



Instituto de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Ciencias, mención Ingeniería Genética Vegetal

**Variación en las respuestas fisiológicas y moleculares de  
cultivares de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)  
sometidos a estrés por déficit hídrico**

Tesis entregada al Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Talca en  
cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado académico de:

**Doctor en Ciencias  
Mención Ingeniería Genética Vegetal**

Por

**Karen Paulina Balboa Silva**

**Profesor Guía: Dr. Marco A. Molina Montenegro**

**Enero de 2019**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

**Candidato a Doctor:** Karen Paulina Balboa Silva

**Fecha inicio de Tesis:** Agosto 2013

**Fecha término de Tesis:** Julio 2018

Profesor Guía: Dr. Marco A. Molina Montenegro

Instituto de Ciencias Biológicas

Universidad de Talca

Calle 2 norte 685, casilla 747, Talca.

[marco.molina@utalca.cl](mailto:marco.molina@utalca.cl)

**Integrantes de la Comisión de Evaluación:**

Dr. Fernando Guerra

Instituto de Ciencias Biológicas

Universidad de Talca

Dr. Alejandro del Pozo

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad de Talca

Dr. Claudio Pastenes

Facultad de Ciencias Agronómicas

Universidad de Chile

## INDICE GENERAL

INDICE GENERAL .....	5
INDICE DE TABLAS .....	8
INDICE DE FIGURAS .....	9
RESUMEN GENERAL .....	10
ABSTRACT .....	12
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	14
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	15
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	20
Hipótesis .....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos .....	20
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	21
2.1. Cambio climático y plantas de cultivo .....	22
2.2. Las plantas y el estrés abiótico: mecanismos de respuestas a estrés hídrico.....	23
2.3. Respuestas moleculares a estrés por déficit hídrico: acumulación de prolina y proteínas LEA como mecanismos de respuesta .....	28
2.4. Reflectancia espectral y su aplicación en estudios de fenotipificación en diferentes condiciones ambientales.....	31
2.5. El arándano como cultivo frutícola de interés: generalidades de la especie, estrés hídrico y su situación en Chile.....	32
CAPÍTULO III: DIFERENCIAS FISIOLÓGICAS Y MOLECULARES EN RESPUESTA AL ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO EN CULTIVARES DE ARÁNDANO ( <i>Vaccinium corymbosum</i> L.) .....	35
3.1. Introducción .....	36

3.2. Materiales y Métodos .....	40
Obtención de material biológico y condiciones de estrés .....	40
Parámetros fisiológicos utilizados para evaluar estrés hídrico .....	43
Análisis de perfiles transcripcionales de genes candidatos de la familia LEA .....	44
Diseño experimental y análisis estadísticos .....	47
3.3. Resultados .....	50
Contenido relativo de agua .....	50
Fluorescencia de la clorofila .....	52
Composición isotópica del <sup>13</sup> C.....	55
Contenido de prolina.....	57
Análisis de componentes principales y estimación del desempeño de los cultivares....	59
Expresión relativa de genes de la familia LEA.....	62
3.4. Discusión.....	66
Tolerancia o susceptibilidad de cultivares de arándano a condiciones de déficit hídrico .....	66
Acumulación de prolina en respuesta a condiciones de déficit hídrico .....	69
Integrando las respuestas fisiológicas para distinguir grupos de cultivares .....	69
Acumulación de transcritos de putativos genes que codifican para proteínas LEA en respuesta a estrés por déficit hídrico.....	70
3.5. Consideraciones finales.....	73
<b>CAPÍTULO IV: ESTUDIO PROSPECTIVO DEL USO DE LA REFLECTANCIA ESPECTRAL EN LA IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES DE ARÁNDANO (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) TOLERANTES A ESTRÉS HÍDRICO.....</b>	<b>74</b>
4.1. Introducción .....	75
4.2. Material biológico y mediciones experimentales.....	77
4.3. Resultados preliminares .....	78

Parámetros fisiológicos .....	78
Firma espectral de cultivares de arándano .....	78
Relación entre reflectancia espectral y mediciones experimentales .....	82
4.4. Consideraciones y direcciones futuras .....	85
CONCLUSIONES GENERALES DEL ESTUDIO .....	87
REFERENCIAS .....	88
Material Suplementario .....	104

