades rojizo verdoso, la cual pudo haber limitado la capacidad de fuente de estos dos cultivares durante el periodo de estrés. La senescencia en las hojas inferiores de LE 2331 comenzó a 21 días de iniciado el tratamiento Estrés, aún cuando restaban entre 23 y 25 días para la madurez fisiológica (Figura 6).



**Figura 5.** Medias de tratamientos de riego (S: Estrés y R: Control) de cinco cultivares de trigo para A) biomasa aérea planta<sup>-1</sup>, B) biomasa radicular planta<sup>-1</sup>, C) biomasa total planta<sup>-1</sup>, y D) largo de raíces. Se identifican diferencias significativas entre: †cultivares y tratamientos de riego, ††cultivares, y †††tratamientos de riego. Las letras minúsculas indican diferencias entre cultivares (media de S y R), identificadas por el test de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A diferencia de los cultivares LE 2331 y Biointa 1001 (hojas rojizo verdosas), el cultivar LE 2249 presentó hojas rojizas. A su vez, en algunas de las espigas de LE 2249 se observó que las plantas adelantaron su ciclo a madurez fisiológica respecto a las plantas del tratamiento Control. Por otro lado, LE 2333 y Baguette Premium 11, éste último de hojas erectas, cortas, finas y de color verde oscuro, fueron los cultivares donde las diferencias entre los tratamientos de riego fueron menos visibles. In-

cluso, en ambos cultivares se observó que cuando alcanzaron la madurez fisiológica, sus hojas bandera todavía permanecían de color verde amarillo.

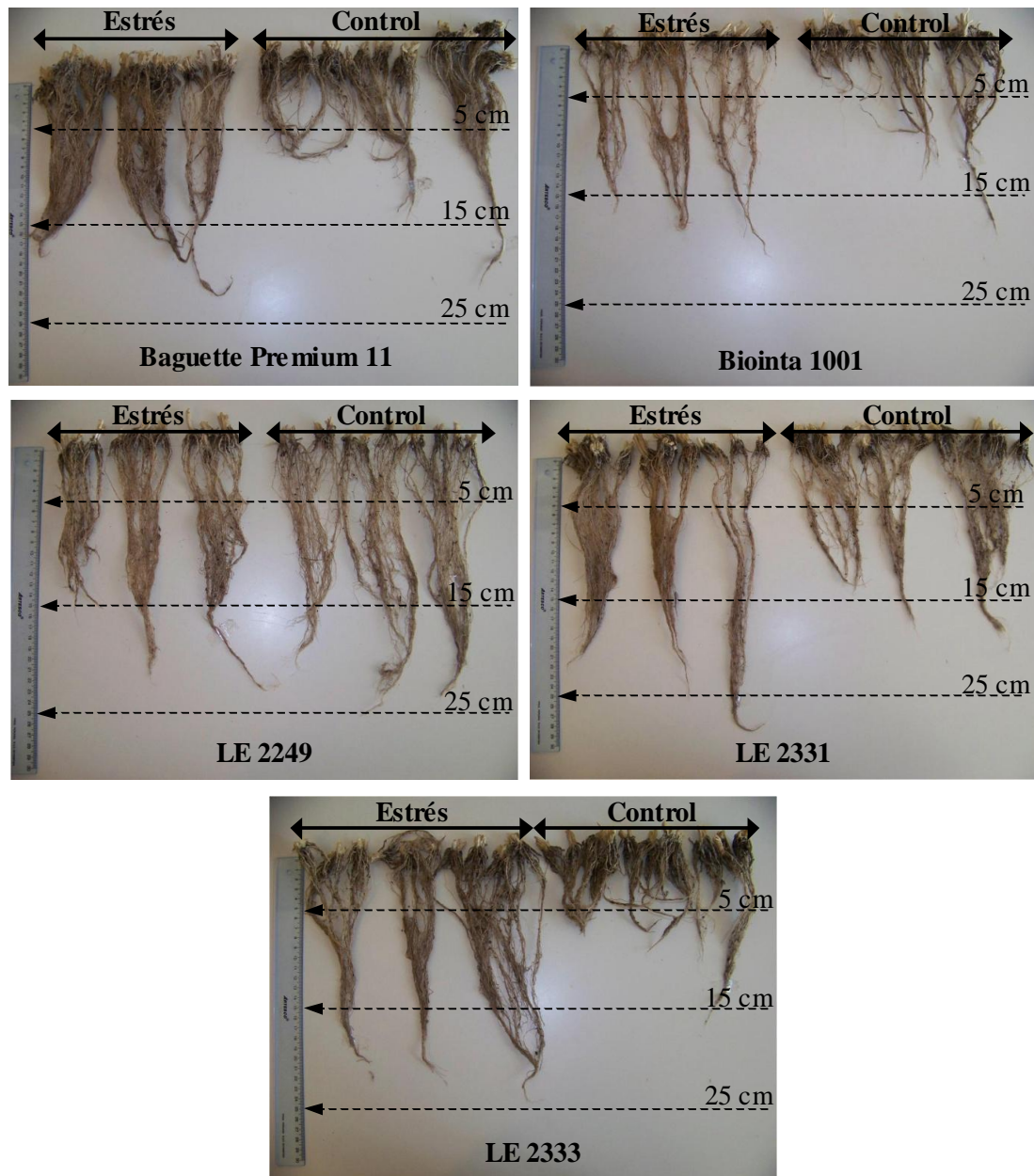


**Figura 6.** Efectos visuales de estrés por déficit hídrico en el cultivar de trigo LE 2331, en el día 21 pos 50 % de plantas en anthesis y de iniciados los tratamientos de riego, Control (derecha) y Estrés (izquierda).

Otros efectos observados pero no medidos fueron: enrollamiento de las hojas, reversible luego de cada riego; marchitamiento de las espigas, denotado por coloraciones verdosas; deformación de las aristas; y granos chicos y deformes y o faltantes en el extremo superior de las espigas.

El tratamiento Estrés provocó un cambio en el hábito de crecimiento de las raíces, observándose un adelgazamiento visual y un incremento significativo en el largo de raíces ( $P=0,0230$ ) (Tabla 3, Figura 7). En cambio, no se observan diferencias significativas de biomasa radicular planta<sup>-1</sup> ( $P=0,2833$ ). Inversamente, no se observan diferencias entre cultivares para largo de raíces ( $P=0,0905$ ), pero sí se observan diferencias significativas en la biomasa radicular planta<sup>-1</sup> ( $P=0,0002$ ). Esas diferencias

entre cultivares se explican únicamente por un mayor peso de las raíces de Baguette Premium 11 ( $P<0,05$ ) (Figura 5B).



**Figura 7.** Biomasa radicular a cosecha de cinco cultivares de trigo (Baguette Premium 11, Biointa 1001, LE 2249, LE 2331 y LE 2333) sometidos a dos tratamientos de riego (Control y Estrés) desde 50 % de plantas en antesis. Se escogieron las raíces de mayor longitud de tres de las seis macetas del bloque 3 (cuatro plantas por maceta).

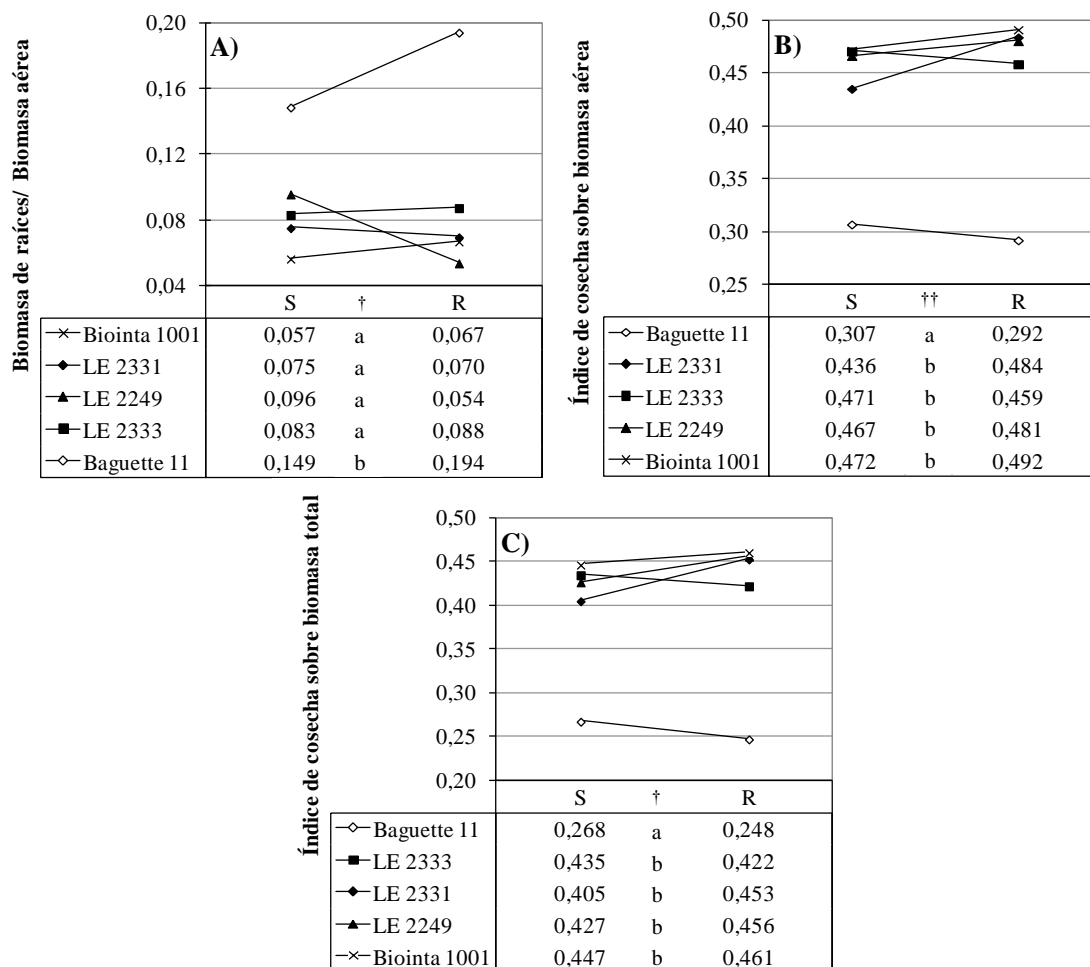


En el largo de raíces se observa un aumento de 20,9 a 24,5 cm por efecto del tratamiento Estrés (Tabla 3, Figuras 5D y 7). Estos resultados concuerdan con los de Sharp *et al.* (1988), quienes estudiaron el efecto del déficit hídrico en el hábito de crecimiento radicular de plántulas de maíz, y más recientemente con los de Manschadi *et al.* (2006), quienes estudiaron la modificación de la arquitectura radicular de plantas de trigo y cebada en la etapa pos antesis. De acuerdo con Blum (2005), los cambios en el crecimiento radicular en trigo por efecto del estrés por déficit hídrico fueron morfológicos y no de incremento de biomasa.

En la relación  $BR BA^{-1}$  no se observa un efecto del tratamiento Estrés ( $P=0,8573$ ) (Tabla 3). Es decir que el tratamiento Estrés provocó un cambio en el hábito de crecimiento de las raíces, pero no un cambio en la partición de los fotosintatos entre la parte radicular y la parte aérea. En cambio, se observan diferencias significativas entre cultivares ( $P=0,0006$ ), aunque solo debidas por una mayor relación  $BR BA^{-1}$  del cultivar Baguette Premium 11 ( $P<0,05$ ) (Figura 8A). No se identifica interacción entre cultivares y tratamientos de riego ( $P=0,4165$ ).

Para IC e ICT se observan diferencias significativas entre cultivares ( $P<0,0001$ , respectivamente). La interacción entre cultivares y tratamientos de riego es significativa para IC ( $P=0,0405$ ) pero no para ICT ( $P=0,0567$ ). Como con biomasa radicular planta<sup>-1</sup> y la relación  $BR BA^{-1}$ , las diferencias entre cultivares solo se deben a Baguette Premium 11, al éste mostrar los menores IC e ICT ( $P<0,05$ ) (Figuras 5B y 8). A diferencia de los otros cultivares que muestran una alta partición de fotosintatos al grano, Baguette Premium 11 muestra una mayor partición a tallos, hojas y raíces, debido probablemente a su bajo número de granos planta<sup>-1</sup>.

El cultivar LE 2331 muestra una disminución de su IC de 10,1 % ( $P=0,0039$ ), siendo el único afectado por el tratamiento Estrés (Tabla 2, Figura 8B). En cambio, no se observa una disminución en el IC de Biointa 1001 ( $P=0,1992$ ), a pesar de que su rendimiento planta<sup>-1</sup> y biomasa aérea planta<sup>-1</sup> no se diferencian de las de LE 2331 ( $P<0,05$ ) (Tabla 2, Figuras 4D, 5A y 8B). Esto se explica porque el tratamiento Estrés provocó una mayor disminución de la biomasa aérea planta<sup>-1</sup> de Biointa 1001 (17,9 %,  $P=0,0239$ ) que la de LE 2331 (11,9 %,  $P=0,0905$ ) (Figura 5A).



**Figura 8.** Medias de tratamientos de riego (S: Estrés y R: Control) de cinco cultivares de trigo para A) relación biomasa de raíces biomasa aérea<sup>-1</sup>, B) índice de cosecha sobre biomasa aérea, y C) índice de cosecha sobre biomasa total. Se identifican diferencias significativas entre: †cultivares, y ††cultivares e interacción cultivar por riego. Las letras minúsculas indican diferencias entre cultivares (media de S y R), identificadas por el test de Tukey ( $P < 0,05$ ).

La  $EUA_{REND}$  y la  $EUA_{BA}$  aumentan significativamente por efecto del tratamiento Estrés ( $P = 0,0017$  y  $P < 0,0001$ , respectivamente) (Tabla 4). El aumento es menor en la  $EUA_{REND}$  que en la  $EUA_{BA}$ , 13,8 y 17,1 % respectivamente. A su vez, también se identifican diferencias significativas entre cultivares para ambos caracteres,  $EUA_{REND}$  ( $P < 0,0001$ ) y  $EUA_{BA}$  ( $P = 0,0010$ ). En cambio, no se identifica interac-



ción entre cultivares y tratamientos de riego ( $P=0,3564$  y  $P=0,7871$ , respectivamente).

**Tabla 4.** Análisis de varianza de dos tratamientos de riego (Control y Estrés) y cinco cultivares de trigo (Baguette Premium 11, Biointa 1001, LE 2249, LE 2331 y LE 2333). Se observan las medias mínimas cuadráticas por tratamientos de riego para eficiencia de uso del agua de riego del rendimiento ( $EUA_{REND}$ ) y de la biomasa aérea ( $EUA_{BA}$ ), y para tres caracteres de aptitud industrial, proteína en el grano (base húmeda 13,5 %), altura de mixograma (HMX) y tiempo de mezclado (TMZ).

Fuente de var.	g.l.	$P > F$				
		$EUA_{REND}$	$EUA_{BA}$	Proteína	HMX	TMZ
Bloque	2	0,7822	0,8628	0,9222	0,3635	0,9645
Riego	1	<b>0,0017</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,0614	0,0674	<b>0,0462</b>
Cultivar	4	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0010</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0186</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Riego × Cultivar	4	0,3564	0,7871	0,1782	0,1406	0,2762

Tratamientos de riego	Medias mínimas cuadráticas				
	$g L^{-1}$	$g L^{-1}$	%	cm	min
Control	1,37	3,08	14,1	4,3	5,2
Estrés	1,56	3,60	14,6	4,5	4,9

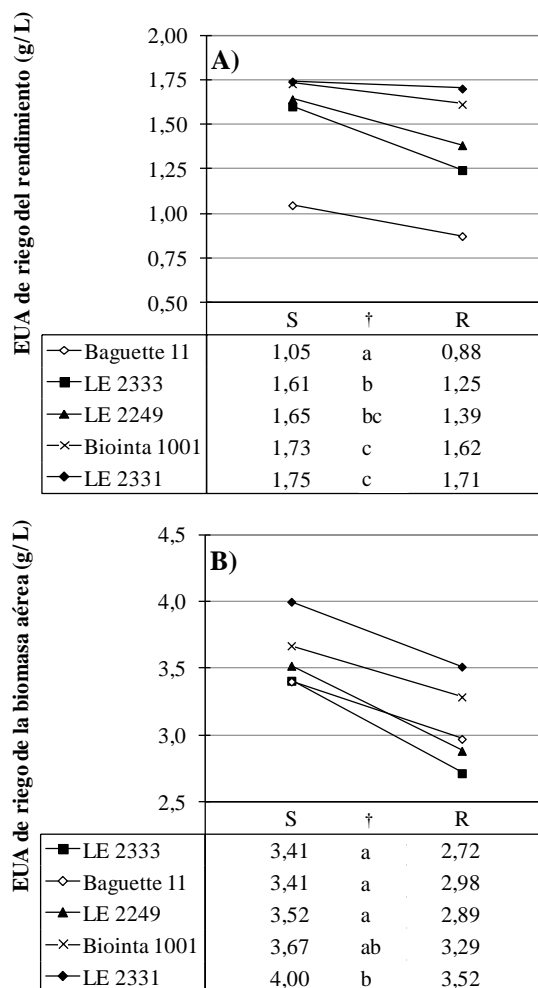
La EUA intrínseca se calcula como la relación entre la tasa instantánea de fotosíntesis neta y la tasa instantánea de  $T$  (Condon *et al.*, 2002). En términos de producción, la EUA también se expresa como rendimiento sobre volumen de agua transpirada. De este modo, debido a que el agua transpirada no fue discriminada del agua evaporada de las bandejas y de la parte superior de las macetas, los valores de EUA se expresan como eficiencia de uso de agua de riego del rendimiento y de la biomasa aérea ( $EUA_{REND}$  y  $EUA_{BA}$ , respectivamente). Aún así, la evaporación de las macetas fue reducida por el encostrado de la parte superior del sustrato; esto debido a que se regó en las bandejas y no en las macetas. Respecto a la evaporación del agua libre de las bandejas, la misma fue superior en la medida que la tasa de consumo de agua de los cultivares fue menor.

Como con rendimiento planta<sup>-1</sup>, las mayores EUA<sub>REND</sub> se observan en los cultivares LE 2331, Biointa 1001 y LE 2249 ( $P<0,05$ ) (Figuras 4D y 9A). También, mayores EUA<sub>BA</sub> se observan en LE 2331 y Biointa 1001 ( $P<0,05$ ), pero no en LE 2249 que muestra una menor EUA<sub>BA</sub> junto con los cultivares Baguette Premium 11 y LE 2333 ( $P<0,05$ ) (Figura 9B). Particularmente, relativo a la brecha de EUA<sub>BA</sub> (Control vs. Estrés) y comparado con los otros cultivares, LE 2331 muestra una brecha menor de EUA<sub>REND</sub> entre ambos tratamientos de riego (Figura 10). Esto se relaciona con el efecto del tratamiento Estrés, esto es que LE 2331 muestra una mayor disminución de su rendimiento planta<sup>-1</sup> que de su biomasa aérea planta<sup>-1</sup>. A su vez, esto pudo haberse relacionado a una menor reducción de la tasa de  $T$  de LE 2331, sostenida por un alargamiento de 30,3 % ( $P=0,0438$ ) de sus raíces a causa del tratamiento Estrés (Figura 5D).

La comparación de Baguette Premium 11 con los otros cultivares es conveniente realizarla con la EUA<sub>BA</sub> y no con la EUA<sub>REND</sub>. Esto debido a que sus requerimientos de vernalización no habrían sido completamente cubiertos en las condiciones del invernáculo. Es decir que su bajo rendimiento planta<sup>-1</sup> también se relaciona a su menor EUA<sub>REND</sub> ( $P<0,05$ ) (Figuras 4D y 9A). Por otra parte, la menor EUA<sub>BA</sub> de Baguette Premium 11, aunque estadísticamente solo diferente de LE 2331 ( $P<0,05$ ) (Figura 9B), se relaciona con que es el cultivar que realizó un mayor uso de agua ( $P<0,05$ ) (Figuras 2 y 10). Esto dado su mayor largo de ciclo y que junto con LE 2331 son los cultivares de mayor biomasa total planta<sup>-1</sup> (Figura 5C).

Un cultivar de alta EUA no necesariamente también presenta resistencia a estrés por déficit hídrico (Blum, 2009). Esto es porque una alta EUA puede deberse a un alto potencial de rendimiento con un consumo moderado de agua, o que lo sea por un moderado potencial de rendimiento con un discreto consumo de agua. Al respecto, el agua regada como indicador de uso de agua (*i.e.*,  $T$ ), indica que LE 2331 y Biointa 1001 son cultivares de alta EUA pero a coste de un alto uso de agua (Figuras 9 y 10). De este modo, si bien en LE 2331 y Biointa 1001 se muestran como los cultivares de mayor rendimiento planta<sup>-1</sup> y mayor EUA, no se muestran resistentes al estrés por déficit hídrico. Por último, un cultivar de alta EUA no necesariamente

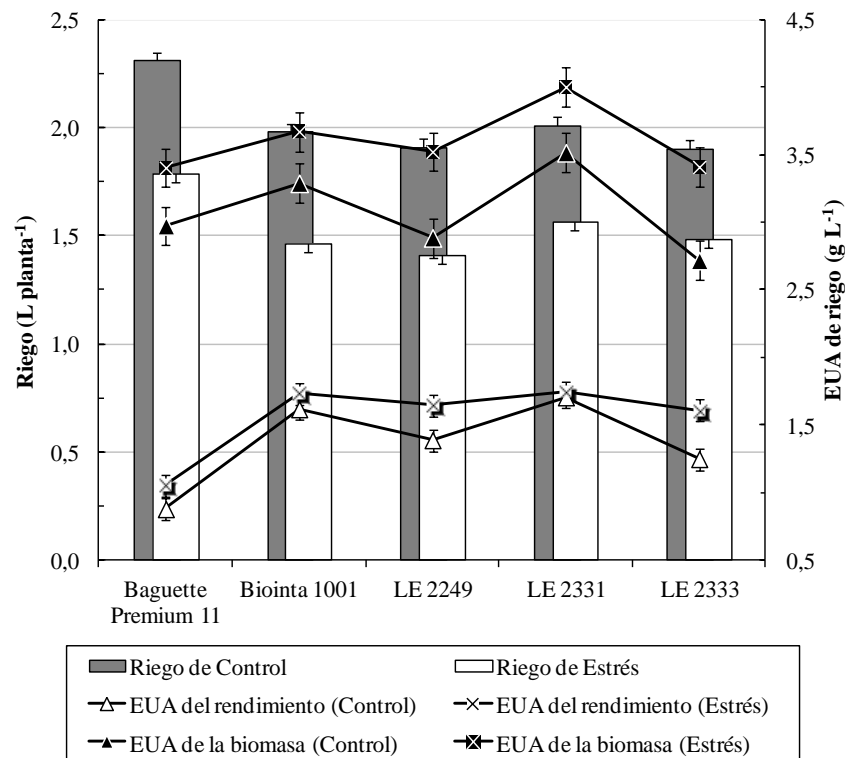
también presente resistencia a estrés por déficit hídrico, pero sí es más resistente cuanto mayor sea la brecha de EUA entre los tratamientos de riego (Figura 10).



**Figura 9.** Medias de tratamientos de riego (S: Estrés y R: Control) y cinco cultivares de trigo para A) eficiencia de uso de agua (EUA) de riego del rendimiento y B) EUA de la biomasa aérea. †Se identifican diferencias significativas entre cultivares y tratamientos de riego. Las letras minúsculas indican diferencias entre cultivares (media de S y R), identificadas por el test de Tukey ( $P<0,05$ ).

En cuanto a aptitud industrial del grano, por efecto del tratamiento Estrés se observa un incremento no significativo del porcentaje de proteínas en el grano y de la altura de mixograma ( $P=0,0614$  y  $P=0,0674$  respectivamente) (Tabla 4). En cambio, en el tiempo de mezclado se observa una disminución estadísticamente significativa

( $P=0,0462$ ). En los tres parámetros mencionados no se observan interacciones entre cultivares y tratamientos de riego pero sí se observan diferencias estadísticamente significativas entre cultivares (Tabla 4).



**Figura 10.** Eficiencias de uso de agua (EUAs) de riego de cinco cultivares de trigo según se aplicaron dos tratamientos de riego (Control y Estrés). Las EUAs de riego (líneas) se expresan en rendimiento y biomasa aérea según cada tratamiento de riego. Las barras verticales indican los errores estándar ( $n=3$ ).

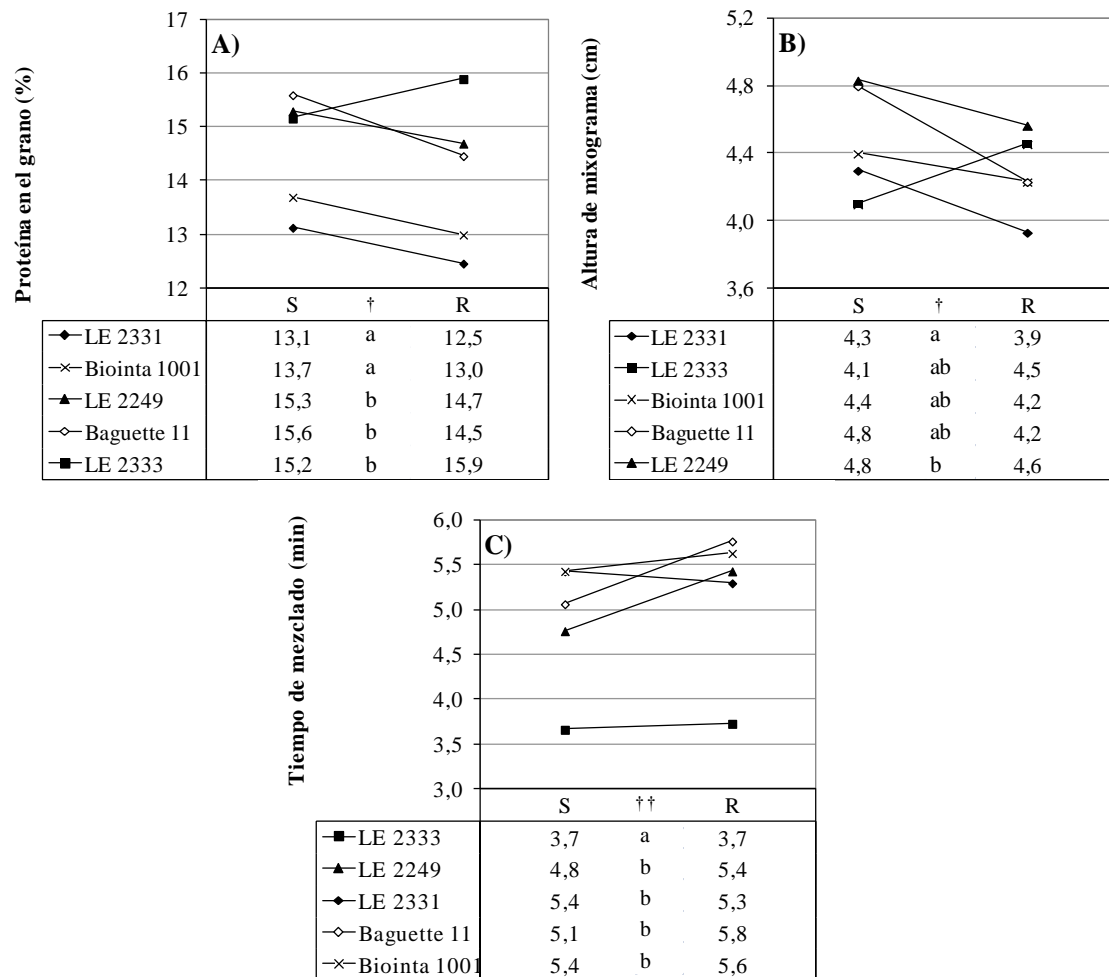
El incremento no significativo de la proteína en el grano es coincidente con los resultados de Ozturk y Aidin (2004), quienes argumentaron que el estrés por déficit hídrico reduce la tasa de deposición de nitrógeno más lentamente que la tasa de deposición de carbohidratos. El incremento no significativo de la proteína en el grano se relaciona al incremento no significativo de la altura de mixograma, un indicador de la máxima consistencia lograda por la masa. Coincidiendo con Vázquez (2009), una tendencia a mayor porcentaje de proteína habría provocado una mayor absorción de agua de la harina.

La modificación del tiempo de mezclado de 5,2 a 4,9 minutos por efecto del tratamiento Estrés (Tabla 4), podría también deberse a la interacción con la modificación no significativa del porcentaje de proteína en el grano. Al respecto, Finney y Shogren citados por Hosenev (1985), sostuvieron que porcentajes de proteína de una harina menores a 12 % pueden aumentar el tiempo de mezclado. Por otro lado, Shewry (2007) sostuvo que la aptitud industrial de la harina es influenciada por su contenido de proteína, pero también por la composición y estructura física de los polímeros de esa proteína. Si bien estas últimas características no fueron estudiadas en el experimento, su posible modificación también podría estar explicando la disminución del tiempo de mezclado. En el mismo sentido, Saint Pierre *et al.* (2008), Tribouï *et al.* (2003) y Panozzo *et al.* (2001) sostienen que el estrés por déficit hídrico pos anthesis aumenta el porcentaje de proteína en el grano, pero disminuye su deposición total y también, la relación de gluteninas a gliadinas. De este modo, si bien por efecto del tratamiento Estrés la proteína en el grano y la altura de mixograma muestran un incremento no significativo que podrían mejorar la aptitud de la harina para la elaboración de panificados de leudado, a la vez se muestra una disminución significativa del rendimiento planta<sup>-1</sup> y del peso de grano (Tabla 4); éste último asociado también a una menor calidad física.

Los menores porcentajes de proteína en el grano se observan en los cultivares LE 2331 y Biointa 1001 ( $P < 0,05$ ) (Figura 11A). Por su parte, la altura de mixograma solo se diferencia ( $P < 0,05$ ) entre los cultivares LE 2249 y LE 2331, el primero con una media entre los tratamientos de Control y Estrés de 4,7 cm y el segundo con una media de 4,1 cm (Figura 11B). En tanto, el menor tiempo medio de mezclado entre los tratamientos de Control y Estrés fue de 3,7 minutos en el cultivar LE 2333 ( $P < 0,05$ ) (Figura 11C).

El cultivar LE 2333 se caracteriza por mostrar valores de aptitud industrial muy diferentes a los otros cuatro cultivares (Figura 11). A su vez, al igual que con peso de grano, rendimiento planta<sup>-1</sup> y otros caracteres, los tres parámetros de aptitud industrial de LE 2333 tampoco fueron afectados por el tratamiento Estrés (Figuras 4C, D y 11). El menor tiempo de mezclado del cultivar LE 2333 ( $P < 0,05$ ), carácter que lo diferencia particularmente de los otros cultivares, se relaciona a que su harina

tiene la característica de formar un gluten débil (Castro *et al.*, 2011, 2010). Esto significa que la harina de LE 2333 tiene una menor aptitud industrial para la elaboración de panificados de leudado que los demás cultivares estudiados.



**Figura 11.** Medias de tratamientos de riego (S: Estrés y R: Control) de cinco cultivares de trigo para A) porcentaje de proteína en el grano (base húmeda 13,5 %), B) altura de mixograma, y C) tiempo de mezclado. Se identifican diferencias significativas entre: †cultivares, y ††cultivares y tratamientos de riego. Las letras minúsculas indican diferencias entre cultivares (media de S y R), identificadas para A) y C), por el test de Tukey ( $P<0,05$ ), datos balanceados; y para B), por el test de Tukey–Kramer ( $P<0,05$ ), datos desbalanceados.

Un estudio de análisis de componentes principales de dos años y varios ambientes concluyó que Baguette Premium 11 es un cultivar de alto potencial de rendimiento, bajo contenido de proteína en el grano y de harina muy tenaz (Ernst *et al.*, 2012). A su vez, en el estudio se señala que el cultivar LE 2331 es similar a Baguette Premium 11 pero de harina con mejor relación tenacidad/elasticidad (P/L). Finalmente, los autores caracterizaron a Biointa 1001, LE 2249 y LE 2333 como cultivares de menor rendimiento, alto contenido de proteína en grano y baja relación P/L.

A diferencia del estudio citado, en el presente experimento el cultivar Baguette Premium 11 muestra un porcentaje mayor de proteína en el grano (Figura 11A). Los diferentes resultados pueden explicarse por la interacción entre cultivar y ambientes de producción del trabajo citado, por nitrógeno no limitante en el presente experimento, y o por los bajos IC e ICT que se observan en Baguette Premium 11 (Figura 8B y C). De este modo, el mayor porcentaje de proteína en el grano de Baguette Premium 11, podría deberse a que el nitrógeno de una alta biomasa total planta<sup>-1</sup> se movilizó a un reducido número de granos planta<sup>-1</sup> (Figuras 4B, 5A y 11A).

Si bien el contenido de proteína en el grano depende más del ambiente, la tasa de asimilación de nitrógeno puede ser diferente según el potencial de rendimiento de los cultivares (Vogel *et al.*, 1973). En este sentido, los cultivares de mayor rendimiento planta<sup>-1</sup>, LE 2331 y Biointa 1001, mostraron un porcentaje menor de proteína en el grano (Figuras 4D y 11A). Comparando porcentajes medios de proteína en el grano, la disponibilidad de nitrógeno en el experimento habría sido más suficiente que la disponibilidad en cultivos comerciales y experimentos de campo (Ernst *et al.* 2012, Castro *et al.* 2011). De este modo, el menor porcentaje de proteína en el grano de los cultivares de mayor rendimiento planta<sup>-1</sup>, pudo deberse a una menor relación entre las tasas de deposición de nitrógeno y carbohidratos, y no tanto a una dilución de nitrógeno causada por un déficit en el sustrato. Similarmente, el aumento no significativo del porcentaje de proteína en el grano por efecto del tratamiento Estrés, puede explicarse también por una mayor reducción de la tasa de asimilación de carbohidratos en relación a la reducción de la tasa de movilización de nitrógeno.

Para el CRA se observa una disminución significativa por efecto del tratamiento Estrés ( $P=0,0016$ ) (Tabla 5). También se observan diferencias significativas

entre cultivares ( $P=0,0031$ ) y en los DITR ( $P<0,0001$ ). Todas las combinaciones de interacciones son estadísticamente significativas, excepto entre cultivares y tratamientos de riego ( $P=0,0589$ ).

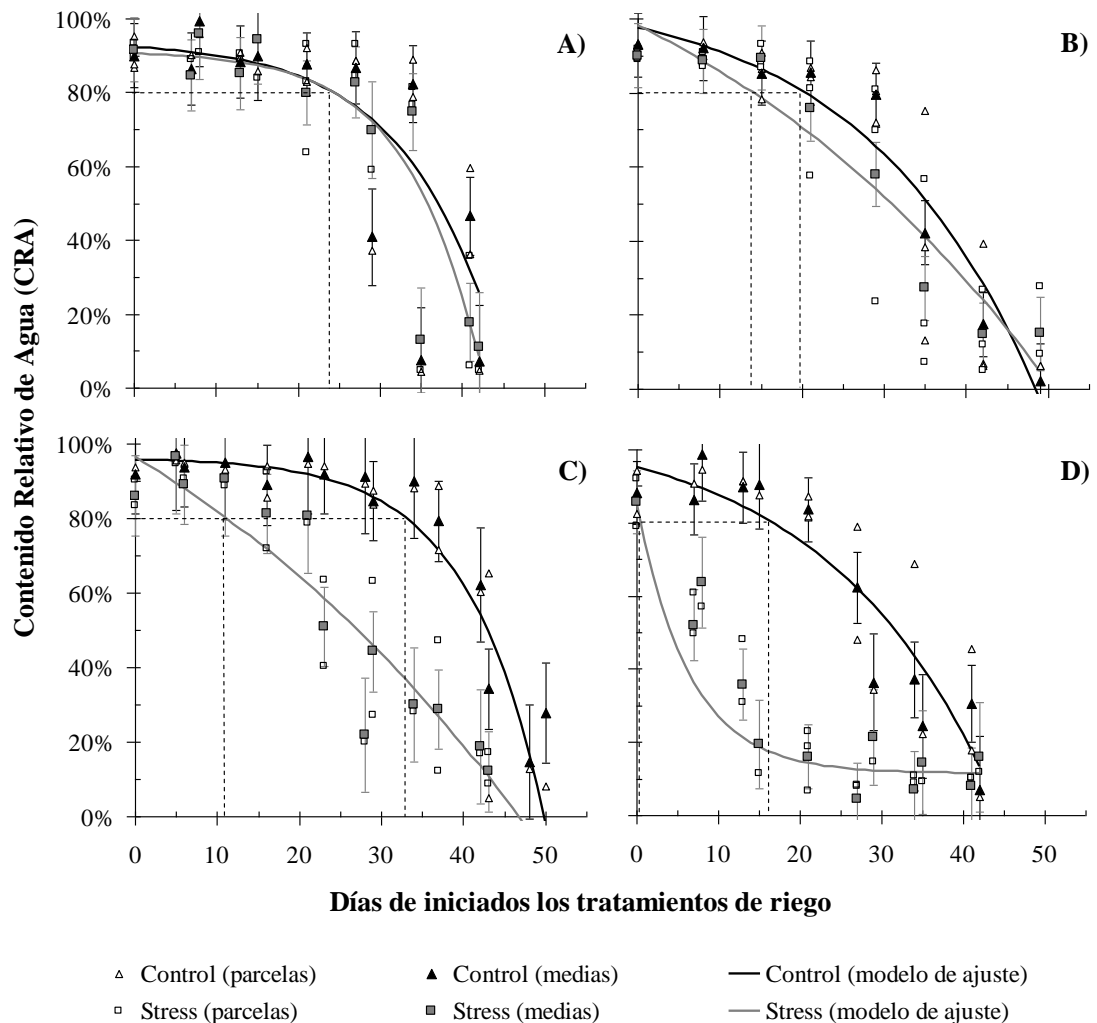
**Tabla 5.** Análisis de varianza de mediciones repetidas en el tiempo de contenido relativo de agua (CRA) en la hoja inferior a la hoja bandera (HB-1) y de conductancia estomática ( $g_s$ ) en la hoja bandera (HB). Las mediciones se realizaron durante el llenado de grano de cinco cultivares de trigo (Baguette Premium 11, Biointa 1001, LE 2249, LE 2331 y LE 2333) sometidos a dos tratamientos de riego (Control y Estrés).

Fuente de variación	CRA		$g_s$	
	g.l.	$P > F$	g.l.	$P > F$
Bloque	2	0,7562	2	<0,0001
Riego	1	<b>0,0016</b>	1	<0,0001
Cultivar	4	<b>0,0031</b>	4	<0,0001
DITR <sup>1</sup>	24	<0,0001	31	<0,0001
Riego × Cultivar	4	0,0589	4	<b>0,0184</b>
DITR × Riego	22	<b>0,0405</b>	30	<0,0001
DITR × Cultivar	23	<b>0,0006</b>	38	<0,0001
DITR × Riego × Cultivar	23	<b>0,0184</b>	38	<0,0001

<sup>1</sup> Días de iniciados los tratamientos de riego

La media de CRA muestra una disminución exponencial con los DITR, como lo indica el modelo ajustado para todos los tratamientos (Figura 12, Tabla 6). El modelo se correlaciona significativamente ( $P<0,0001$ ) con las medias ajustadas de los tratamientos (riego × cultivar), con la excepción del cultivar Baguette Premium 11 en el tratamiento Estrés ( $r=0,48$ ;  $P=0,0711$ ) (Tabla 6). Por esta razón, y debido a que el último muestreo de láminas de hojas tuvo que desecharse por un error de manipulación, los datos de Baguette Premium 11 no fueron incluidos en la Figura 12.





**Figura 12.** Mediciones repetidas en el tiempo de contenido relativo de agua (CRA) de hojas inferiores a la hoja bandera (HB-1), según los días después de anthesis cuando dos tratamientos de riego (Control y Estrés) se aplicaron a cuatro cultivares de trigo: A) LE 2333, B) Bointa 1001, C) LE 2249 y D) LE 2331. Las figuras blancas indican promedios parcelarios de tres HB-1, las sólidas medias ( $n=3$ ), las barras verticales los errores estándar, las líneas sólidas el ajuste al modelo de Orskov y McDonald (1979), y las líneas punteadas los días después de anthesis en que el CRA disminuye por debajo de 80 % según los tratamientos de riego aplicados.

**Tabla 6.** Valores y errores estándar de los parámetros calculados del modelo exponencial de Orskov y McDonald (1979), ajustado para estimar el Contenido Relativo de Agua (CRA) =  $bo + A [1 - e^{(-k * \text{Días de estrés})}]$  de cinco cultivares de trigo en dos tratamientos de riego. El coeficiente de Pearson ( $r$ ) indica la correlación entre los valores observados y los valores predichos por el modelo.