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 3.1.</b> Clasificación de los cultivares de arándano utilizados en los experimentos de estrés por déficit hídrico. ....	42
<b>Tabla 3.2.</b> Medio de cultivo utilizado en la propagación de variedades de arándano. ....	42
<b>Tabla 3.3</b> Partidores usados en los análisis de expresión génica.....	49
<b>Tabla 3.4.</b> Desempeño de los cultivares (%) calculado a partir de las variables fisiológicas medidas a la sexta semana de tratamiento .....	62
<b>Tabla 3.5.</b> Clasificación de los genes candidatos empleados en el análisis de expresión relativa mediante qRT-PCR.....	63
<b>Tabla 4.1.</b> Abreviaturas y significado de los parámetros de fluorescencia de la clorofila ..	77
<b>Tabla 4.2.</b> Parámetros fisiológicos y de fluorescencia de la clorofila medidos en condiciones de estrés en cultivares de arándano.....	80
<b>Tabla 4.3.</b> Coeficientes de determinación ( $r^2$ ) para los mejores índices de reflectancia espectral por cada parámetro fisiológico medido en los 6 cultivares de arándano.....	83
<b>Tabla S1.</b> Resultados del ANOVA evaluando los efectos del riego y el tiempo sobre el contenido relativo de agua (RWC) en distintos cultivares de arándano.....	104
<b>Tabla S.2.</b> Resultados del ANOVA evaluando los efectos del riego y el tiempo sobre Fv/Fm en distintos cultivares de arándano .....	105
<b>Tabla S.3.</b> Resultados del ANOVA evaluando los efectos del riego a la sexta semana de estrés por déficit hídrico sobre las variables respuestas medidas: Contenido de prolina y composición isotópica del $^{13}C$ , en distintos cultivares de arándano.....	106
<b>Tabla S.4.</b> Resultados del ANOVA evaluando los efectos del riego sobre la expresión relativa de genes candidatos (normalizado con <i>ACT7</i> ) .....	107

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Contenido relativo de agua (RWC) de cultivares de arándanos durante un período de 6 semanas.....	51
<b>Figura 3.2.</b> Diferencias porcentuales del contenido relativo de agua de cultivares de arándano a las 2, 4 y 6 semanas de estrés respecto de la condición control.....	53
<b>Figura 3.3.</b> Rendimiento fotoquímico del PSII (Fv/Fm) en los cultivares de arándanos estudiados en un período de 6 semanas con riego diferenciado. ....	54
<b>Figura 3.4.</b> Diferencias en el rendimiento fotoquímico del PSII (Fv/Fm) en los cultivares de arándano a las 2, 4 y 6 semanas de estrés respecto de la condición control. ....	55
<b>Figura 3.5.</b> Composición isotópica del $^{13}\text{C}$ (‰) de los cultivares de arándano a la semana 6 de estrés. ....	56
<b>Figura 3.6. a)</b> Discriminación isotópica del $^{13}\text{C}$ (‰) de los cultivares de arándano, a la semana 6 de estrés. <b>b)</b> Diferencias entre control y estrés respecto de la $\Delta^{13}\text{C}$ en cada cultivar.....	57
<b>Figura 3.7.</b> Concentración de prolina en los cultivares de arándano, medida a la sexta semana de experimento. ....	58
<b>Figura 3.8.</b> Diferencias respecto al control en el contenido de prolina de los cultivares de arándano a la semana 6 de tratamiento de estrés.....	59
<b>Figura 3.9.</b> Análisis de componentes principales (PCA) realizado con las variables fisiológicas medidas. <b>a)</b> PCA que representa los cultivares de arándano a la sexta semana de tratamiento <b>b)</b> PCA que representa a las plantas estresadas de los cultivares de arándano y su origen, a la sexta semana de tratamiento.....	61
<b>Figura 3.10.</b> Expresión relativa de genes candidatos de la familia LEA y <i>RD22</i> , normalizado con <i>ACT7</i> , a la sexta semana de estrés hídrico.....	65
<b>Figura 4.1.</b> Respuesta de las hojas de los cultivares de arándano en condiciones control ( <b>a</b> ) y estrés hídrico ( <b>b</b> ), en términos de reflectancia absoluta en el rango espectral de 350 nm a 2450 nm. ....	81
<b>Figura 4.2.</b> Respuesta de las hojas de los cultivares de arándano considerados como dos grupos (NHB y SHB) en condiciones control y con estrés hídrico, en términos de reflectancia absoluta en el rango espectral de 350 nm a 2450 nm. ....	81