Cultivar	Tratamiento de riego	Estimación de parámetros						Correlación		
		bo		A		k	n	r	P	
LE 2333	Control	0,923 (0,077)	ns	0,016 (0,033)	a	-0,090 (0,050)	abc	21	0,76	<0,0001
	Estrés	0,905 (0,060)	ns	0,007 (0,012)	a	-0,113 (0,040)	abc	21	0,86	<0,0001
Biointa 1001	Control	0,976 (0,063)	ns	0,107 (0,095)	a	-0,048 (0,017)	abc	23	0,91	<0,0001
	Estrés	0,983 (0,083)	ns	0,567 (0,700)	a	-0,020 (0,018)	cd	23	0,87	<0,0001
LE 2249	Control	0,958 (0,043)	ns	0,005 (0,006)	a	-0,106 (0,024)	ab	22	0,92	<0,0001
	Estrés	0,965 (0,076)	ns	0,776 (1,217)	a	-0,017 (0,019)	cd	20	0,90	<0,0001
LE 2331	Control	0,952 (0,073)	ns	0,121 (0,151)	a	-0,049 (0,026)	abc	21	0,87	<0,0001
	Estrés	0,856 (0,130)	ns	-0,742 (0,206)	b	0,155 (0,114)	bd	21	0,93	<0,0001
Baguette Premium 11	Control	0,854 (0,028)	ns	0,001 (0,002)	a	-0,233 (0,104)	ac	15	0,89	<0,0001
	Estrés	0,886 (0,115)	ns	0,080 (0,416)	a	-0,061 (0,158)	abc	15	0,48	0,0711

Los valores entre paréntesis corresponden a los errores estándar.

Las letras en columnas indican para cada parámetro, las diferencias entre los tratamientos riego  $\times$  cultivar según la prueba  $t$  de Welch-Satterthwaite ( $P < 0,05$ ). ns: no significativo.

Las líneas punteadas indican para cada combinación de cultivar y tratamiento de riego, los DITR en que el CRA disminuye por debajo de 80 % (Figura 12), nivel indicado como el momento en que comienza a afectarse la fisiología normal de la planta (Lawlor y Cornic, 2002). De acuerdo con el modelo ajustado para la media de cultivares en el tratamiento Control [ $RWC = 0.9365 + 0.0640 (1 - e^{-(-0.0557x)})$ ], después de 20 DITR el CRA disminuye hacia alrededor de un 80 %. Mientras que al mismo tiempo (20 DITR), el modelo calcula un CRA de 61,4 % [ $RWC = 0.9083 + 0.8273 (1 - e^{-(-0.0152x)})$ ], para la media de los cultivares en el tratamiento Estrés. Los valores de CRA por debajo de 80 % promueven una inhibición metabólica general (*e.g.* una menor actividad de la sacarosa-fosfato-sintasa y de la síntesis de proteína) (Lawlor y Cornic, 2002). La temprana deshidratación de los tejidos foliares en el tratamiento Estrés sería una explicación para la disminución que se observa en el peso de grano (Tablas 1 y 2).

Al momento de anthesis (día 0) no se observan diferencias significativas de CRA entre los tratamientos de riego ( $P=0,9998$ , dato no mostrado). Las medias tuvieron un rango de 85,6 a 93,0 %, valores por debajo de los reportados por Izanloo *et al.* (2008) en condiciones de bienestar hídrico (94,5 a 97,5 %). Una posible explicación de esta diferencia es que las mediciones en el presente estudio siempre se realizaron antes de cada riego.

La interacción entre DITR  $\times$  riego  $\times$  cultivar ( $P=0,0184$ ), indica que los cultivares tuvieron una respuesta diferente a través del tiempo según los tratamientos de riego (Tabla 5, Figura 12). En la evolución del CRA se identifican dos tipos de respuestas contrastantes: 1) LE 2333 y Bointa 1001 que muestran una evolución similar del CRA en ambos tratamientos de riego (Figura 12A y B); y 2) LE 2249 y LE 2331 que en cambio muestran una temprana disminución del CRA en el tratamiento Estrés (Figura 12C y D). A pesar de que en el tratamiento Estrés Baguette Premium 11 no muestra un ajuste significativo con el modelo, su respuesta es intermedia entre la de los cultivares LE 2333 y Bointa 1001 (Tabla 6).

En el primer tipo de respuesta, los CRA de LE 2333 y Bointa 1001 no se ven afectados por el tratamiento Estrés (Figura 12A y B). No obstante, en la medida que avanzaron los DIIT se observa una disminución del CRA más lenta en LE 2333 que

en Biointa 1001. Otra diferencia con Biointa 1001 es que el cultivar LE 2333 también se observa poco afectado por el tratamiento Estrés en los otros caracteres estudiados.

En el segundo tipo de respuesta, cultivares LE 2249 y LE 2331, el CRA disminuye desde el inicio del llenado de grano a causa del tratamiento Estrés (Figura 12 C y D). Sin embargo, también en el tratamiento Estrés, LE 2249 disminuye su CRA con una menor tasa lineal que LE 2331, indicado por un parámetro A mayor ( $P < 0,05$ ) (Tabla 6). De este modo, el status hídrico del cultivar LE 2331 habría sido el más afectado por efecto del tratamiento Estrés. Por otra parte, LE 2249 es el único cultivar en el que se observan diferencias significativas entre tratamientos de riego ( $P < 0,05$ ) para la tasa exponencial de disminución del CRA, indicado por los parámetros k (Tabla 6). Esto significa que el cultivar LE 2249 muestra una disminución más demorada pero más rápida del CRA en el tratamiento Control, con respecto a la disminución en el tratamiento Estrés (Figura 12C).

Si bien Biointa 1001 y LE 2331 son los cultivares que muestran una mayor disminución de rendimiento planta<sup>-1</sup> (Figura 4D), ambos muestran un diferente tipo de respuesta en la evolución del CRA. Una posible explicación para esta diferencia, es que Biointa 1001 se muestra afectado por una disminución no significativa de sus componentes de rendimiento (mencionado anteriormente), mientras que LE 2331 mayormente se ve afectado en peso de grano (Figura 4). También, un marchitamiento temprano de las hojas basales afectó la biomasa aérea planta<sup>-1</sup> de Biointa 1001. De este modo, una menor superficie de transpiración y el hecho de que las mediciones de CRA se realizaron en la hoja inferior a la bandera, son razones que podrían explicar el mantenimiento del CRA de Biointa 1001 en ambos tratamientos de riego (Figura 12B). Siendo que la respuesta de Biointa 1001 es de tipo susceptible y conservativa (umbral temprano de estrés), es una respuesta no deseada para cultivares que crecen en ambientes con restricciones hídricas.

A diferencia de Biointa 1001, un umbral tardío de estrés en los cultivares LE 2249 y particularmente en LE 2331, habría sido la causa de la rápida disminución del CRA de ambos cultivares, y también la causa de que fueran los únicos cultivares afectados en peso de grano (Tabla 2, Figura 12B, C y D). Aún con diferente umbral

de estrés en el tiempo, evolución de CRA y peso de grano, los tres cultivares mencionados muestran los mayores rendimiento planta<sup>-1</sup> y EUA<sub>REND</sub> ( $P < 0,05$ ) (Figuras 4D y 9A). Estos resultados coinciden con la afirmación de que algunos cultivares de mayor EUA, con frecuencia también pueden ser susceptibles a estrés hídrico porque requieren de un alto consumo de agua (Blum, 2009).

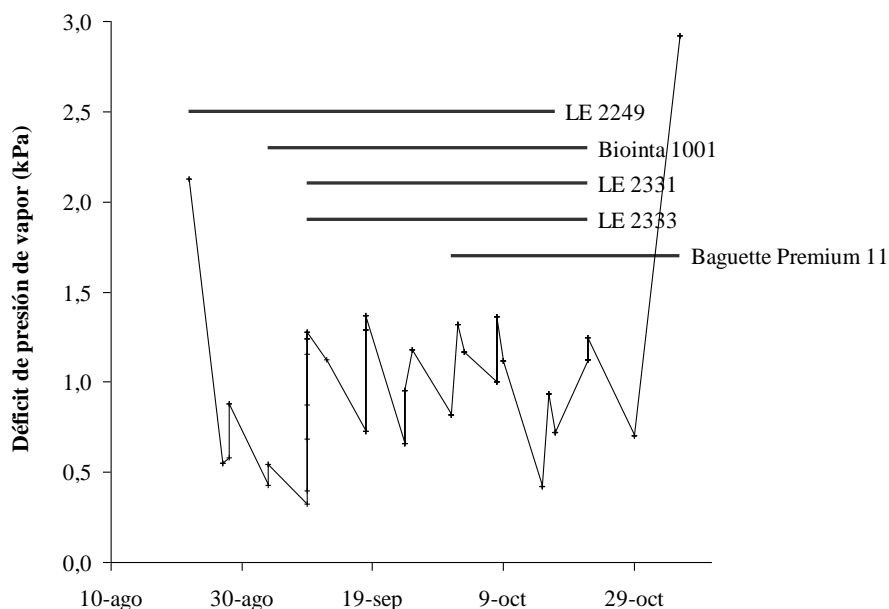
Una posible razón para explicar por qué LE 2249 y principalmente LE 2331 muestran un umbral tardío de estrés, es que ambos cultivares pudieron haber movilizadado durante el periodo de estrés, un mayor volumen de carbohidratos solubles almacenados en los tallos antes de antesis (Yang *et al.*, 2007). Una mayor movilización de carbohidratos durante el período de estrés puede haber estimulado la demanda de fosa, y por lo tanto estos cultivares pueden haber mantenido su tasa de acumulación de materia seca por un período de tiempo mayor (Blum, 1998). El tipo de respuesta para ambos cultivares mencionados, principalmente LE 2331, podría considerarse positiva siempre que un estrés no fuera demasiado intenso y o prolongado. Esto porque en ambientes con restricciones hídricas, en la medida que la tasa de crecimiento se mantiene el peso de grano finalmente es afectado.

Los parámetros del modelo ajustados para los cinco cultivares en el tratamiento Control no se diferencian por la prueba *t* de Welch–Satterthwaite (Tabla 6). No obstante, las diferencias de medias de CRA entre los DITR indican que la deshidratación y senescencia de los cultivares LE 2249 y LE 2333 comenzó más tarde que en los otros cultivares (datos no mostrados). También en el tratamiento Control, ambos cultivares son los que mantuvieron su CRA por encima de 80 % más allá de los 20 días pos antesis (Figura 12A y C). Como fue descrito, la diferencia entre ambos cultivares se observa en el tipo de respuesta al tratamiento Estrés, siendo LE 2333 el menos afectado.

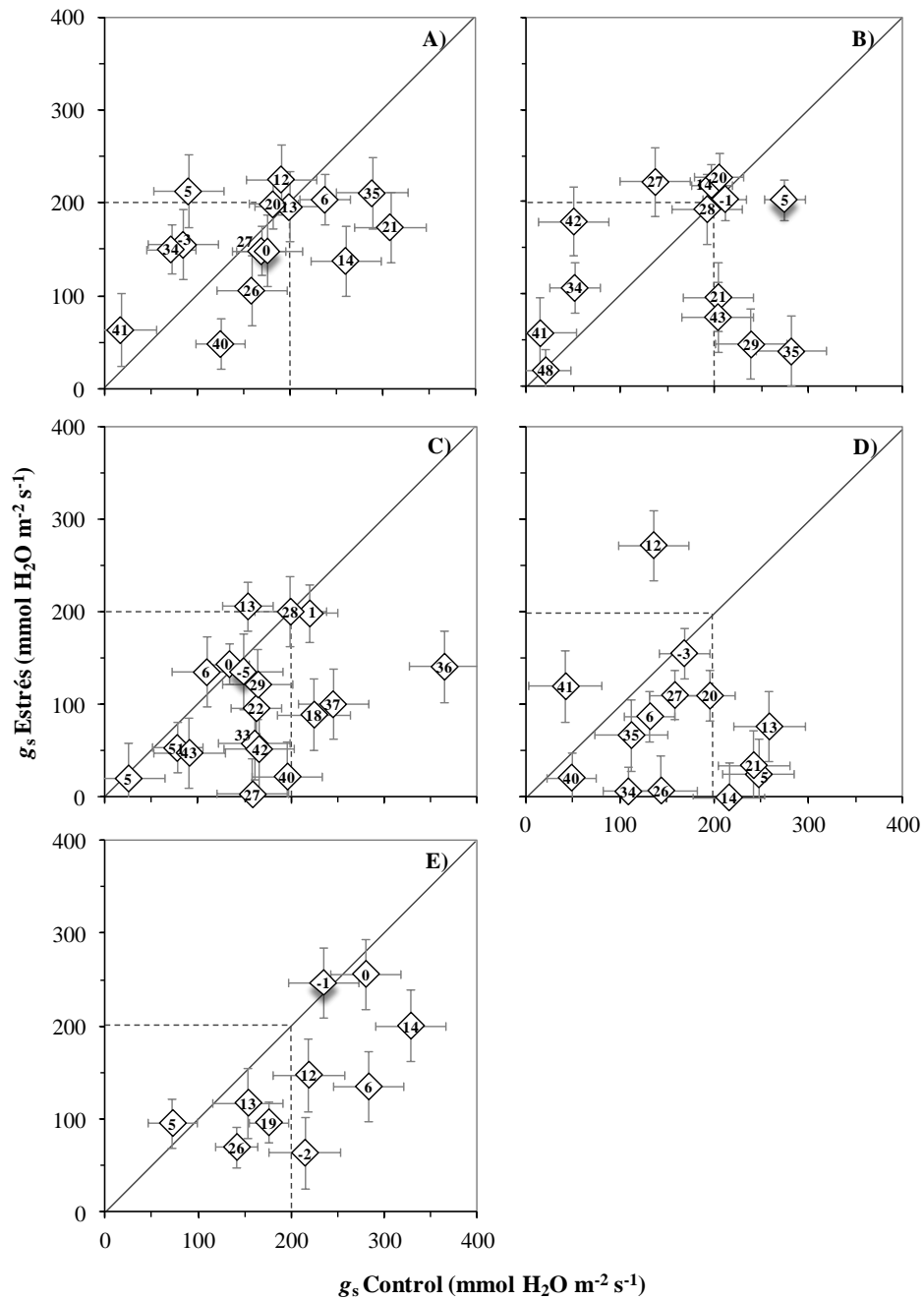
El tipo de respuesta en la evolución del CRA de LE 2333 podría deberse a resistencia o a un menor potencial de rendimiento en relación con una menor tasa de *T*. No obstante, LE 2333 presentaría una mayor resistencia que LE 2249 porque si bien entre ambos cultivares no se observan diferencias de rendimiento planta<sup>-1</sup> y biomasa total planta<sup>-1</sup> (Figuras 4D y 5C), a diferencia de LE 2333, el cultivar LE 2249 muestra haberse afectado significativamente en peso de grano y CRA (Tabla 2, Figura

12A y C). De este modo, con una  $EUA_{\text{REND}}$  intermedia, LE 2333 mantuvo valores de CRA más altos por un período de tiempo mayor que los otros cuatro cultivares (Figuras 9A y 12). Aún considerando que el  $\Psi_s$  no fue medido en este experimento, un posible mecanismo para explicar la evolución del CRA de LE 2333 es que este cultivar haya mantenido su turgencia ( $\Psi_p$ ) realizando AO (Boyer *et al.*, 2008).

En la  $g_s$  se observan interacciones y diferencias significativas entre los tratamientos de riego, cultivares y DITR (Tabla 5). A su vez, también se observa que el DPV tuvo un efecto significativo sobre las mediciones de  $g_s$  ( $P=0,0045$ , dato no mostrado). El efecto de la oscilación del DPV (Figura 13), concuerda con las observaciones de Rebetzke *et al.* (2000), Clarke y Clarke (1996), McDermitt (1990) y Jones (1977), quienes sostuvieron que la oscilación de las mediciones de  $g_s$  son fuertemente afectadas por la radiación y sobre todo, por la oscilación diaria y horaria del DPV del aire (*i.e.*, temperatura y humedad). No obstante, los errores estándares de las mediciones de  $g_s$  fueron de 21,6 a 46,4 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Figura 14), un rango no muy amplio para un carácter que presenta desvíos debidos al ambiente.



**Figura 13.** Déficit de presión de vapor (kPa) en el invernáculo cuando se realizaron mediciones repetidas en el tiempo de conductancia estomática ( $g_s$ ) durante el llenado de grano de cinco cultivares de trigo. Las líneas horizontales indican la duración del llenado de grano de cada cultivar.



**Figura 14.** Relación entre mediciones repetidas en el tiempo durante el llenado de grano de la conductancia estomática ( $g_s$ ) adaxial de la hoja bandera (HB) de cinco cultivares de trigo: A) LE 2333, B) Biointa 1001, C) LE 2249, D) LE 2331 y E) Baguette Premium 11 sometidos a dos tratamientos de riego (Control y Estrés). Los números indican los días pos antesis en que las mediciones fueron realizadas, las figuras las medias ( $n=3$ , obtenidas con promedios de tres HB por parcela) y las barras verticales y horizontales los errores estándar para ambos ejes.

La primera medición de  $g_s$  se realizó en el cultivar LE 2249 y la última en Baguette Premium 11 (Figura 13). En esos momentos, el DPV fue 2,12 y 2,92 kPa, respectivamente. Lo elevado de ambos registros se debió a que en ese momento el sistema de refrigeración de aire del invernáculo no estaba funcionando. Excepto por ambos registros, el DPV del invernáculo fue  $0,91 \pm 0,32$  kPa (media  $\pm$  desvío estándar); un rango adecuado para un normal llenado de grano (López-Morales *et al.*, 2008).

El cultivar Biointa 1001 muestra ser el más sensible al DPV diario; esto se observa los valores diarios de  $g_s$  y en la menor relación 1:1 entre los tratamientos de riego (Figuras 13 y 14B). La susceptibilidad de Biointa 1001 al déficit hídrico se explica porque en condiciones normales realizó un alto uso de agua. De este modo, cuando el DPV estuvo por encima de los valores óptimos de 0,80–0,95 kPa (López-Morales *et al.*, 2008), la disminución del  $\Psi_w$  del sustrato de las macetas habría afectado la tasa de  $T$  (Monteith, 1995). Esto también se explica porque Biointa 1001, y en menor medida Baguette Premium 11, muestran un número mayor de registros de  $g_s$  por encima de  $200 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Figura 14A y E). Valores de  $g_s$  fuera del rango de  $200\text{--}250 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  conducen a una reducción de la EUA (Martin y Ruiz-Torres, 1992). La alta  $g_s$  de ambos cultivares pudo deberse a un mayor número de estomas respecto a los otros cultivares, mayor densidad por unidad de área foliar, y o por una apertura mayor en condiciones de bienestar hídrico. No obstante, mientras Biointa 1001 muestra valores de  $g_s$  oscilantes en ambos tratamientos de riego, Baguette Premium 11 muestra un ajuste estomático en respuesta al tratamiento Estrés (Figura 14A y E). Si bien el ajuste estomático es una respuesta de la planta para mantener su  $\Psi_w$  y protegerse del estrés hídrico (Turner, 1986), también implica una menor asimilación de  $\text{CO}_2$  y una penalización de rendimiento.

La  $g_s$  de los cultivares LE 2333, LE 2249 y LE 2331 muestra el menor número de registros por encima de  $200 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  en el tratamiento Control (Figura 14A, C y D). De estos cultivares, LE 2333 muestra una mayor relación (1:1) entre los tratamientos de riego (Figura 14A). Esta es un tipo de respuesta similar a la que se observa con el CRA de este cultivar (Figura 12A). Por lo tanto, en ambos caracteres LE 2333 muestra ser el cultivar más resistente al tratamiento Estrés. Mientras, la res-



puesta que se observa en la  $g_s$  de LE 2249 y LE 2331 también es similar a la respectiva respuesta en CRA; siendo particularmente LE 2331 el cultivar con mayor ajuste estomático a causa del tratamiento Estrés (Figuras 12C, D, 14C y D).

A diferencia de Biointa 1001, el cultivar LE 2331 muestra una menor oscilación de la  $g_s$  y una mayor relación (1:1) entre ambos tratamientos de riego (Figura 14B y D). Una posible explicación es que LE 2331 pudo haber realizado ajuste estomático en la medida que se fueron incrementando los efectos del tratamiento Estrés, y no cuando la demanda atmosférica fue alta y o antes de que el agua de riego comenzara a agotarse de las macetas del tratamiento Control (Monteith 1995, Mott y Parkhurst 1991). Dicho de otra modo, aún con un CRA inferior al de Biointa 1001, el cultivar LE 2331 muestra valores más constantes de  $g_s$  que le habrían permitido mantener la tasa de  $T$  por un mayor período de tiempo.