## RESUMEN GENERAL

El cambio climático plantea una creciente amenaza a la seguridad alimentaria a nivel mundial. Una de las principales consecuencias del cambio climático son los eventos de sequía, que pueden causar impactos negativos en especies de cultivo agrícola, debido a que este estrés es considerado como uno de los factores ambientales más severos que limita la productividad y el rendimiento de los cultivos. La disponibilidad hídrica es un factor clave que restringe la distribución de las especies vegetales a través de los diferentes ambientes, lo cual tiene un gran impacto en especies que poseen un sistema radicular poco profundo y que dependen permanentemente de riego. Este es el caso del arándano de arbusto alto (*Vaccinium corymbosum* L.), una de las especies frutales cultivada en Chile, siendo la región centro-sur del país el área más importante de producción. Sin embargo, los modelos de cambio climático predicen una reducción en las precipitaciones en esta región y se espera que se agudicen los eventos de sequía, lo que constituye un desafío para el cultivo de esta especie, sumado a que existen pocos antecedentes de cómo los cultivares de arándanos responden a condiciones de déficit hídrico, lo que a su vez impide llevar a cabo predicciones respecto del desempeño del arándano en este tipo de escenarios. Considerando estas premisas, surgen las siguientes interrogantes: ¿Existen diferencias respecto del grado de tolerancia o sensibilidad a este tipo de estrés en cultivares de arándano? ¿Cómo responden los cultivares de arándano frente al estrés hídrico, en relación a variables fisiológicas y moleculares? ¿Existen diferencias en las respuestas en arándanos de arbusto alto del norte y del sur? ¿Existe la posibilidad de generar correlaciones entre variables respuesta medidas con índices de reflectancia espectrales? Para dar cuenta de estas interrogantes, esta tesis se dividió en 4 capítulos.

En primer lugar, el capítulo I abordó la problemática existente respecto al modelo de estudio, lo que conllevó al planteamiento de la hipótesis y objetivos. Luego, en el capítulo II se presenta el estado del arte respecto del estrés hídrico y su efecto en plantas, así como también antecedentes del arándano como cultivo de importancia económica. En el capítulo III se llevó a cabo un estudio que permitió determinar el grado de tolerancia o sensibilidad de 6 cultivares de *V. corymbosum*, 3 cultivares del norte (NHB) y 3 cultivares del sur (SHB), sometidos a condiciones de déficit hídrico, mediante la evaluación de sus

respuestas fisiológicas y moleculares. Se realizaron mediciones de parámetros fisiológicos (contenido relativo de agua, contenido de prolina, discriminación isotópica del carbono y eficiencia fotoquímica del PSII) y también se estudiaron respuestas moleculares, mediante la expresión relativa de genes candidatos de la familia LEA (Late Embryogenesis Abundant). Específicamente, se compararon las respuestas entre cultivares, encontrándose diferencias entre ellos, y además, diferencias entre cultivares NHB y SHB. Por último, en el capítulo IV, se llevó a cabo un estudio prospectivo, donde se efectuaron mediciones de reflectancia espectral en plantas sometidas a estrés hídrico simulado con Polietilenglicol-6000 (PEG-6000), identificándose índices de reflectancia espectral (IREs) que tuvieron un alto grado de correlación con algunas de las variables fisiológicas medidas. Se plantea que estos IREs pueden ser útiles para la estimación rápida y no destructiva de parámetros fisiológicos del arándano en respuesta a condiciones de déficit hídrico.

En conjunto, los resultados de esta tesis permiten concluir que existen diferencias en las respuestas fisiológicas y moleculares entre cultivares de arándano frente al estrés hídrico, lo que apunta hacia la existencia de diferentes grados de sensibilidad y tolerancia entre ellos; aparentemente, los cultivares SHB serían más tolerantes al estrés por déficit hídrico respecto de los NHB. Más aún, también se detectaron diferencias en los datos de reflectancia espectral medidos para estos cultivares bajo condiciones de estrés. Esto permite proponer el uso de la reflectancia espectral como una herramienta para la predicción de respuestas fisiológicas en el arándano.