De acuerdo con la hipótesis propuesta por Pettijohn *et al.* (2009), el ajuste estomático de los cultivares habría sido realizado en función de cómo las plantas percibieron el  $\Psi_w$  del sustrato. Esto es, cuanto menor es el umbral de estrés, plantas más susceptibles, entonces más influiría el mecanismo hidro-pasivo (Monteith 1995, Mott y Parkhurst 1991). Mientras que si el umbral de estrés es mayor a un mismo  $\Psi_w$ , mayor sería la influencia del mecanismo hidro-activo respecto al hidro-pasivo (Xue, citado por Streck 2003, Bunce 1998, 1997, Dodd *et al.* 1996, Farquhar 1978).

El umbral tardío de estrés que se observa en el cultivar LE 2331, podría explicarse no solo por una mayor movilización de carbohidratos solubles en agua (como se mencionó anteriormente), sino también que podría atribuirse a un ajuste irregular de los estomas (*patchy closure of stomata*). Este mecanismo hidro-activo implica que el aumento del DPV habría estimulado la síntesis de ABA, y que su transporte y concentración hacia las células guardianas promoviera el cierre parcial y o irregular de los estomas (Bunce 1998, 1997).

Cultivares con valores mayores de  $g_s$  no necesariamente se asocian a una mayor expresión de rendimiento bajo condiciones de déficit hídrico. Esto es porque a un volumen dado de agua, la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  ha podido modificarse solo por una optimización de la tasa de  $T$  y no por un incremento de la eficiencia de carboxilación de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco).

#### 4. CONCLUSIONES

El peso de grano se muestra como el componente de rendimiento más afectado, siendo por tanto un carácter apropiado para estudiar la respuesta de los genotipos de trigo a estrés por déficit hídrico. No obstante, los mecanismos compensatorios que se observan indican que cuanto antes fue sentido el déficit hídrico por las plantas, menos se afecta el peso de grano pero más se afectan los otros componentes del rendimiento.

La disminución del tiempo de mezclado puede haberse asociado con el aumento no significativo del porcentaje de proteína en el grano. Aún con mayor proteína, el estrés hídrico provoca una disminución de la calidad física de los granos a la vez que puede afectar la calidad del gluten para la elaboración de pan. En este sentido, se ha reportado que la deposición de gliadinas puede incrementarse en detrimento de la deposición de gluteninas de alto peso molecular.

El modelo exponencial propuesto para el ajuste de mediciones repetidas en el tiempo de CRA, podría ser de utilidad para identificar cultivares de diferente sensibilidad a estrés hídrico durante el llenado de grano. En el mismo sentido, cuando mediciones de  $g_s$  repetidas en el tiempo se contrastan entre dos tratamientos de riego, pueden identificarse diferentes patrones de agrupamiento de los valores según el cultivar estudiado.

Los cultivares LE 2331 y Biointa 1001 se muestran más susceptibles al déficit hídrico pos antesis. Sin embargo, mientras un umbral tardío de estrés habría afectado el CRA, peso de grano e IC de LE 2331, en Biointa 1001 esos caracteres no se afectaron. En cambio, en relación con una alta oscilación de la  $g_s$ , un umbral temprano de estrés en Biointa 1001 habría causado la disminución de su biomasa planta<sup>-1</sup> y una disminución no significativa de sus componentes de rendimiento. Cultivares con un umbral de estrés tardío afectarían menos los granos planta<sup>-1</sup>, pero más el peso de grano y su calidad física e industrial; siendo entonces más apropiados para regiones con estrés hídrico moderado, suelos profundos y o con probabilidad de lluvia pos antesis. Para regiones con probabilidad de estrés hídrico severo pos antesis, serían más apropiados cultivares de mayor brecha de EUA entre tratamientos de riego.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- AACC (American Association of Cereal Chemists). 2000. Approved Methods of Analysis. 11a Edición. Saint Paul, Minnesota, EE.UU. [En línea] 10 noviembre 2015. <http://methods.aaccnet.org/toc.aspx>
- Abbate PE, Gutheim F, Polidoro O, Milisich HJ, Cuniberti M. 2010. Bases for the Segregation of Argentine Bread Wheat by Quality: Effects of Cultivar, Location, Year and their Interactions. *Agriscientia*, 27 (1): 1 – 9.
- Allen RG, Smith M, Perrier A, Pereira LS. 1994. An Update for the Definition of Reference Evapotranspiration. *ICID Bulletin*, 43 (2): 1 – 34.
- Asseng S, Ritchie JT, Smucker AJM, Robertson MJ. 1998. Root Growth and Water Uptake during Water Deficit and Recovering in Wheat. *Plant and Soil*, 201 (2): 265 – 273.
- Babu RC, Pathan MS, Blum A, Nguyen HT. 1999. Comparison of Measurement Methods of Osmotic Adjustment in Rice Cultivars. *Crop Science*, 39 (1): 150 – 158.
- Barrs HD, Weatherley PE. 1962. A Re-Examination of the Relative Turgidity Technique for Estimating Water Deficits in Leaves. *Australian Journal of Biological Science*, 15 (3): 413 – 428.
- Blum A. 2009. Effective Use of Water (EUW) and not Water-Use Efficiency (WUE) is the Target of Crop Yield Improvement under Drought Stress. *Field Crops Research*, 112 (2-3): 119 – 123.
- Blum A. 2005. Drought Resistance, Water-Use Efficiency, and Yield Potential—Are They Compatible, Dissonant, or Mutually Exclusive?. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56 (11): 1159 – 1168.
- Blum A, Zhang J, Nguyen HT. 1999. Consistent Differences among Wheat Cultivars in Osmotic Adjustment and their Relationship to Plant Production. *Field Crops Research*, 64 (3): 287 – 291.
- Blum A. 1998. Improving Wheat Grain Filling Under Stress by Stem Reserve Mobilization. *Euphytica*, 100 (1-3): 77 – 83.

- Blum A. 1993. Selection for Sustained Production in Water–Deficit Environments. En: Buxton DR, Shibles R, Forsberg RA, Blad BL, Asay KH, Paulsen GM, Wilson RF. (Eds.). International Crop Science I (1992, International Crop Science Congress, Ames, IA, EE.UU). Madison, WI, EE.UU: Crop Science Society of America. 343 – 347.
- Boyer JS, James RA, Munns R, Condon AG, Passioura JB. 2008. Osmotic Adjustment Leads to Anomalous Low Estimates of Relative Water Content in Wheat and Barley. *Functional Plant Biology*, 35 (11): 1172 – 1182.
- Boyer JS, Wong SC, Farquhar GD. 1997. CO<sub>2</sub> and Water Vapor Exchange across Leaf Cuticle (Epidermis) at Various Water Potentials. *Plant Physiology*, 114 (1): 185 – 191.
- Boyer JS. 1970. Leaf Enlargement and Metabolic Rates in Corn, Soybean, and Sunflower at Various Leaf Water Potentials. *Plant Physiology*, 46 (2): 233 – 235.
- Bunce JA. 1998. Effects of Humidity on Short-Term Responses of Stomatal Conductance to an Increase in Carbon Dioxide Concentration. *Plant, Cell & Environment*, 21 (1): 115 – 120.
- Bunce JA. 1997. Does Transpiration Control Stomatal Responses to Water Vapour Pressure Deficit?. *Plant, Cell & Environment*, 20 (1): 131 – 135.
- Calderini DF. 2011. Determinación del Peso Potencial de Grano y su Respuesta al Estrés Abiótico en Trigo y Cebada. En: Castro A, Hoffman E, Viega L. (Eds.). Limitaciones para la Productividad de Trigo y Cebada. Montevideo, Uruguay: Facultad de Agronomía. 21 – 26.
- Calderini DF, Reynolds MP. 2000. Changes in Grain Weight As a Consequence of de-Graining Treatments at pre- and post-Anthesis in Synthetic Hexaploid Lines of Wheat (*Triticum durum* × *T. tauschii*). *Australian Journal of Plant Physiology*, 27 (3): 183 – 191.
- Calderini DF, Abeledo LG, Savin R, Slafer GA. 1999. Effect of Temperature and Carpel Size During Pre-Anthesis on Potential Grain Weight in Wheat. *The Journal of Agricultural Science*, 132 (4): 453 – 459.

- Castro M, Pereyra S, Germán S, Stewart S, Vázquez D, Vera M. 2012. Resultados Experimentales de la Evaluación Nacional de Cultivares de Trigo Ciclo Intermedio. Período 2011. INIA-INASE. Colonia, Uruguay: INIA La Estanzuela. 62 p.
- Castro M, Díaz M, Germán S, Pereyra S, Vázquez D, Albanese I. 2011. Resultados Experimentales de la Evaluación Nacional de Cultivares de Trigo, Cebada, Colza, Triticale y Trigo Doble Propósito de los Tres Últimos Años. Período 2008-2009-2010. INIA-INASE. Resultados Experimentales No. 11. Colonia, Uruguay: INIA La Estanzuela. 143 p.
- Castro M, Díaz M, Germán S, Pereyra S, Vázquez D, Albanese I. 2010. Resultados Experimentales de la Evaluación Nacional de Cultivares de Trigo, Cebada, Colza, Triticale y Trigo Doble Propósito de los Tres Últimos Años. Período 2007-2008-2009. INIA-INASE. Resultados Experimentales No. 10. Colonia, Uruguay: INIA La Estanzuela. 129 p.
- Castro M, Vázquez D. 2010. Influence of Drought Stress during Grain Filling on Agronomic Characteristics, Grain Protein Concentration and Rheological Properties of Wheat Cultivars. *Advances of Agricultural Sciences Problem Issues*, 545: 123 – 130.
- Chandlee JM. 2001. Current Molecular Understanding of the Genetically Programmed Process of Leaf Senescence. *Physiologia Plantarum*, 113 (1): 1 – 8.
- Clarke JM, Clarke FR. 1996. Considerations in Design and Analysis of Experiments to Measure Stomatal Conductance of Wheat. *Crop Science*, 36 (5): 1401 – 1405.
- Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD. 2002. Improving Intrinsic Water-Use Efficiency and Crop Yield. *Crop Science*, 42 (1): 122 – 131.
- Dai A. 2011. Drought under Global Warming: a Review. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, 2 (1): 45 – 65.
- Dodd IC, Stikic R, Davies WJ. 1996. Chemical Regulation of Gas Exchange and Growth of Plants in Drying Soil in the Field. *Journal of Experimental Botany*, 47 (10): 1475 – 1490.

- Dugger WM. 1952. The Permeability of Non-Stomate Leaf Epidermis to Carbon Dioxide. *Plant Physiology*, 27 (3): 489 – 499.
- Dure L, Crouch M, Harada J, Ho THD, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung ZR. 1989. Common Amino Acids Sequence Domains among the LEA Proteins of Higher Plants. *Plant Molecular Biology*, 12 (5): 475 – 486.
- El Banco Mundial. 2015. Indicators: Economy & Growth. GDP (current US\$). [En línea] 10 noviembre 2015.  
<http://data.worldbank.org/indicator/NY.GDP.MKTP.CD/countries>
- Ernst O, Escudero J, Vázquez D, Cadenazzi M, Castro M, González N, Larramendi S, Bentancur O, Suburu G, Godiño M. 2012. Caracterización de la Calidad Industrial de Variedades de Trigo en Uruguay. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Serie FPTA No. 37. Montevideo, Uruguay: Hemisferio Sur. 40 p.
- Ernst O, Nin M, Cadenazzi M. 2001. ¿Qué Clase de Harina Producen las Variedades de Trigo que Sembramos?. Elaborado en base al Tercer Relevamiento de Rendimiento y Calidad de Trigo –Zafra 2000/2001-. Cangüé No. 22. Paysandú, Uruguay: Facultad de Agronomía. 11 – 17.
- Evans LT, Bingham J, Roskams MA. 1972. The Pattern of Grain Set Within Ears of Wheat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 25 (1): 1 – 8.
- FAOSTAT. 2013. Production: Crops. [En línea] 10 noviembre 2015.  
<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>
- FAOSTAT. 2011. Food Supply: Crops Primary Equivalent. [En línea] 10 noviembre 2015. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/C/CC/E>
- Farquhar GD. 1978. Feedforward Responses of Stomata to Humidity. *Australian Journal of Plant Physiology*, 5 (6): 787 – 800.
- Fischer RA, Edmeades GO. 2010. Breeding and Cereal Yield Progress. *Crop Science*, 50 (suplemento 2): 85 – 98.
- Forster P, Ramaswamy V, Artaxo P, Berntsen T, Betts R, Fahey DW, Haywood J, Lean J, Lowe DC, Myhre G, Nganga J, Prinn R, Raga G, Schulz M, Van Dorland R. 2007. Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. En: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB,

- Tignor M, Miller HL. (Eds.). Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, Reino Unido y Nueva York, NY, EE.UU: Cambridge University Press. 129 – 234.
- Fu D, Szucs P, Yan L, Helguera M, Skinner JS, von Zitzewitz J, Hayes PM, Dubcovsky J. 2005. Large Deletions within the First Intron in VRN-1 are Associated with Spring Growth Habit in Barley and Wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 273 (1): 54 – 65.
- Gómez D, Vanzetti L, Helguera M, Lombardo L, Fraschina J, Miralles DJ. 2014. Effect of *Vrn-1*, *Ppd-1* Genes and Earliness *per se* on Heading Time in Argentinean Bread Wheat Cultivars. *Field Crops Research*, 158 (1): 73 – 81.
- Grimm AM, Barros VR, Doyle ME. 2000. Climate Variability in Southern South America Associated with El Niño and La Niña Events. *Journal of Climate*, 13 (1): 35 – 58.
- Guttieri MJ, Stark JC, O'Brien K, Souza E. 2001. Relative Sensitivity of Spring Wheat Grain Yield and Quality Parameters to Moisture Deficit. *Crop Science*, 41 (2): 327 – 335.
- Halse NJ, Weir RN. 1970. Effects of Vernalization, Photoperiod, and Temperature on Phenological Development and Spikelet Number of Australian Wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 21 (3): 383 – 393.
- Hasan AK, Herrera J, Lizana C, Calderini DF. 2011. Carpel Weight, Grain Length and Stabilized Grain Water Content are Physiological Drivers of Grain Weight Determination of Wheat. *Field Crops Research*, 123 (3): 241 – 247.
- Heim RR. 2002. A Review of Twentieth-Century Drought Indices Used in the United States. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 83 (8): 1149 – 1165.
- Held IM, Soden BJ. 2006. Robust Responses of the Hydrological Cycle to Global Warming. *Journal of Climate*, 19 (21): 5686 – 5699.
- Hennessy KJ, Gregory JM, Mitchell JFB. 1997. Changes in Daily Precipitation under Enhanced Greenhouse Conditions. *Climate Dynamics*, 13 (9): 667 – 680.

- Hochman Z. 1982. Effect of Water Stress with Phasic Development on Yield of Wheat Grown in a Semi-Arid Environment. *Field Crops Research*, 5: 55 – 67.
- Hoffman E, Viega L, Baeten A, Lamarca A, Lamarca M, Wornicov S. 2011. Respuesta de 7 Cultivares de Trigo al Déficit y Exceso Hídrico durante el Encañado. *Cangüé No. 31*. Paysandú, Uruguay: Facultad de Agronomía. 10 – 17.
- Hoffman E, Fernández R, Baeten A, Cadenazzi M. 2009. Caracterización de Cultivares de Trigo. [En línea] 10 noviembre 2015.  
[http://www.eemac.edu.uy/pdf/publicaciones\\_docentes/prod\\_vegetal/Caracterizacion\\_Trigo2008.pdf](http://www.eemac.edu.uy/pdf/publicaciones_docentes/prod_vegetal/Caracterizacion_Trigo2008.pdf)
- Hoffman E, Fernández R, Cadenazzi M. 2008. Caracterización de Cultivares de Trigo. [En línea] 10 noviembre 2015.  
<http://www.inia.org.uy/sitios/mnt/Informe%20Caracterizaci%F3n%20Trigo%202007-Publicaci%F3n%20MNT.pdf>
- Hoffman E, Mesa P, Cadenazzi M. 2007. Caracterización de Cultivares de Trigo. En: INIA (Ed.). *Jornada de Cultivos de Invierno. Serie Actividades de Difusión No. 484*. Colonia, Uruguay: INIA La Estanzuela. 67 – 89.
- Hoseney RC. 1985. The Mixing Phenomena. *Cereal Foods World*, 30 (7): 453 – 457.
- Hsiao TC. 1973. Plant Responses to Water Stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24: 519 – 570.
- Huebner FR, Nelsen TC, Chung OK, Bietz JA. 1997. Protein Distributions among Hard Red Winter Wheat Varieties as Related to Environment and Baking Quality. *Cereal Chemistry*, 74 (2): 123 – 128.
- INASE Argentina (Instituto Nacional de Semillas). 2012a. RET - Red de Ensayos Comparativos de Variedades de Trigo. [En línea] 10 noviembre 2015.  
[http://www.inase.gov.ar/index.php?option=com\\_content&view=article&id=102&Itemid=91](http://www.inase.gov.ar/index.php?option=com_content&view=article&id=102&Itemid=91)
- INASE Argentina (Instituto Nacional de Semillas). 2012b. Registro de Variedades. Descripciones de Variedades de Trigo Inscriptas. [En línea] 10 noviembre 2015.



[http://www.inase.gov.ar/index.php?option=com\\_remository&Itemid=102&func=select&id=9&orderby=2&page=2](http://www.inase.gov.ar/index.php?option=com_remository&Itemid=102&func=select&id=9&orderby=2&page=2)

- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2007. Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Pachauri RK, Reisinger A. (Eds.). Ginebra, Suiza: IPCC. 104 p.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2001. Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, van der Linden PJ, Dai X, Maskell K, Johnson CA. (Eds.). Cambridge, Reino Unido y Nueva York, NY, EE.UU: Cambridge University Press. 881 p.
- IRI (The International Research Institute for Climate and Society). 2015. ENSO Resources. [En línea] 10 noviembre 2015.  
<http://iri.columbia.edu/our-expertise/climate/forecasts/enso/>
- Izanloo A, Condon AG, Langridge P, Tester M, Schnurbusch T. 2008. Different Mechanisms of Adaptation to Cyclic Water Stress in Two South Australian Bread Wheat Cultivars. *Journal of Experimental Botany*, 59 (12): 3327 – 3346.
- Jones HG. 1987. Breeding for Stomatal Characters. En: Zeiger E, Farquhar GD, Cowan IR. (Eds.). *Stomatal Function*. Stanford, EE.UU: Stanford University Press. 432 – 443.
- Jones HG. 1977. Aspects of the Water Relations of Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) in Response to Induced Drought. *The Journal of Agricultural Science*, 88 (2): 267 – 282.
- Jones MM, Turner NC. 1978. Osmotic Adjustment in Leaves of Sorghum in Response to Water Deficits. *Plant Physiology*, 61 (1): 122 – 126.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1999. Improving Plant Drought, Salt, and Freezing Tolerance by Gene Transfer of a Single Stress-Inducible Transcription Factor. *Nature Biotechnology*, 17 (3): 287 – 291.