## ABSTRACT

Climatic change and global warming are posing a threat to food security worldwide. One of the biggest consequences of climate change is severe drought events, which may substantially impact economically important crop species. Thus, drought stress has been considered to be one of the most limiting environmental factors affecting plant growth and yield. Hence, hydric availability is a crucial factor to be considered, as it restricts plant species distribution through different environments. This is even more important in plants species with a shallow rooting system, which require a regular and permanent water supply. This is the case of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.), a fruit species widely cultivated in Chile, mostly for exporting, while the main blueberry production area is concentrated in the central-south part of the country. However, climate change models estimate that there will be a further reduction in rainfall and growing water scarcity for this region, resulting in severe drought events, which in turn poses a challenge for blueberry growth and production. Despite this, there is little information regarding the phenological and physiological effects of drought stress in blueberry cultivars, hindering the predictions about blueberry performance in such scenarios. This poses several interesting questions: are there differences in the sensitivity or tolerance to drought stress between blueberry cultivars? How is the response of blueberry cultivars to drought stress, in terms of physiological and molecular parameters? Are there any differences in these responses between northern and southern high bush blueberries? Is it possible to correlate the measured physiological and molecular parameters with spectral reflectance indices? To address these questions, this thesis is divided in 4 chapters.

The first chapter (chapter I) is a thorough examination of the existing issues and knowledge gaps regarding the studied model, which led to the thesis hypothesis and objectives. Then, in Chapter II, an updated state-of-the-art regarding drought stress and its effects on plants is presented, together with background knowledge on blueberry as an economically important crop. In chapter III, we assessed the tolerance or sensitivity of 6 cultivars of *V. corymbosum*, 3 Northern Highbush blueberry (NHB) and 3 Southern Highbush blueberry (SHB) to water deficit stress conditions. Several physiological parameters were measured (relative water content, proline content, carbon isotopic discrimination, and photochemical efficiency of PSII), while molecular responses were also

studied, by measuring the relative expression levels of selected candidate genes coding for LEA family proteins (Late Embryogenesis Abundant). When comparing these 6 cultivars, we found significant differences in these measured parameters and responses; furthermore, we also detected significant differences when comparing between groups of cultivars (NHB and SHB). Finally, chapter IV describes a prospective study where spectral reflectance measurements were performed in plants subjected to simulated water deficit stress using Polyethylenglycol-6000 (PEG-6000). This prospective study allowed identification of specific spectral reflectance indices (SRIs) which had high correlation levels with some of the physiological measurements. Thus, these results suggest that these SRIs would be useful in faster, non-destructive estimations of physiological parameters of blueberries in response to water deficit conditions, thus allowing a quicker estimation of plant physiological status.

Taken together, the results obtained in this thesis support the existence of significant differences in the physiological and molecular responses between blueberry cultivars under drought stress, which in turn suggests the existence of different levels of sensitivity or tolerance between them. Seemingly, SHB cultivars would be more tolerant to drought stress compared to NHB cultivars. Furthermore, we also detected differences in the spectral reflectance results for these cultivars under the same stress conditions. This opens up the possibility of using spectral reflectance as a tool for the prediction of physiological responses in blueberry cultivars.

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN GENERAL, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Debido a su condición sésil, las plantas se encuentran expuestas a diversos factores abióticos adversos, como sequía, alta salinidad y temperaturas extremas, lo que puede perjudicar severamente su crecimiento y desarrollo (Seki et al., 2002). El estrés hídrico es uno de los factores ambientales más severos que limita la productividad de los cultivos. Éste puede surgir como resultado de dos condiciones, exceso o déficit hídrico, siendo este último el más común (Mahajan & Tuteja, 2005). Por otro lado, se ha sugerido que, debido a los efectos del cambio climático global, el déficit hídrico podría intensificarse en muchos lugares del mundo, disminuyendo el rendimiento de las especies de cultivo y amenazando la seguridad alimentaria (FAO, 2008; Campbell et al., 2016; Misra, 2014; Myers et al., 2017; Shinozaki et al., 2017; Wheeler & von Braun, 2013).

El estrés por déficit hídrico afecta el desempeño y productividad de las plantas, causando deshidratación celular, lo cual reduce el volumen citosólico y vacuolar, estimulando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que afecta negativamente la estructura y metabolismo celular (Bartels & Sunkar, 2005). Adicionalmente, existe pérdida de turgor celular, cambios en la fluidez y composición de membrana, estrés osmótico e interferencia con la disponibilidad de nutrientes (Chinnusamy et al., 2004; Valliyodan & Nguyen, 2006). La síntesis de la fitohormona ácido abscísico (ABA), inducida por déficit hídrico, gatilla el cierre estomático, causando una disminución en la concentración de CO<sub>2</sub> dentro de la célula, lo que inhibe la fotosíntesis y causa daño al aparato fotosintético (Chaves et al., 2009).