- Kemble AR, MacPherson HT. 1954. Liberation of Amino Acids in Perennial Rye Grass during Wilting. *Biochemical Journal*, 58 (1): 46 – 49.
- Kobata T, Palta JA, Turner NC. 1992. Rate of Development of Post Anthesis Water Deficits and Grain Filling of Spring Wheat. *Crop Science*, 32 (5): 1238 – 1242.
- Kohli MM, Frascina J. 2009. Adapting Wheats to Zero Tillage in Maize-Wheat-Soybean Rotation System. En: ICAR (Ed.). *Proceedings of the 4th World Congress on Conservation Agriculture: Innovations for Improving Efficiency, Equity and Environment*. Nueva Delhi, India: ICAR. 212 – 222.
- Law CN, Young CF, Brown JWS, Snape JW, Worland AJ. 1978. The Study of Grain Protein Control in Wheat Using Whole Chromosome Substitution Lines. [RESUMEN]. En: *Seed Protein Improvement by Nuclear Techniques*. Viena, Austria: International Atomic Energy Agency. 483 – 502. [En línea] 10 noviembre 2015.  
<http://www.cabdirect.org/abstracts/19781669169.html;jsessionid=3E060A01241CFCD9781FEDE1812B39C5#>
- Lawlor DW, Cornic G. 2002. Photosynthetic Carbon Assimilation and Associated Metabolism in Relation to Water Deficits in Higher Plants. *Plant, Cell & Environment*, 25 (2): 275 – 294.
- Levitt J. 1980. *Responses of Plants to Environmental Stresses, Vol. 2: Water, Radiation, Salt and Other Stresses*. 2da ed. Nueva York: Academic Press.
- Lin Z, Ni Z, Zhang Y, Yao Y, Wu H, Sun Q. 2005. Isolation and Characterization of 18 Genes Encoding  $\alpha$ - and  $\beta$ -Expansins in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 274 (5): 548 – 556.
- Littell RC, Milliken GA, Stroup WW, Wolfinger RD, Schabenberger O. 2006. *SAS<sup>®</sup> for Mixed Models*. 2da ed. Cary, NC, EE.UU: SAS Institute Inc. 814 p.
- Lizana XC, Riegel R, Gómez LD, Herrera J, Isla A, McQueen-Mason SJ, Calderini DF. 2010. Expansins Expression is Associated with Grain Size Dynamics in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 61 (4): 1147 – 1157.
- López-Morales V, López-Ortega O, Ramos-Fernández J, Muñoz LB. 2008. JAPIEST: An Integral Intelligent System for the Diagnosis and Control of

- Tomatoes Diseases and Pests in Hydroponic Greenhouses. *Expert Systems with Applications*, 35 (4): 1506 – 1512.
- Ma Q, Turner DW. 2006. Osmotic Adjustment Segregates with and is Positively Related to Seed Yield in F3 Lines of Crosses between *Brassica napus* and *B. juncea* Subjected to Water Deficit. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46 (12): 1621 – 1627.
- Maherali H, Reid CD, Polley HW, Johnson HB, Jackson RB. 2002. Stomatal Acclimation Over a Subambient to Elevated CO<sub>2</sub> Gradient in a C3/C4 Grassland. *Plant, Cell & Environment*, 25 (4): 557 – 566.
- Manschadi AM, Christopher J, deVoil P, Hammer GL. 2006. The Role of Root Architectural Traits in Adaptation of Wheat to Water-Limited Environments. *Functional Plant Biology*, 33 (9): 823 – 837.
- Marshall DR, Mares DJ, Moss HJ, Ellison FW. 1986. Effects of Grain Shape and Size on Milling Yields in Wheat. II. Experimental Studies. *Australian Journal of Agricultural Research*, 37 (4): 331 – 342.
- Martin B, Ruiz-Torres NA. 1992. Effects of Water-Deficit Stress on Photosynthesis, Its Components and Component Limitations, and on Water Use Efficiency in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology*, 100 (2): 733 – 739.
- McCree KJ, Davis SD. 1974. Effect of Water Stress and Temperature on Leaf Size and on Size and Number of Epidermal Cells in Grain Sorghum. *Crop Science*, 14 (5): 751 – 755.
- McDermitt DK. 1990. Sources of Error in the Estimation of Stomatal Conductance and Transpiration from Porometer Data. *HortScience*, 25 (12): 1538 – 1548.
- McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ. 1992. Two Endogenous Proteins that Induce Cell Wall Extension in Plants. *The Plant Cell*, 4 (11): 1425 – 1433.
- Meehl GA, Stocker TF, Collins WD, Friedlingstein P, Gaye AT, Gregory JM, Kitoh A, Knutti R, Murphy JM, Noda A, Raper SCB, Watterson IG, Weaver AJ, Zhao ZC. 2007. Global Climate Projections. En: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL. (Eds.). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate*

- Change. Cambridge, Reino Unido y Nueva York, NY, EE.UU: Cambridge University Press. 747 – 845.
- MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). 2008. Estadísticas Agropecuarias (DIEA), Encuesta Agrícola “Invierno 2008”. Serie Encuestas No. 267. [En línea] 10 noviembre 2015.  
<http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,93,O,S,0,MNU;E;39;1;MNU;>
- Miralles DJ. 2006. Generación de Rendimiento en Trigo: ¿Por Qué es Necesario Comprender el Funcionamiento del Cultivo?. En: Romagnoli J (Ed.). XIV Congreso de Trigo en Siembra Directa (2006, Bolsa de Comercio de Rosario). Buenos Aires, Argentina: AAPRESID. 52 – 57.
- Miranda, R. 2009. Trigo Doble Propósito. ¿Un Objetivo del Mejoramiento Triguero?. Estación Experimental Agropecuaria Bordenave, INTA Argentina. [En línea] 10 noviembre 2015.  
<http://inta.gob.ar/documentos/trigo-doble-proposito-un-objetivo-del-mejoramiento-triguero/>
- Monteith JL. 1995. A Reinterpretation of Stomatal Responses to Humidity. *Plant, Cell & Environment*, 18 (4): 357 – 364.
- Morgan JM. 1995. Growth and Yield of Wheat Lines with Differing Osmoregulative Capacity at High Soil Water Deficit in Seasons of Varying Evaporative Demand. *Field Crops Research*, 40 (3): 143 – 152.
- Morgan JM. 1992. Osmotic Components and Properties Associated with Genotypic Differences in Osmoregulation in Wheat. *Australian Journal of Plant Physiology*, 19 (1): 67 – 76.
- Morris CF. 2002. Puroindolines: The Molecular Genetic Basis of Wheat Grain Hardness. *Plant Molecular Biology*, 48 (5-6): 633 – 647.
- Mott KA, Parkhurst DF. 1991. Stomatal Responses to Humidity in Air and Helox. *Plant, Cell & Environment*, 14 (5): 509 – 515.
- Nicolas ME, Turner NC. 1993. Use of Chemical Desiccants and Senescing Agents to Select Wheat Lines Maintaining Stable Grain Size during Post-Anthesis Drought. *Field Crops Research*, 31 (1-2): 155 – 171.

- Orskov ER, McDonald I. 1979. The Estimation of Protein Degradability in the Rumen from Incubation Measurements Weighted According to Rate of Passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92 (2): 499 – 503.
- Ozturk A, Aydin F. 2004. Effect of Water Stress at Various Growth Stages on Some Quality Characteristics of Winter Wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 190 (2): 93 – 99.
- Palmer WC. 1965. Meteorological Drought. U.S. Department of Commerce, Weather Bureau. Research Paper No. 45. Washington, DC.: U.S. Government. 58 p.
- Panozzo JF, Eagles HA, Wootton M. 2001. Changes in Protein Composition during Grain Development in Wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52 (4): 485 – 493.
- Passioura JB. 2006. The Perils of Pot Experiments. *Functional Plant Biology*, 33 (12): 1075 – 1079.
- Passioura JB. 1977. Grain Yield, Harvest Index and Water Use of Wheat. *The Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*, 43: 117 – 120.
- Pettijohn JC, Salvucci GD, Phillips NG, Daley MJ. 2009. Mechanisms of Moisture Stress in a Mid-Latitude Temperate Forest: Implications for Feedforward and Feedback Controls from an Irrigation Experiment. *Ecological Modelling*, 220 (7): 968 – 978.
- Pisciottano G, Díaz A, Cazes G, Mechoso CR. 1994. El Niño-Southern Oscillation Impact on Rainfall in Uruguay. *Journal of Climate*, 7 (8): 1286 – 1302.
- Prenger JJ, Ling PP. 2001. Greenhouse Condensation Control: Understanding and Using Vapor Pressure Deficit (VPD). Fact Sheet (Series) AEX-804. Columbus, OH: Ohio State University Extension. 4 p.
- Rajaram S, Braun HJ, van Ginkel M. 1996. CYMMIT's Approach to Breed for Drought Tolerance. *Euphytica*, 92 (1-2): 147 – 153.
- Rajaram S. 1995. Wheat Germplasm Improvement: Historical Perspectives, Philosophy, Objectives, and Missions. En: Rajaram S, Hettel GP. (Eds.). *Wheat Breeding at CIMMYT: Commemorating 50 Years of Research in Mexico for Global Wheat Improvement*. Wheat Special Report No. 29. Ciudad Obregón, Sonora, México: CIMMYT. 1 – 10.

- Rebetzke GJ, Read JJ, Barbour MM, Condon AG, Rawson HM. 2000. A Hand-Held Porometer for Rapid Assessment of Leaf Conductance in Wheat. *Crop Science*, 40 (1): 277 – 280.
- Reynolds MP, Trethowan RM, van Ginkel M, Rajaram S. 2001a. Application of Physiology in Wheat Breeding. En: Reynolds MP, Ortiz-Monasterio JI, McNab A. (Eds.). *Application of Physiology in Wheat Breeding*. México, D.F.: CIMMYT. 2 – 10.
- Reynolds MP, Nagarajan S, Razzaque MA, Ageeb OAA. 2001b. Heat Tolerance. En: Reynolds MP, Ortiz-Monasterio JI, McNab A. (Eds.). *Application of Physiology in Wheat Breeding*. México, D.F.: CIMMYT. 124 – 135.
- Reynolds MP, Balota M, Delgado MIB, Amani I, Fischer RA. 1994. Physiological and Morphological Traits Associated with Spring Wheat Yield under Hot, Irrigated Conditions. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21 (6): 717 – 730.
- Saint Pierre C, Peterson CJ, Ross AS, Ohm JB, Verhoeven MC, Larson M, Hoefler B. 2008. Winter Wheat Genotypes under Different Levels of Nitrogen and Water Stress: Changes in Grain Protein Composition. *Journal of Cereal Science*, 47 (3): 407 – 416.
- Secenji M, Lendvai Á, Hajósné Z, Dudits D, Györgyey, J. 2005. Experimental System for Studying Long-Term Drought Stress Adaptation of Wheat Cultivars. *Acta Biologica Szegediensis*, 49 (1-2): 51 – 52.
- Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT. 2004. Root Growth Maintenance during Water Deficits: Physiology to Functional Genomics. *Journal of Experimental Botany*, 55 (47): 2343 – 2351.
- Sharp RE, Silk WK, Hsiao TC. 1988. Growth of the Maize Primary Root at Low Water Potentials. I. Spatial Distribution of Expansive Growth. *Plant Physiology*, 87 (1): 50 – 57.
- Shewry PR. 2007. Improving the Protein Content and Composition of Cereal Grain. *Journal of Cereal Science*, 46 (3): 239 – 250.
- Shewry PR, Tatham PR, Barro F, Barcelo P, Lazzeri P. 1995. Biotechnology of Breadmaking: Unraveling and Manipulating the Multi-Protein Gluten Complex. *Nature Biotechnology*, 13 (11): 1185 – 1190.

- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 1997. Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiology*, 115 (2): 327 – 334.
- Simane B, Peacock JM, Struik PC. 1993. Differences in Development and Growth Rate among Drought-Resistant and Susceptible Cultivars of Durum Wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). *Plant and Soil*, 157 (2): 155 – 166.
- Slafer G. 2012. Wheat Development: Its Role in Phenotyping and Improving Crop Adaptation. En: Reynolds M, Pask A, Mullan D. (Eds.). *Physiological Breeding I: Interdisciplinary Approaches to Improve Crop Adaptation*, México, D.F.: CIMMY. 109 – 123.
- Slafer GA, Rawson H. 1994. Sensitivity of Wheat Phasic Development to Major Environmental Factors: A Re-Examination of Some Assumptions Made by Physiologist and Modellers. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21 (4): 393 – 426.
- Spence RD, Wu H, Sharpe PJH, Clark KG. 1986. Water Stress Effects on Guard Cell Anatomy and the Mechanical Advantage of the Epidermal Cells. *Plant, Cell & Environment*, 9 (3): 197 – 202.
- Streck NA. 2003. Stomatal Response to Water Vapour Pressure Deficit: An Unsolved Issue. *Revista Brasileira de Agrociência*, 9 (4): 317 – 322.
- Szabados L, Saviouré A. 2010. Proline: A Multifunctional Amino Acid. *Trends in Plant Science*, 15 (2): 89 – 97.
- Taiz L, Zeiger E. 2002. *Plant Physiology*, 3ra ed. Sunderland, MA.: Sinauer Associates. 690 p.
- Tashiro T, Wardlaw IF. 1990. The Effect of High Temperature at Different Stages of Ripening on Grain Set, Grain Weight and Grain Dimensions in the Semi-dwarf Wheat 'Banks'. *Annals of Botany*, 65 (1): 51 – 61.
- Trenberth KE, Jones PD, Ambenje P, Bojariu R, Easterling D, Klein Tank A, Parker D, Rahimzadeh F, Renwick JA, Rusticucci M, Soden B, Zhai P. 2007. *Observations: Surface and Atmospheric Climate Change*. En: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL. (Eds.). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on*

- Climate Change. Cambridge, Reino Unido y Nueva York, NY, EE.UU: Cambridge University Press. 235 – 336.
- Trenberth KE, Dai A, Rasmussen RM, Parsons DB. 2003. The Changing Character of Precipitation. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 84 (9): 1205 – 1217.
- Trenberth KE, Stepaniak DP, Caron JM. 2002. Interannual Variations in the Atmospheric Heat Budget. *Journal of Geophysical Research*, 107 (D8), 4066. 15 p.
- Trenberth KE. 1997. The Definition of El Niño. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 78 (12): 2771 – 2777.
- Triboï E, Martre P, Triboï-Blondel AM. 2003. Environmentally-Induced Changes in Protein Composition in Developing Grains of Wheat are Related to Changes in Total Protein Content. *Journal of Experimental Botany*, 54 (388): 1731 – 1742.
- Triboï E, Abad A, Michelena A, Lloveras J, Ollier JL, Daniel C. 2000. Environmental Effects on the Quality of Two Wheat Genotypes: 1. Quantitative and Qualitative Variation of Storage Proteins. *European Journal of Agronomy*, 13 (1): 47 – 64.
- Turner AS, Bradburne RP, Fish L, Snape JW. 2004. New Quantitative Trait Loci Influencing Grain Texture and Protein Content in Bread Wheat. *Journal of Cereal Science*, 40 (1): 51 – 60.
- Turner NC. 1986. Adaptation to Water Deficits: A Changing Perspective. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13 (1): 175 – 190.
- Tyree MT. 2003. Matric Potential. En: Stewart BA, Howell TA. (Eds.). *Encyclopedia of Water Science*. Nueva York, EE.UU: Marcel Dekker, Inc. 615 – 617.
- Ugarte C, Calderini DF, Slafer GA. 2007. Grain Weight and Grain Number Responsiveness to Pre-Anthesis Temperature in Wheat, Barley and Triticale. *Field Crops Research*, 100 (2–3): 240 – 248.
- U.S. Census Bureau. 2015. International Programs Data. [En línea] 10 noviembre 2015.  
<http://www.census.gov/population/international/data/index.html>



- Vaseva II, Grigorova BS, Simova-Stoilova LP, Demirevska KN, Feller U. 2010. Abscisic Acid and Late Embryogenesis Abundant Protein Profile Changes in Winter Wheat under Progressive Drought Stress. *Plant Biology*, 12 (5): 698 – 707.
- Vázquez D. 2009. Aptitud Industrial de Trigo. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Serie Técnica No. 177. Montevideo, Uruguay: Hemisferio Sur. 46 p.
- Verma V, Foulkes MJ, Worland AJ, Sylvester-Bradley R, Caligari PDS, Snape JW. 2004. Mapping Quantitative Trait Loci for Flag Leaf Senescence as a Yield Determinant in Winter Wheat under Optimal and Drought-Stressed Environments. *Euphytica*, 135 (3): 255 – 263.
- Vogel KP, Johnson VA, Mattern PJ. 1973. Results of Systematic Analysis for Protein and Lysine Composition of Common Wheats (*Triticum aestivum* L.) in the USDA World Wheat Collection. Research Bulletin 258. Lincoln, Nebraska: University of Nebraska. 27 p.
- Weatherley PE. 1950. Studies in the Water Relations of the Cotton Plant. I. The Field Measurement of Water Deficits in Leaves. *New Phytologist*, 49 (1): 81 – 97.
- Xing-guo M, Yue-qin X, Su-xia L. 1996. Variation of Leaf Stomatal Conductance in Winter Wheat Canopy. *Acta Botanica Sinica*, 38 (6): 467 – 474.
- Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J. 2003. Positional Cloning of the Wheat Vernalization Gene VRN1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (10): 6263 – 6268.
- Yang D, Jing R, Chang X, Li W. 2007. Identification of Quantitative Trait Loci and Environmental Interactions for Accumulation and Remobilization of Water-Soluble Carbohydrates in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Stems. *Genetics*, 176 (1): 571 – 584.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A Decimal Code for the Growth Stages of Cereals. *Weed Research*, 14 (6): 415 – 521.
- Zhang J, Jia W, Yang J, Ismail AM. 2006a. Role of ABA in Integrating Plant Responses to Drought and Salt Stress. *Field Crops Research*, 97 (1): 111 – 119.

Zhang YP, Wang ZM, Wu YC, Zhang X. 2006b. Stomatal Characteristics of Different Green Organs in Wheat under Different Irrigation Regimes. *Acta Agronomica Sinica*, 32 (1): 70 – 75.

Zhao M, Han Y, Feng Y, Li F, Wang W. 2012. Expansins are Involved in Cell Growth Mediated by Abscisic Acid and Indole-3-Acetic Acid under Drought Stress in Wheat. *Plant Cell Reports*, 31 (4): 671 – 685.

## 6. ANEXO

A continuación se presenta un artículo científico que resume los resultados más significativos del estudio realizado. El artículo se presenta según las instrucciones de formato exigidas por la revista *Journal of Experimental Botany*. Las instrucciones de formato están disponibles en el siguiente vínculo Web:

[http://www.oxfordjournals.org/our\\_journals/exbotj/for\\_authors/index.html](http://www.oxfordjournals.org/our_journals/exbotj/for_authors/index.html)

# A Mild Water Deficit after Anthesis Differently Affects the Response of Wheat Cultivars in their Relative Water Content, Stomatal Conductance, and Kernel Weight.

Osvaldo Pérez<sup>1\*</sup>, Luis Viega<sup>2</sup>, Lucía Gutiérrez<sup>2</sup>, Marina Castro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental La Estanzuela, CP 70006, Ruta 50 km 11, Colonia, Uruguay.

<sup>2</sup> Facultad de Agronomía, Universidad de la República (UdelaR), CP 12900, Garzón 780, Montevideo, Uruguay.

\* To whom correspondence should be addressed: E-mail: [operez@inia.org.uy](mailto:operez@inia.org.uy)

## Abstract

The increase in atmospheric temperature and alteration of the hydrological cycle are the main threats of climate change to wheat crop (*Triticum aestivum* L.). Furthermore, when in South America *La Niña* event occurs, the risk of drought stress increases in a greater wheat crop area during grain filling. The aim was to study the response of five wheat cultivars under two levels of irrigation (Control and Stress), from anthesis to physiological maturity. The experiment was conducted in a greenhouse using the spring bread wheat cultivars LE 2249, LE 2331, LE 2333, Baguette Premium 11, and Biointa 1001, which are well known in the southern cone of South America. Relative water content (RWC) and stomatal conductance ( $g_s$ ) were determined during the stress period, and grain yield, its components and the irrigation water use efficiency, at harvest. Two types of response to water deficit were identified in RWC and  $g_s$ , resulting in differential final kernel weights. The cultivar LE 2333 was not affected by the water deficit. Instead, LE 2331 and Biointa 1001 were the most affected cultivars, decreasing their grain yield 21.0% ( $P=0.0206$ ) and 21.2% ( $P=0.0284$ ), respectively. However, an early stress threshold in Biointa 1001 caused that kernel weight and RWC were not affected. Whilst, a belated stress threshold in LE 2331 caused that both traits were affected, as was also the  $g_s$ . Cultivars with the latter type of response would be more suitable for regions with deep soils and/or with high probability of rain after anthesis.

**Keywords:** Abiotic stress, drought stress, relative water content, stomatal conductance, *Triticum aestivum*, water relations.

## Introduction

Wheat (*Triticum aestivum* L.) yield potential is increasing at a relative rate of 0.9% per year (Fischer and Edmeades, 2010); an insufficient rate to feed a population that annually grows 1.1% (<http://www.census.gov/population/international/data/index.html>). To meet this increasing demand of food, the expansion of the agricultural frontier to soils with growth constraints, carries an increasingly risk of drought stress in some regions of the world.

Food security is also threatened by the dynamic of climate, more often 'climate change' adjudicated to global warming (IPCC, 2001). The main threats of climate change are the increasing Earth's surface temperature and the alteration of the hydrological cycle, in particular the characteristics of precipitation and extreme events, this is quantity, frequency, intensity, duration and kind of events (Trenberth *et al.*, 2003). The tendency has been that wet and

dry regions become wetter and drier respectively. In turn, alternating periods of flooding and drought are more often and more intense, related to an enhancement of the pattern of evaporation minus precipitation and its temporal variance (Held and Soden, 2006). From the 1970s in the tropics and subtropics, periods of drought have been more frequently, intense and in broader geographical extents (Trenberth *et al.*, 2007). Particularly, in South America when *La Niña* (the cold phase of the ENSO climate phenomenon) event occurs, the risk of drought stress increases in a greater wheat crop area during grain filling.

Water deficit during grain filling affects the kernel weight (Hochman, 1982; Kobata *et al.*, 1992) and the grain industrial quality (Ozturk and Aydin, 2004). More severe stressors in this period or beginning before anthesis, may also affect the number of fertile tillers and the number of kernels (Izanloo *et al.*, 2008).

The genetics of resistance to drought stress is complex and is also related to other abiotic stresses, as salinity and frost temperatures (Kasuga *et al.*, 1999). Given the complexity to identify which traits are best associated with drought stress response, several physiological traits have been studied: date to anthesis, more a escape strategy than a resistance mechanism (Levitt, 1980); stay-green, related to the chlorophyll content and the onset and rate of senescence (Verma *et al.*, 2004); the amount of water-soluble carbohydrates stored in stems (Yang *et al.*, 2007); ABA content (Sharp *et al.*, 2004); water use efficiency (WUE) (Condon *et al.*, 2002); water potential ( $\Psi_w$ ), osmotic potential ( $\Psi_s$ ) and relative water content (RWC) (Barrs and Weatherley, 1962; Boyer *et al.*, 2008); and stomatal conductance ( $g_s$ ) (Jones, 1977; McDermitt, 1990; Clarke and Clarke, 1996; Rebetzke *et al.*, 2000).

Despite that RWC underestimates the plant water content when is measured in plants that present osmotic adjustment (*i.e.*, a lower  $\Psi_s$ ), it is a useful and easy to measure indicator of plant water status

(Boyer *et al.*, 2008). Moreover, the  $g_s$  is an indicative trait of the water vapour flux from the plant to the atmosphere. Despite the fact that measuring the  $g_s$  is an easy and not destructive technique, the time between measurements can be delayed. The disadvantage is that the  $g_s$  measurements are largely influenced by environmental conditions, this is radiation, air temperature, vapour pressure deficit (VPD) and leaf  $\Psi_w$  (Jones, 1977; McDermitt, 1990; Clarke and Clarke, 1996; Rebetzke *et al.*, 2000).

Even a mild water deficit during grain filling would promote differential responses in the morphological and physiological traits of different genotypes. The aim was to subject five well known cultivars in the southern cone of South America from anthesis to physiological maturity to two levels of irrigation (Control and Stress), to study as a whole the relationship among yield and its components, the irrigation WUE, RWC and  $g_s$ . Different types of response in time are discussed, which could be useful for a better understanding of the plant ideotype that best fits to mild water stress after anthesis.

## Materials and Methods

### Plant material

Five spring bread wheat cultivars, Baguette Premium 11, Biointa 1001, LE 2249, LE 2331, and LE 2333 were evaluated under two levels of irrigation. These five cultivars were chosen because in two previous experiments showed a differential response to water deficit (Castro and Vázquez, 2010; Hoffman *et al.*, 2011).

### Experimental design

The experiment was located at the Experimental Station INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay (34°20'15" S; 57°41'29" W), in a greenhouse equipped with fan and pad evaporative cooling system. The experimental design was a randomized complete block with three replications. A factorial arrangement of treatments with five cultivars and two levels of irrigation were evaluated. The experimental unit consisted of 24 plants seeded in six pots (four plants per pot) placed on a plastic tray of 0.60×0.40×0.10 m. The pots used were PVC tubes of 0.16 m of inner diameter and 0.30 m of height. A metal grid of fine mesh was placed in the base of each tube to contain the substrate. The substrate used was a mixture (1:1:1) of a silty clay loam soil, sand, and

organic substrate (BioFer Almácigos, Riverfilco S.A., Montevideo, Uruguay).

The experiment was sown (27 June) with eight seeds per pot and thinned to four seedlings per pot after implantation. The plants received 8 to 6 hours of artificial illumination with sodium vapour lamps of high pressure (SON-T 400 W, Philips, Belgium).

The experiment was watered once or twice a week according to the weighted average evapotranspiration ( $ET$ ) of the five cultivars. When 50% of the plants of each cultivar and of each block reached the anthesis stage, two levels of irrigation (Control and Stress) were applied. The Stress treatment was watered with 50% of Control treatment. Both irrigation treatments were applied until each Control experimental unit reached maturity.

The amount of water to irrigate the Control treatment was defined according to the maximum water holding capacity of a sample of oven-dried substrate (12.8% of initial moisture content). The dried sample substrate was put in an extra pot and was slowly watered until saturation. After 24 h, once the substrate in the pot stopped draining, it was weighted to calculate its maximum water holding capacity (1 L per pot).

The  $ET$  of the Control treatment was estimated from ten additional pots, which were divided in two check trays and sown with the five cultivars (one cultivar per pot and tray). The check trays were placed on each side of the experiment (blocks 1 and 3 respectively). The  $ET$  of the check trays was estimated by the difference between the pot weight at maximum water holding capacity and the pot weight immediately before each irrigation treatment.

The experiment was watered by the average  $ET$  of the check trays until 13 August. After that, the irrigations were blocked due to the increase of the  $ET$  gradient among blocks, which was caused by the increased temperature and decreased air humidity in the greenhouse as the growing season proceeded. The airflow around block 1, nearest to the pad evaporative cooling system, was colder and wetter than the airflow around the block 3, nearest to the fans. Thus, blocks 1 and 3 were watered according to the  $ET$  of the check trays, while the block 2 was watered by the average of blocks 1 and 3.

At tillering stage GS 2.2 (Zadoks *et al.*, 1974), each pot was fertilized with 0.5 mL of N-P-K (12-8-5, foliar fertilizer NPK micronutrients, Industria Sulfúrica S.A., San José, Uruguay) diluted in 0.42 L of water. At the end of stem elongation (GS 3.7 to 3.9), the same doses of fertilizer was repeated but applied on the trays and diluted in 5 L per tray.

Trips (INSECTA: Thysanoptera) were controlled alternating five applications of two active ingredients, Malathion (1.2 mL i.a. L<sup>-1</sup>) and Acephate (1 g i.a. L<sup>-1</sup>). Acarus (ARACHNIDA: Prostigmata) were controlled with one application of Clofentezine (0.18 mL i.a. L<sup>-1</sup>). For controlling powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*), 4 g L<sup>-1</sup> of wettable sulphur (Beltrame & Co, Montevideo, Uruguay) was applied.

### Measurements

The RWC = [Fresh weight – Dry weight] × 100 / [Turgid weight – Dry weight] was determined according to Barrs and Weatherley (1962) once a week from anthesis to physiological maturity. The  $g_s$  (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) was measured with a steady-state diffusion porometer (SC-1, Decagon Devices, Inc., Pullman, WA) during the same period and frequency that RWC. The measurements of both traits were always carried out in the morning and before irrigation.

RWC was determined in sections (2 to 3 cm) of three blades per experimental unit. The blades were sampled from leaves below the flag leaf (FL-1) of main shoot of three plants of different pots. The fresh, turgid and dry weights of the three blade sections were determined. Due to a mistake of manipulation the last sampling of blades in Baguette Premium 11 was discarded. The  $g_s$  was measured in the middle of the adaxial side of the flag leaf (FL) of main shoot in three plants of different pots.

After harvest, the dry matter of aerial biomass plant<sup>-1</sup> (biomass plant<sup>-1</sup>), spikes plant<sup>-1</sup>, kernels spike<sup>-1</sup>, kernel weight and grain yield plant<sup>-1</sup> were determined; and kernels plant<sup>-1</sup>, harvest index, and irrigation WUEs on yield and aerial biomass (IWUE<sub>YI</sub> and IWUE<sub>BI</sub> respectively) were calculated. The irrigation water, denominator of the IWUE, was not discriminated in transpired water and evaporated water.

### Data analysis

For all traits, except RWC and  $g_s$ , the statistical model (M1) used was:  $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + (\alpha\gamma)_{ij} + \beta_k + e_{ijk}$ , where  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ , and  $e$ , are the mean, irrigation treatments, cultivars, blocks, and the errors, respectively. To determine if there were treatment and interaction effects, a significance level of  $P < 0.05$  was considered for all traits. To identify mean differences among cultivars, the test of Tukey for balanced data and the Tukey–Kramer test for unbalanced data were performed. Also, orthogonal contrast tests were performed to discriminate interactions between cultivars and irrigation treatments.

For the repeated measurements in time of RWC and  $g_s$ , the statistical model (M2) used was:  $Y_{ijkn} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + (\alpha\gamma)_{ij} + \beta_k + e(a)_{ijk} + s(\alpha\gamma\beta)_{ijk} + \tau_n + (\alpha\tau)_{in} + (\gamma\tau)_{jn} + (\alpha\gamma\tau)_{ijn} + e(b)_{ijkn}$ , where the first four terms are the same that were mentioned above (M1),  $s$  is a between-subjects random effect,  $\tau$  is the effect of days of initiated the irrigation treatments (DIIT), and  $e(a)$  and  $e(b)$  are the errors  $a$  and  $b$ , respectively. Additionally, in the statistical model for  $g_s$ , the VPD was included as a covariate. The VPD was calculated with the empirical exponential model of Prenger and Ling (2001), employing the hourly registers of temperature and air relative humidity at the times that the measurements of  $g_s$  were performed.

For both traits (RWC and  $g_s$ ) the covariance structure with different models was analyzed. For the estimation of means, because of its good fit according with the likelihood ratio test (LRT) and the Akaike

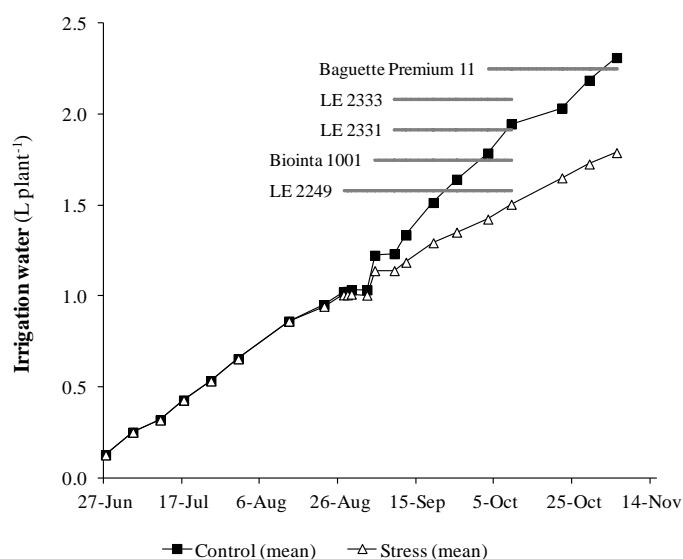
and Bayesian information criteria (AIC and BIC respectively), it was chosen the model spatial power law [SP(POW)] with the Kenward–Roger adjustment, recommended for repeated measurements taken at unequal times, correlations that decline over time, unbalanced data and multiple random effects (Littell *et al.*, 2006).

Moreover, the repeated measurements in time of RWC were fitted iteratively by least squares to the exponential model:  $bo + A [1 - e^{(-k * \text{Days of stress})}]$  (Orskov and McDonald, 1979). The model indicates how the RWC decreases during grain filling and how the decreasing is accelerated towards the senescence. The first parameter of the model (bo) indicates the RWC at anthesis, the second (A) the linear rate of decrease of the RWC, and the third parameter (k) indicates the RWC exponential decrease. The higher the water stress, the greater are the parameters A and k, whereas greater is the influence of A respect to k in the RWC decrease. To identify differences among treatments, the parameters estimated by the fitted model were subjected to the *t* test of Welch–Satterthwaite.

All data were analyzed with the *PROC MIXED* statistical procedure of the software SAS® version 9.2 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). In turn, the data of RWC were fitted to the model of Orskov and McDonald (1979) using the software InfoStat® version 9.0 (InfoStat Group, FCA, National University of Cordoba, Argentina).

## Results and Discussion

Significant differences in the cumulative mean irrigation water between Control and Stress treatments are identified ( $P < 0.0001$ ) (Figure 1). Differences among cultivars are also identified ( $P < 0.0001$ , data not shown), mainly due to their differences of phenological development. Interaction between cultivars and irrigation treatments is not identified ( $P = 0.6049$ , data not shown), because Stress treatment was always irrigated at 50% of Control.



**Figure 1.** Cumulative mean irrigation water ( $L\ plant^{-1}$ ) from sowing to physiological maturity of five wheat cultivars, according to two irrigation treatments (Control and Stress) applied during the grain filling of each cultivar (period indicated by horizontal lines).

The Control treatment was irrigated with a cumulative mean of  $2\ L\ planta^{-1}$ , whilst the Stress treatment was irrigated with  $1.5\ L\ planta^{-1}$  (Figure 1). The cumulative irrigation water was 2.10, 1.79, 1.70, 1.72, and  $1.66\ L\ plant^{-1}$ , for cultivars Baguette Premium 11, LE 2331, Biointa 1001, LE 2333, and LE 2249, respectively (data not shown). These differences among cultivars are mostly due

to Baguette Premium 11, the cultivar that shows the higher use of irrigation water ( $P < 0.05$ ) related to its longest cycle to physiological maturity in greenhouse conditions (126 days). For this reason, the last watering applied to Baguette Premium 11 was on 5 November, whereas to the other cultivars was applied on 9 October.

Four of the five studied cultivars shortened their cycle length because in the greenhouse were exposed to higher temperatures and daylight hours of what they would have been exposed in field conditions (Slafer, 2012). However, Baguette Premium 11 did not shorten its cycle length, being similar to that observed in field trials conducted in the same location and in approximate dates of emergency (Castro *et al.*, 2010, 2011). Also indicative of the insensitivity of Baguette Premium 11 to photoperiod are the results of Gómez *et al.* (2014).

Moreover, in an environment where the temperature was higher than in the field, Baguette Premium 11 did not shorten its

cycle also because of certain vernalization requirements (Miralles, 2006; Slafer, 2012). In this regard, it has been reported that Baguette Premium 11 has the allelic combination *Vrn-A1b*, *vrn-B1* and *vrn-D1*, orthologous genes of the vernalization gene *VRN-1*, located in the chromosomes 5A, 5B and 5D respectively (Kohli and Frascina, 2009; Gómez *et al.*, 2014).

The traits spikes plant<sup>-1</sup>, kernels spike<sup>-1</sup>, and kernels plant<sup>-1</sup> are not affected by the Stress treatment (Table 1). This is because these yield components are determined before anthesis (Hochman, 1982; Kobata *et al.*, 1992). However, for the three mentioned traits statistically significant differences among cultivars are shown (Table 1).

**Table 1.** Least square means of two irrigation treatments and five wheat cultivars. The traits observed are spikes plant<sup>-1</sup> (SP PL<sup>-1</sup>), kernels spike<sup>-1</sup> (KE SP<sup>-1</sup>), kernels plant<sup>-1</sup> (KE PL<sup>-1</sup>), grain yield plant<sup>-1</sup> (YI PL<sup>-1</sup>), dry matter of aerial biomass plant<sup>-1</sup> (BI PL<sup>-1</sup>), and irrigation water use efficiencies on yield (IWUE<sub>YI</sub>) and aerial biomass (IWUE<sub>BI</sub>).

Treatments	Least square means						
	SP PL <sup>-1</sup>	KE SP <sup>-1</sup>	KE PL <sup>-1</sup>	YI PL <sup>-1</sup>	BI PL <sup>-1</sup>	IWUE <sub>YI</sub>	IWUE <sub>BI</sub>
				----- g -----	----- g L <sup>-1</sup> -----		
<b>Irrigation</b>							
Control	2.2	30.3	67.0	2.7 A	6.2 A	1.37 B	3.08 B
Stress	2.2	30.2	63.7	2.4 B	5.6 B	1.56 A	3.60 A
<b>Cultivar</b>							
Baguette Premium 11	2.0 b	25.4 a	49.5 a	1.9 a	6.5 b	0.96 a	3.19 a
Biointa 1001	2.2 b	30.5 a	67.2 bc	2.9 bc	5.9 ab	1.68 c	3.48 ab
LE 2249	2.6 c	26.2 a	69.5 bc	2.5 abc	5.2 a	1.52 bc	3.21 a
LE 2331	2.8 c	29.9 a	83.4 c	3.1 c	6.7 b	1.73 c	3.76 b
LE 2333	1.5 a	39.4 b	57.1 ab	2.4 ab	5.1 a	1.43 b	3.06 a

Different capital and small letters in columns indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) between irrigation treatments and among cultivars (mean of Control and Stress treatments), respectively. The differences among cultivars are identified by the test of Tukey for balanced data, or by the Tukey–Kramer test for unbalanced data (SP PL<sup>-1</sup> and KE SP<sup>-1</sup>).

The highest means of spikes plant<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ ) are observed in cultivars LE 2249 and LE 2331, 2.6 and 2.8 spikes plant<sup>-1</sup>, respectively (Table 1). Conversely, LE 2333 shows the lowest mean among the five cultivars, 1.5 spikes plant<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ ). This cultivar would be particularly sensitive to decrease its tillering under high temperature conditions (Hoffman *et al.*, 2007).

Although no significant differences between irrigation treatments are observed in kernels plant<sup>-1</sup>, the cultivar Biointa 1001 obtained 74 and 61 kernels plant<sup>-1</sup>, in the Control and Stress treatments respectively (data not shown). This is indicative that Biointa 1001 may have had a minor synchronisation in the emission of fertile tillers, suggesting that the late-flowering



spikelets would have aborted, considering that the Stress treatment started at 50% of plants in anthesis. In this sense, mainly in high temperature conditions Bointa 1001 can begin early its tillering, but subsequently desynchronised spikes are generated (Hoffman *et al.*, 2007).

Grain yield plant<sup>-1</sup> and kernel weight are significantly affected by the Stress treatment (Table 1). A significant interaction between cultivars and irrigation treatments is observed for kernel weight ( $P=0.0188$ ) (Table 2), but not for yield plant<sup>-1</sup> ( $P=0.3086$ , data not shown). The absence of interaction in yield plant<sup>-1</sup>, is indicative that the lost of yield caused by the water deficit during grain filling was compensated by the

components that were determined previously to the beginning of Stress treatment (*i.e.*, spikes plant<sup>-1</sup> and kernels spike<sup>-1</sup>). In this regard, it is observed that those cultivars with greater number of kernels plant<sup>-1</sup> show a lower kernel weight and a greater decrease in that weight caused by the Stress treatment (Tables 1 and 2). Furthermore, the differences of kernel weight among cultivars are stronger in the Stress treatment than in the Control treatment (Table 2). Thus, resistant cultivars under a moderate water deficit after anthesis, could be hardly identifiable if only the yield is studied, being at least also recommended studying the kernel weight.

**Table 2.** Least square means and contrasts for kernel weight and harvest index of the interaction between two irrigation treatments and five wheat cultivars. The estimated differences between the irrigation treatments [ $\Delta$  (Stress – Control)] are expressed as the percentage of decrease with respect to the Control [ $(\Delta/\text{Control})\times 100$ ].

Treatments		Kernel weight			Harvest index		
		Mean (mg)	( $\Delta/\text{Control}$ ) $\times 100$	$P> t $	Mean	( $\Delta/\text{Control}$ ) $\times 100$	$P> t $
<b>Irrigation</b>							
	Control (C)	41.0			0.442		
	Stress (S)	37.8	<b>-8.0%</b>	*	0.431	-2.5%	ns
<b>Cultivar</b>							
Baguette	C	40.4			0.292		
Premium 11	S	37.7	-6.7%	ns	0.307	5.1%	ns
Bointa 1001	C	43.6			0.492		
	S	41.8	-4.0%	ns	0.472	-4.0%	ns
LE 2249	C	37.9			0.481		
	S	33.9	<b>-10.4%</b>	*	0.467	-2.9%	ns
LE 2331	C	41.6			0.484		
	S	33.0	<b>-20.7%</b>	*	0.436	<b>-10.1%</b>	*
LE 2333	C	41.9			0.459		
	S	42.5	1.6%	ns	0.471	2.6%	ns

\* = significant ( $P<0.05$ ); ns = non-significant

In an experiment conducted in similar conditions with seven cultivars (Castro and Vázquez, 2010), Bointa 1001 and LE 2249 showed similar results with the present study. The cultivar Bointa 1001 showed susceptibility to water deficit, whereas LE 2249 showed a moderate resistance. In turn,

for kernel weight a significant interaction between cultivars and irrigation treatments was also identified. However, unlike the present study, in that experiment the kernels plant<sup>-1</sup> were significantly affected. One important difference in that experiment is that watering was stopped twice during the

grain filling period. Thus, it seems that a more severe stress would mostly affect the kernels  $\text{plant}^{-1}$ , whereas a more moderate stress would mostly affect the kernel weight.

The cultivars LE 2331, Biointa 1001 and LE 2249 show the highest yield  $\text{plant}^{-1}$  under greenhouse conditions ( $P < 0.05$ ) (Table 1). Kernel weight is only decreased in the cultivars LE 2249 and LE 2331, 10.4% ( $P = 0.0361$ ) and 20.7% ( $P = 0.0001$ ), respectively (Table 2). Nonetheless, the water deficit caused a decrease in the yield  $\text{plant}^{-1}$  of Biointa 1001 (21.2%,  $P = 0.0284$ ), similarly to the decrease of LE 2331 (21.0%,  $P = 0.0206$ ) (data not shown). Thereby, the decrease of the yield  $\text{plant}^{-1}$  of Biointa 1001 could be explained by a non-significant decrease of all its yield components (data not shown). The yield  $\text{plant}^{-1}$  of LE 2249, Baguette Premium 11 and LE 2333 is decreased in 12.5% ( $P = 0.2616$ ), 6.3% ( $P = 0.6657$ ) and -0.1% ( $P = 0.9913$ ), respectively (data not shown).

The cultivars Baguette Premium 11 and LE 2333 did not decrease their kernel weight relative to the Control treatment (Table 2), probably because they show the lowest cultivar means for kernels  $\text{plant}^{-1}$  and yield  $\text{plant}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ) (Table 1). Although, both cultivars differ in their cultivar means of 2.0 and 1.5 spikes  $\text{plant}^{-1}$ , and of 25.4 and 39.4 kernels  $\text{spike}^{-1}$ , respectively ( $P < 0.05$ ). The low number of kernels  $\text{spike}^{-1}$  of Baguette Premium 11 (25.4) is possibly due to the low accumulation of vernalization hours in the greenhouse. This is explained because the number of spikelets per spike differs considerably with the response of cultivars to vernalization (Halse and Weir, 1970). On the other hand, as was mentioned before, LE 2333 would be a cultivar with a particularly sensible tillering capacity to high temperatures.

The biomass  $\text{plant}^{-1}$  shows a decrease of 11.0% ( $P = 0.0045$ ) due to the Stress treatment (Table 1). Differences among cultivars are also observed ( $P = 0.0004$ ), being LE 2333, LE 2249 and Biointa 1001 the cultivars with the lowest biomass  $\text{plant}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ) (Table 1). Interaction between

cultivars and irrigation treatments is not identified for biomass  $\text{plant}^{-1}$  ( $P = 0.6067$ ). Nonetheless, in Biointa 1001 and mainly in LE 2331, an early senescence shown by reddish-green hues in the bottom leaves was observed, which could have limited the source capacity of these two cultivars during the stress period.

Relative to this, the water was not irrigated according to the own demand of each cultivar, but rather to the mean demand of the five cultivars. Hence, the cultivars that show a greater biomass  $\text{plant}^{-1}$  had to adjust their use of water with the same volume of given water to cultivars of minor biomass  $\text{plant}^{-1}$  production.

For harvest index, differences among cultivars and interaction between cultivars and irrigation treatments are statistically significant ( $P < 0.0001$  and  $P = 0.0405$ , respectively). Only the harvest index of cultivar LE 2331 is affected by the Stress treatment, decreasing in 10.1% ( $P = 0.0039$ ) (Table 2). Instead, the harvest index of Biointa 1001 is not affected ( $P = 0.1992$ ), despite that the yield  $\text{plant}^{-1}$  and biomass  $\text{plant}^{-1}$  are not significantly different of LE 2331 ( $P < 0.05$ ) (Tables 1 and 2). This is explained because the Stress treatment caused a greater decrease of biomass  $\text{plant}^{-1}$  in Biointa 1001 (17.9%,  $P = 0.0239$ ) than in LE 2331 (11.9%,  $P = 0.0905$ ) (data not shown). The cultivar Baguette Premium 11 shows the lowest harvest index ( $P < 0.05$ ) (Table 2). This is related to its low number of kernels  $\text{plant}^{-1}$ , which probably caused a greater partition of photosynthates to shoots and roots.

Both,  $\text{IWUE}_{\text{YI}}$  and  $\text{IWUE}_{\text{BI}}$  are significantly increased by effect of Stress treatment ( $P = 0.0017$  and  $P < 0.0001$ , respectively) (Table 1). A minor increase is observed in the  $\text{IWUE}_{\text{YI}}$  than in the  $\text{IWUE}_{\text{BI}}$ , 13.8 and 17.1% respectively. In turn, significant differences among cultivars are also observed for both traits,  $\text{IWUE}_{\text{YI}}$  and  $\text{IWUE}_{\text{BI}}$  ( $P < 0.0001$  and  $P = 0.0010$ , respectively). Conversely, interaction between cultivars and irrigation treatments is not identified ( $P = 0.3564$  and  $P = 0.7871$ ,

respectively).

Similar to the response with yield plant<sup>-1</sup>, the highest IWUE<sub>YI</sub> are observed in cultivars LE 2331, Biointa 1001 and LE 2249 ( $P < 0.05$ ) (Table 1). Also, the highest IWUE<sub>BI</sub> are observed in LE 2331 and Biointa 1001 ( $P < 0.05$ ), but not in LE 2249 that shows the minor IWUE<sub>BI</sub> together with the cultivars Baguette Premium 11 and LE 2333 ( $P < 0.05$ ). Particularly, relative to the gap of IWUE<sub>BI</sub> (Control vs Stress) and compared to the other cultivars, LE 2331 shows a minor gap of IWUE<sub>YI</sub> between both irrigation treatments (data not shown). This is related to the fact that by effect of Stress treatment, LE 2331 shows a greater decrease of yield plant<sup>-1</sup> than of biomass plant<sup>-1</sup>. In turn, this could be related to a minor reduction of the transpiration ( $T$ ) rate of LE 2331, sustained by a 30.3% lengthening of roots because of Stress treatment ( $P = 0.0438$ , data not shown).

A cultivar with high WUE is not necessarily associated to drought stress resistance (Blum, 2009). A high WUE may be due to a high yield potential with a moderate use of water, or may be due to a moderate yield potential with a discrete use of water. In this regard, the irrigation water as indicator of water use (*i.e.*,  $T$ ), shows that LE 2331 and Biointa 1001 are cultivars with high WUE, but that also use a high volume of water (Table 1). Hence, these are examples of genotypes of high yield potential and high WUE, but that are not resistant to drought stress.

The results of the ANOVA test indicate a significantly decrease of RWC by effect of Stress treatment ( $P = 0.0016$ ), while differences among cultivars ( $P = 0.0031$ ) and among DIIT ( $P < 0.0001$ ) are also indicated (data not shown). All the combined interactions are statistically significant, except between irrigation  $\times$  cultivar ( $P = 0.0589$ ) (data not shown).

The mean RWC shows an exponential decrease with DIIT, as indicate the fitted model for all treatments (Figure 2, Table 3). The model is significantly correlated ( $P < 0.0001$ ) with the adjusted treatment

means (irrigation  $\times$  cultivar), with the exception of the cultivar Baguette Premium 11 in the Stress treatment ( $r = 0.48$ ,  $P = 0.0711$ ) (Table 3). For this reason, and due to the last sample of leaf blades had to be discarded by a mistake of manipulation, the data of Baguette Premium 11 were not included in Figure 2.

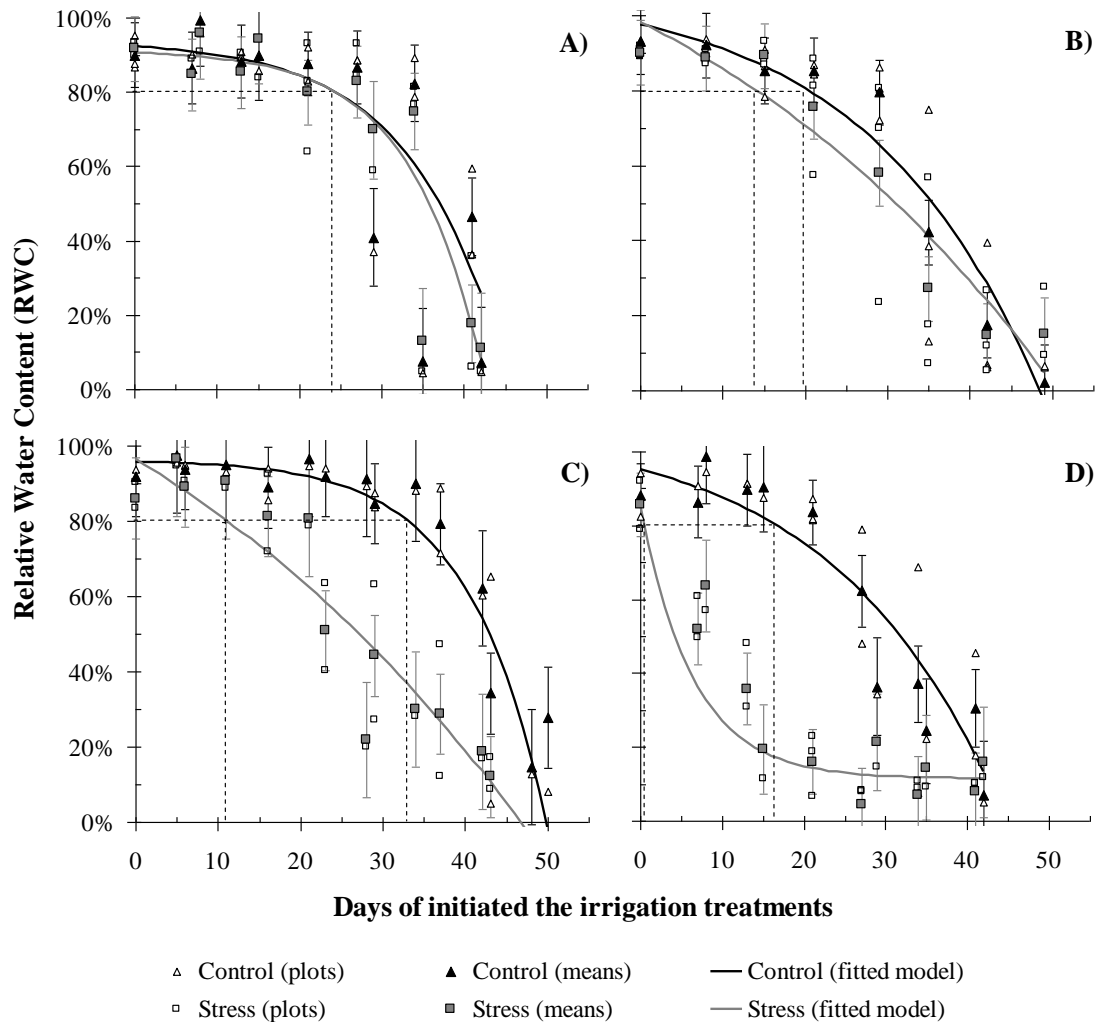
The dotted lines indicate for each combination of cultivar and irrigation treatment, the DIIT in that the RWC is decreased below 80% (Figure 2), level indicated as the moment in which the normal physiology of the plant begins to be affected (Lawlor and Cornic, 2002). According to the fitted model for the mean of cultivars in the Control treatment [ $RWC = 0.9365 + 0.0640(1 - e^{-(-0.0557x)})$ ], after 20 DIIT the RWC is decreased to around 80%. While at the same time (20 DIIT), the RWC calculated with the model is 61.4% [ $RWC = 0.9083 + 0.8273(1 - e^{-(-0.0152x)})$ ], for the mean of cultivars in the Stress treatment. RWC values below 80% promote a general metabolic inhibition (*e.g.*, a lower activity of the sucrose phosphate synthase and of protein synthesis) (Lawlor and Cornic, 2002). The early dehydration of leaf tissues in the Stress treatment would be an explanation for the decrease observed in kernel weight (Table 2).

At anthesis (day 0) significant differences of RWC between irrigation treatments are not observed ( $P = 0.9998$ , data not shown). The means ranged from 85.6 to 93.0%, values below those reported by Izanloo *et al.* (2008) in well-watered conditions (94.5 to 97.5%). A possible explanation of this difference is that the measurements in the present study were always performed immediately before each watering.

The interaction among DIIT  $\times$  irrigation  $\times$  cultivar ( $P = 0.0184$ , data not shown) indicate that cultivars show a different response through the time according to the irrigation treatments. Two types of contrasting responses in the evolution of RWC are identified: 1) LE 2333 and Biointa 1001 that show a similar evolution of RWC in both irrigation treatments (Figure 2A and

B); and 2) LE 2249 and LE 2331 that instead show an early decrease of RWC in the Stress treatment (Figure 2C and D). Despite the fact that in the Stress treatment Baguette

Premium 11 does not show a significant fit to the model, its response is intermediate between that of cultivars LE 2333 and Biointa 1001 (Table 3).



**Figure 2.** Repeated measurements in time of relative water content (RWC) of leaf blades below the flag leaf (FL-1), according to days after anthesis when two irrigation treatments (Control and Stress) were applied to four wheat cultivars: A) LE 2333, B) Biointa 1001, C) LE 2249 and D) LE 2331. The white figures indicate plot averages of three FL-1, the solid means ( $n=3$ ), the vertical bars the standard errors, the solid lines the fitted model of Orskov and McDonald (1979), and the dotted lines the days after anthesis in that the RWC is decreased below 80% according to the applied irrigation treatments.

In the first type of response, the RWC of LE 2333 and Biointa 1001 are not affected by the Stress treatment (Figure 2A and B). Nonetheless, to the extent that the DIIT happened, the decrease of RWC is slower in

LE 2333 than in Biointa 1001 (see dotted lines in Figure 2). Another difference with Biointa 1001 is that the cultivar LE 2333 is also little affected by the Stress treatment in the other studied traits.

**Table 3.** Values and standard errors of the parameters calculated by the exponential model of Orskov and McDonald (1979), fitted to estimate the Relative Water Content (RWC) =  $bo + A [1 - e^{-(k * \text{Days of stress})}]$  of five wheat cultivars in two irrigation treatments. The coefficient of Pearson ( $r$ ) indicates the correlation between the observed values and the predicted values by the model.

Cultivar	Irrigation treatment	Estimation of parameters						Correlation		
		bo		A		k		n	r	P
LE 2333	Control	0.923 (0.077)	ns	0.016 (0.033)	a	-0.090 (0.050)	abc	21	0.76	<0.0001
	Stress	0.905 (0.060)	ns	0.007 (0.012)	a	-0.113 (0.040)	abc	21	0.86	<0.0001
Biointa 1001	Control	0.976 (0.063)	ns	0.107 (0.095)	a	-0.048 (0.017)	abc	23	0.91	<0.0001
	Stress	0.983 (0.083)	ns	0.567 (0.700)	a	-0.020 (0.018)	cd	23	0.87	<0.0001
LE 2249	Control	0.958 (0.043)	ns	0.005 (0.006)	a	-0.106 (0.024)	ab	22	0.92	<0.0001
	Stress	0.965 (0.076)	ns	0.776 (1.217)	a	-0.017 (0.019)	cd	20	0.90	<0.0001
LE 2331	Control	0.952 (0.073)	ns	0.121 (0.151)	a	-0.049 (0.026)	abc	21	0.87	<0.0001
	Stress	0.856 (0.130)	ns	-0.742 (0.206)	b	0.155 (0.114)	bd	21	0.93	<0.0001
Baguette Premium 11	Control	0.854 (0.028)	ns	0.001 (0.002)	a	-0.233 (0.104)	ac	15	0.89	<0.0001
	Stress	0.886 (0.115)	ns	0.080 (0.416)	a	-0.061 (0.158)	abc	15	0.48	0.0711

The values in parentheses are standard errors.

The letters in columns indicate for each parameter, the differences among the irrigation × cultivar treatments according to the  $t$  test of Welch–Satterthwaite ( $P < 0.05$ ). ns: non-significant.

In the second type of response, cultivars LE 2249 and LE 2331, the RWC decreases from the beginning of grain filling because of Stress treatment. However, also in the Stress treatment, LE 2249 decreases its RWC with a lower linear rate than LE 2331, as is indicated by a higher parameter A ( $P < 0.05$ ) (Figure 2C and D, Table 3). Thus, the water status of cultivar LE 2331 would have been the most affected because of Stress treatment. Moreover, LE 2249 is the only cultivar in which significant differences between irrigation treatments are observed for the exponential rate of RWC decrease ( $P < 0.05$ ), indicated by the parameters k (Table 3). This means that the cultivar LE 2249 shows a more delayed but more rapid decrease of RWC in the Control treatment, with respect to the decrease in the Stress treatment (Figure 2C).

Despite Biointa 1001 and LE 2331 are the cultivars that show the greatest decrease of yield  $\text{plant}^{-1}$  (Table 1), both show a different type of response in the evolution of RWC. One possible explanation for this difference, is that Biointa 1001 is affected

by a non-significant decrease of all its yield components (as was mentioned before), whereas LE 2331 is mainly affected in kernel weight (Table 2). Also, an early wilting of the basal leaves affected the biomass  $\text{plant}^{-1}$  of Biointa 1001. Thus, a lower surface of transpiration and the fact that the measurements of RWC were carried out in the leaf blade below the flag leaf, are reasons that could explain the maintenance of RWC of Biointa 1001 in both irrigation treatments (Figure 2B). Given that Biointa 1001 shows a conservative and susceptible type of response (early stress threshold), is an unwanted response for cultivars that grow in drought prone environments.

Unlike Biointa 1001, a belated stress threshold in cultivars LE 2249 and particularly in LE 2331, would have been the cause of the rapid RWC decrease of both cultivars, and also the cause of that were the only cultivars affected in kernel weight (Table 2, Figure 2B, C and D). Even with different stress threshold in time, evolution of RWC, and kernel weight, the three mentioned cultivars show the highest yield

plant<sup>-1</sup> and IWUE<sub>YI</sub> ( $P < 0.05$ ) (Table 1). These results agree with the statement that some cultivars of high WUE, frequently are more susceptible to drought stress because require a high use of water (Blum, 2009).

One possible reason to explain why LE 2249, and mainly LE 2331 show a belated stress threshold, is that both cultivars may have mobilized during the stress period, a greater amount of water-soluble carbohydrates stored in the stems before anthesis (Yang *et al.*, 2007). Greater mobilization of carbohydrates during the stress period may have stimulated the sink strength, and hence these cultivars may have maintained their rate of dry matter accumulation for a longer time (Blum, 1998). The type of response for both mentioned cultivars, mainly LE 2331, could be considered positive, as long as a stress was not so intense and/or extended. This is because in drought stress environments, to the extent that a high rate of growth is sustained, the kernel weight is finally affected.

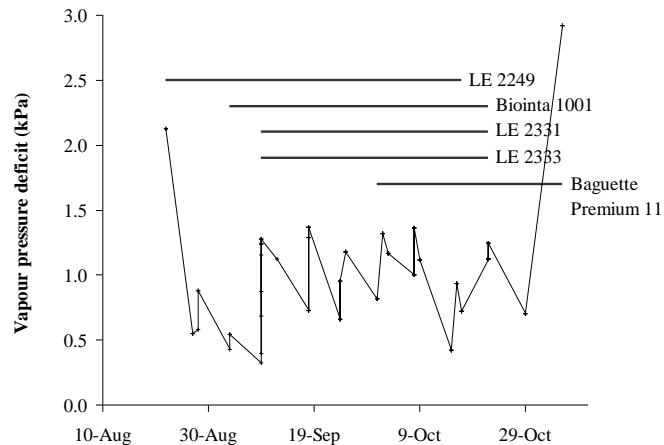
The model parameters adjusted for the five cultivars in the Control treatment are not differentiated by the *t* test of Welch–Satterthwaite (Table 3). Nonetheless, the means differences of RWC among DIIT indicate that the dehydration and senescence began later in LE 2249 and LE 2333 than in the other cultivars (data not shown). Also in the Control treatment, both cultivars are the only that maintained their RWC above 80% beyond 20 days after anthesis (Figure 2A and C). As was described, the difference between both cultivars is observed in the type of response to Stress treatment, being LE 2333 the less affected.

The type of response in the evolution of RWC of LE 2333 could be due to resistance or by a lower yield potential related to a lower rate of *T*. Nonetheless, LE 2333 would be more resistant than LE 2249 because despite that between both cultivars differences of yield plant<sup>-1</sup> and biomass plant<sup>-1</sup> are not observed (Table 1), at difference of LE 2333, the cultivar LE 2249 shows a significant decrease of kernel

weight, and of RWC (Table 2, Figure 2A and C). Thus, with an intermediate IWUE<sub>YI</sub>, LE 2333 maintained higher RWC values for a longer period of time than the other four cultivars (Table 1, Figure 2). Still considering that the  $\Psi_s$  was not measured in this experiment, one possible mechanism to explain the evolution of RWC in LE 2333 is that this cultivar may have maintained its turgidity ( $\Psi_p$ ) by osmotic adjustment (Boyer *et al.*, 2008).

For  $g_s$ , the results of the ANOVA test indicate a significant decrease caused by effect of Stress treatment, differences among cultivars, and differences among DIIT ( $P < 0.0001$ , respectively) (data not shown). Also, the test indicates significant interactions for irrigation  $\times$  cultivar ( $P = 0.0184$ ), and for the other three combined interactions with DIIT ( $P < 0.001$ , respectively) (data not shown). In turn, a significant effect of VPD over the  $g_s$  measurements is also indicated ( $P = 0.0045$ , data not shown). The effect of the oscillation of VPD (Figure 3), is consistent with the observations of Jones (1977), McDermitt (1990), Clarke and Clarke (1996) and Rebetzke *et al.* (2000), who argued that the oscillation of the  $g_s$  measurements are strongly affected by the radiation and above all, by the daily and hourly oscillation of VPD of air (*i.e.*, temperature and humidity). Nonetheless, the standard errors of the  $g_s$  measurements were within 21.6 to 46.4 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Figure 4), not a wide range for a trait which may have deviations due to the environment.

The first measurement of  $g_s$  was done in LE 2249, and the last in Baguette Premium 11 (Figure 3). At that time, the VPD was 2.12 and 2.92 kPa, respectively. Both registries were particularly high because the fan and pad cooling system were not running at that time. Except for both registries, the greenhouse VPD was  $0.91 \pm 0.32$  kPa (mean  $\pm$  SD). This indicates that the greenhouse VPD showed an adequate range of values for a normal grain filling (López-Morales *et al.*, 2008).

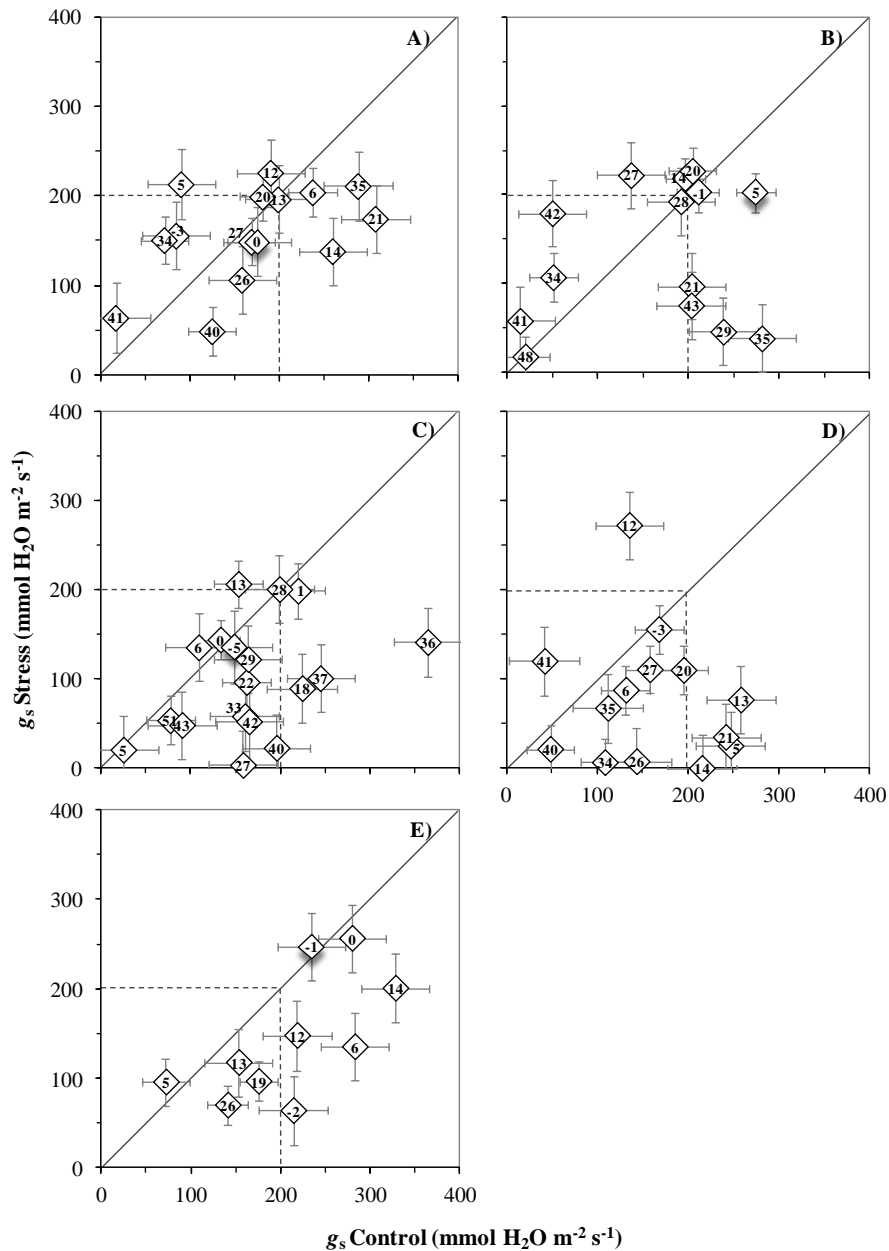


**Figure 3.** Vapour pressure deficit (kPa) in the greenhouse when repeated measurements in time of stomatal conductance ( $g_s$ ) were carried out during the grain filling of five wheat cultivars. The horizontal lines indicate the duration of grain filling of each cultivar.

The cultivar Biointa 1001 shows to be the most sensitive to the daily VPD; this is observed in the daily values of  $g_s$  and in the minor relation 1:1 between the irrigation treatments (Figures 3 and 4B). The susceptibility of Biointa 1001 to water deficit is explained because it carried out a high use of water in normal conditions. So, when the VPD was above optimal values, 0.80–0.95 kPa (López-Morales *et al.*, 2008), a decreased  $\Psi_w$  of the substrate on the pots would have affected the rate of  $T$  (Monteith, 1995). This is also supported because in the Control treatment Biointa 1001, and to a lesser extent Baguette Premium 11, show a greater number of registries of  $g_s$  above 200  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figure 4B and E). Values of  $g_s$  below or above 200–250  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , lead to a reduction of WUE (Martin and Ruiz-Torres, 1992). The higher  $g_s$  of both cultivars may have been due to a greater number of stomas, greater density per unit leaf area, and/or due to a greater opening in well-watered conditions. Nonetheless, while Biointa 1001 shows oscillating values of  $g_s$  in both irrigation treatments, Baguette Premium 11 shows stomatal adjustment in response to the Stress treatment (Figure 4B and E). Despite that the stomatal adjustment is a response of the plant to hold its  $\Psi_w$  and to avoid water stress (Turner, 1986), also involves a minor  $\text{CO}_2$  assimilation and a yield penalization.

The  $g_s$  of cultivars LE 2333, LE 2249 and LE 2331 show the fewest number of registries above 200  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in the Control treatment (Figure 4A, C and D). Of these cultivars, LE 2333 shows a greater relation (1:1) between the irrigation treatments (Figure 4A). This is a type of response similar to the observed with the RWC of this cultivar (Figure 2A). Hence, in both traits LE 2333 shows to be the most resistant cultivar to the Stress treatment. Meanwhile, the response that is observed in the  $g_s$  of LE 2249 and LE 2331 also is similar to the response in RWC; being mainly LE 2331 the cultivar with higher stomatal adjustment because of Stress treatment (Figures 2C, D, 4C y D).

Unlike Biointa 1001, the cultivar LE 2331 shows a lower oscillation of  $g_s$  and a greater relation (1:1) between both irrigation treatments (Figure 4B y D). This could be explained because LE 2331 may have done stomatal adjustment when the water deficit caused by the Stress treatment was increased, and not when the atmospheric demand was high and/or before the irrigation water began to deplete from the Control treatment pots (Mott and Parkhurst, 1991; Monteith, 1995). In other words, even with a lower RWC than Biointa 1001, the cultivar LE 2331 shows more constant values of  $g_s$  in the Control treatment, which would have enabled to maintain the rate of  $T$  for a longer time.



**Figure 4.** Relation between repeated measurements in time during the grain filling of the adaxial stomatal conductance ( $g_s$ ) of flag leaf (FL) of five wheat cultivars: A) LE 2333, B) Biointa 1001, C) LE 2249, D) LE 2331 and E) Baguette Premium 11 subjected to two irrigation treatments (Control and Stress). The numbers indicate the days after anthesis in that the measurements were carried out, the figures the means ( $n=3$ , obtained with averages of three FL per plot) and the vertical and horizontal bars the standard errors for both axes.

The stomatal adjustment of cultivars would have been done in function of how the plants sensed the substrate  $\Psi_w$  (Pettijohn *et al.*, 2009). That is, the lower the stress threshold, this is more susceptible plants, the greater would be the influence of the feedback mechanism (Mott and Parkhurst,

1991; Monteith, 1995). Whereas if the stress threshold is greater at the same  $\Psi_w$ , greater would be the influence of the feed-forward mechanism with respect to the feedback (Farquhar, 1978; Dodd *et al.*, 1996; Bunce, 1997, 1998; Xue, cited by Streck, 2003).



As was mentioned before, the cultivar LE 2331 shows a belated stress threshold that could be explained by a greater mobilization of water-soluble carbohydrates. Given the results of  $g_s$ , another possible explanation for this type of response is that the patchy closure of stomata (feed-forward mechanism), could have had a greater influence in the stomatal adjustment of LE 2331 than the influence of the cellular  $\Psi_w$  (feedback mechanism). The feed-forward mechanism implies that the increase of VPD could have promoted an increase of the ABA concentration in the guardian cells and hence, a partial closing of stomas (Bunce, 1997, 1998). Thus, it seems that greater  $g_s$  are not necessarily associated with a greater yield expression under water deficit conditions.

In summary, as expected, the kernel weight shows to be the most affected yield component because of the applied stress. In turn, the earlier the water deficit is sensed by plants, less is affected the kernel weight and more are affected the other yield components. So, because of these compensatory mechanisms, and for a better interpretation of results, is advisable to carry out registries of other traits, even if they are determined prior to the study period of interest. Particularly, the fitted exponential model to the repeated measurements in time of RWC could be useful to identify cultivars of different sensitivity to drought stress during grain filling. Also, different clustering patterns by cultivar between repeated measurements in time of  $g_s$  (Control vs Stress) show to be associated to the RWC measurements.

Weighted by all traits studied LE 2333 is the cultivar that shows a greater resistance to water deficit. Meanwhile, LE 2249 and Baguette Premium 11 show a moderately susceptible response. Instead, LE 2331 and Biointa 1001 are the most susceptible cultivars to post-anthesis water deficit because of a decrease above 20% of their grain yield. However, some differences between these cultivars are observed. Whilst in LE 2331 a belated stress threshold would

have caused a decrease of RWC, kernel weight and harvest index, in Biointa 1001 these traits are not affected. Instead, related to a high oscillation in the values of  $g_s$ , Biointa 1001 shows an early stress threshold that may have caused the decrease of its biomass  $\text{plant}^{-1}$  and a non-significant decrease of all the other yield components.

Cultivars with a belated stress threshold would affect less the kernels  $\text{plant}^{-1}$ , but more the kernel weight and its physical and industrial quality. Thus, cultivars with this type of response would be more suitable for regions with mild drought stress, deep soils and/or with high probability of rain after anthesis. For regions with higher probability of severe drought stress after anthesis, cultivars of higher gap of WUEs between irrigation treatments would be more suitable.

#### Acknowledgements

We specially thank Professor Esteban Hoffman of UdelaR –Uruguay-, who gave us advices to carry out the experiment; and from INIA Uruguay, we thank Marcelo Maidana for his assistance in the greenhouse, and Drs Mario Lema and Jarislav von Zitzewitz who helped us in the discussion of the data analysis.

#### References

- Barrs HD, Weatherley PE.** 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Science* **15**, 413–428.
- Blum A.** 1998. Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilization. *Euphytica* **100**, 77–83.
- Blum A.** 2009. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research* **112**, 119–123.
- Boyer JS, James RA, Munns R, Condon AG, Passioura JB.** 2008. Osmotic adjustment leads to anomalously low estimates of relative water content in wheat and barley. *Functional Plant Biology* **35**, 1172–1182.
- Bunce JA.** 1997. Does transpiration control stomatal responses to water vapour pressure deficit?. *Plant, Cell & Environment* **20**, 131–135.

- Bunce JA.** 1998. Effects of humidity on short-term responses of stomatal conductance to an increase in carbon dioxide concentration. *Plant, Cell & Environment* **21**, 115–120.
- Castro M, Díaz M, Germán S, Pereyra S, Vázquez D, Albanese I.** 2010. Resultados experimentales de la Evaluación Nacional de Cultivares de trigo, cebada, colza, triticale y trigo doble propósito de los tres últimos años. Período 2007-2008-2009. INIA-INASE. Resultados experimentales No. 10. Colonia, Uruguay: INIA La Estanzuela.
- Castro M, Díaz M, Germán S, Pereyra S, Vázquez D, Albanese I.** 2011. Resultados experimentales de la Evaluación Nacional de Cultivares de trigo, cebada, colza, triticale y trigo doble propósito de los tres últimos años. Período 2008-2009-2010. INIA-INASE. Resultados experimentales No. 11. Colonia, Uruguay: INIA La Estanzuela.
- Castro M, Vázquez D.** 2010. Influence of drought stress during grain filling on agronomic characteristics, grain protein concentration and rheological properties of wheat cultivars. *Advances of Agricultural Sciences Problem Issues* **545**, 123–130.
- Clarke JM, Clarke FR.** 1996. Considerations in design and analysis of experiments to measure stomatal conductance of wheat. *Crop Science* **36**, 1401–1405.
- Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD.** 2002. Improving intrinsic water-use efficiency and crop yield. *Crop Science* **42**, 122–31.
- Dodd IC, Stikic R, Davies WJ.** 1996. Chemical regulation of gas exchange and growth of plants in drying soil in the field. *Journal of Experimental Botany* **47**, 1475–1490.
- Farquhar GD.** 1978. Feedforward responses of stomata to humidity. *Australian Journal of Plant Physiology* **5**, 787–800.
- Fischer RA, Edmeades GO.** 2010. Breeding and cereal yield progress. *Crop Science* **50**, S85–S98.
- Gómez D, Vanzetti L, Helguera M, Lombardo L, Frascina J, Miralles DJ.** 2014. Effect of *Vrn-1*, *Ppd-1* genes and earliness *per se* on heading time in Argentinean bread wheat cultivars. *Field Crops Research* **158**, 73–81.
- Halse NJ, Weir RN.** 1970. Effects of vernalization, photoperiod, and temperature on phenological development and spikelet number of Australian wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* **21**, 383–393.
- Held IM, Soden BJ.** 2006. Robust responses of the hydrological cycle to global warming. *Journal of Climate* **19**, 5686–5699.
- Hochman Z.** 1982. Effect of water stress with phasic development on yield of wheat grown in a semi-arid environment. *Field Crops Research* **5**, 55–67.
- Hoffman E, Mesa P, Cadenazzi M.** 2007. Caracterización de cultivares de trigo. In: INIA, ed. Jornada de cultivos de invierno. Serie actividades de difusión No. 484. Colonia, Uruguay: INIA La Estanzuela, 67–89.
- Hoffman E, Viega L, Baeten A, Lamarca A, Lamarca M, Wornicov S.** 2011. Respuesta de siete cultivares de trigo al déficit y exceso hídrico durante el encañado. Cangüé No. 31. Paysandú, Uruguay: Facultad de Agronomía, 10–17.
- IPCC.** 2001. Climate change 2001: The scientific basis. Contribution of working group I to the third assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, van der Linden PJ, Dai X, Maskell K, Johnson CA, eds. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Izanloo A, Condon AG, Langridge P, Tester M, Schnurbusch T.** 2008. Different mechanisms of adaptation to cyclic water stress in two south Australian bread wheat cultivars. *Journal of Experimental Botany* **59**, 3327–3346.
- Jones HG.** 1977. Aspects of the water relations of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to induced drought. *The Journal of Agricultural Science* **88**, 267–282.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* **17**, 287–291.
- Kobata T, Palta JA, Turner NC.** 1992. Rate of development of post anthesis water deficits and grain filling of spring wheat. *Crop Science* **32**, 1238–1242.
- Kohli MM, Frascina J.** 2009. Adapting wheats to zero tillage in maize-wheat-soybean rotation system. In: ICAR, ed. Proceedings of the 4th world congress on conservation agriculture: Innovations for improving efficiency, equity and environment. New Delhi, India: ICAR, 212–222.
- Levitt J.** 1980. Responses of plants to environmental stresses, Vol. 2: Water, radiation, salt and other stresses. 2nd ed. New York: Academic Press.

- Littell RC, Milliken GA, Stroup WW, Wolfinger RD, Schabenberger O.** 2006. SAS<sup>®</sup> for mixed models. 2nd ed. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- López-Morales V, López-Ortega O, Ramos-Fernández J, Muñoz LB.** 2008. JAPIEST: An integral intelligent system for the diagnosis and control of tomatoes diseases and pests in hydroponic greenhouses. *Expert Systems with Applications* **35**, 1506–1512.
- Lawlor DW, Cornic G.** 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Environment* **25**, 275–294.
- Martin B, Ruiz-Torres NA.** 1992. Effects of water-deficit stress on photosynthesis, its components and component limitations, and on water use efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology* **100**, 733–739.
- McDermitt DK.** 1990. Sources of error in the estimation of stomatal conductance and transpiration from porometer data. *HortScience* **25**, 1538–1548.
- Miralles DJ.** 2006. Generación de rendimiento en trigo: ¿Por qué es necesario comprender el funcionamiento del cultivo?. In: Romagnoli J, ed. XIV congreso de trigo en siembra directa. Bs As, Argentina: AAPRESID, 52–57.
- Monteith JL.** 1995. A reinterpretation of stomatal responses to humidity. *Plant, Cell & Environment* **18**, 357–364.
- Mott KA, Parkhurst DF.** 1991. Stomatal responses to humidity in air and helox. *Plant, Cell & Environment* **14**, 509–515.
- Orskov ER, McDonald I.** 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science* **92**, 499–503.
- Ozturk A, Aydin F.** 2004. Effect of water stress at various growth stages on some quality characteristics of winter wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science* **190**, 93–99.
- Pettijohn JC, Salvucci GD, Phillips NG, Daley MJ.** 2009. Mechanisms of moisture stress in a mid-latitude temperate forest: Implications for feedforward and feedback controls from an irrigation experiment. *Ecological Modelling* **220**, 968–978.
- Prenger JJ, Ling PP.** 2001. Greenhouse condensation control: Understanding and using vapor pressure deficit (VPD). Fact sheet (series) AEX-804. Columbus, OH: Ohio State University Extension.
- Rebetzke GJ, Read JJ, Barbour MM, Condon AG, Rawson HM.** 2000. A hand-held porometer for rapid assessment of leaf conductance in wheat. *Crop Science* **40**, 277–280.
- Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT.** 2004. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2343–2351.
- Slafer G.** 2012. Wheat development: its role in phenotyping and improving crop adaptation. In: Reynolds M, Pask A, Mullan D, eds. Physiological breeding I: Interdisciplinary approaches to improve crop adaptation, Mexico, D.F.: CIMMY, 109–123.
- Streck NA.** 2003. Stomatal response to water vapour pressure deficit: An unsolved issue. *Revista Brasileira de Agrociência* **9**, 317–322.
- Trenberth KE, Dai A, Rasmussen RM, Parsons DB.** 2003. The changing character of precipitation. *Bulletin of the American Meteorological Society* **84**, 1205–1217.
- Trenberth KE, Jones PD, Ambenje P, et al.** 2007. Observations: Surface and atmospheric climate change. In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL, eds. Climate change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press, 235–336.
- Turner NC.** 1986. Adaptation to water deficits: A changing perspective. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**, 175–190.
- Verma V, Foulkes MJ, Worland AJ, Sylvester-Bradley R, Caligari PDS, Snape JW.** 2004. Mapping quantitative trait loci for flag leaf senescence as a yield determinant in winter wheat under optimal and drought-stressed environments. *Euphytica* **135**, 255–263.
- Yang D, Jing R, Chang X, Li W.** 2007. Identification of quantitative trait loci and environmental interactions for accumulation and remobilization of water-soluble carbohydrates in wheat (*Triticum aestivum* L.) stems. *Genetics* **176**, 571–584.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF.** 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* **14**, 415–521.