Un gran número de procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos, tanto a nivel celular y de la planta completa, son alterados en respuesta a estrés por déficit hídrico. Dentro de las respuestas inmediatas frente al estrés, las plantas detienen el crecimiento, reducen la demanda metabólica y movilizan metabolitos para la síntesis de componentes protectores requeridos para el ajuste osmótico (Bhargava & Sawant, 2013). Por otro lado, se ha documentado que la síntesis de ciertos compuestos como prolina, glicina-betaína y proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), previenen la pérdida de agua desde las células, manteniendo el balance osmótico y protegiendo la integridad estructural de la célula (Blum, 2005; Bray, 1993, 1997, 2002). Es interesante señalar, que muchos de los

mecanismos de respuesta inducidos por la falta de agua también se inducen por estrés por frío, por ejemplo, la síntesis de osmolitos y proteínas LEA (Beck et al., 2007; Mahajan & Tuteja, 2005).

El arándano de arbusto alto (*Vaccinium corymbosum* L.) es una especie nativa de Estados Unidos, pero que está siendo ampliamente cultivada en otros lugares del mundo, como Europa, China y Sudamérica, de la cual proviene la mayor producción que abastece a los mercados mundiales (Hancock et al., 2008; Retamales & Hancock, 2012). La expansión del cultivo a otras regiones (latitudes) se debe en gran medida, al desarrollo de híbridos con otras especies del género *Vaccinium*, dando origen a nuevos cultivares con menores requerimientos de horas-frío, las que han sido denominadas como “southern highbush blueberry” (SHB) (Brevis et al., 2008). Por tanto, los cultivares se clasifican en cultivares del norte (NHB: northern highbush blueberry) y del sur (SHB: southern highbush blueberry), definidos en función del hemisferio norte y que difieren en sus requerimientos de horas-frío que necesitan acumular para que, posteriormente, las yemas florales puedan brotar (Retamales & Hancock, 2012; Rowland et al., 2011).

Así como para otros cultivos frutales, Chile se ha convertido en un importante productor y exportador de arándanos en el hemisferio sur, incrementando en los últimos años el área plantada en diferentes regiones del país (ODEPA, 2012; Retamales et al., 2014). La producción total del país bordea las 80.000 toneladas anualmente, provenientes de las más de 13.000 hectáreas plantadas a nivel nacional (principalmente NHB y SHB), siendo la región centro-sur (latitudes 34° a 38°S) la que aporta con la mayor producción (Bañados, 2006; Retamales et al., 2014). Gran parte es destinada a exportación, siendo un porcentaje menor lo que queda para consumo interno ([www.comitedearandanos.cl](http://www.comitedearandanos.cl); [www.blueberrieschile.cl](http://www.blueberrieschile.cl)), dado que el período de producción en el hemisferio sur permite abastecer en contraestación a los mercados Norteamericano, Europeo y Asiático (Caligari et al., 2009). La mayor demanda actual de este fruto está dada por el aumento de su consumo, ya sea como fruto fresco o procesado, debido a los altos niveles de antocianinas que posee, transformándolo en una importante fuente de antioxidantes (Huang et al., 2012; Routray & Orsat, 2011; Rowland et al., 2011), tornándose en un producto atractivo y saludable para los consumidores.

El arándano se ha adaptado muy bien a una variedad de condiciones de suelo y clima en Chile, sin embargo, se requiere de mayor investigación para aumentar el rendimiento, reducir los costos de producción, mejorar la calidad del fruto y ofrecer mayor sustentabilidad económica y ecológica a la industria del arándano en Chile (Bañados, 2006; Retamales et al., 2014). Esto, sumado a las nuevas condiciones que enfrenta la actividad frutícola debido al cambio climático y las crecientes exigencias de los mercados (reducción de huella de carbono, huella de agua, productos orgánicos, entre otras), requieren de programas de desarrollo científico-tecnológico que permitan competir con los productores más eficientes a nivel mundial (ODEPA, 2013).

Uno de los principales desafíos para la expansión del cultivo de arándano (tanto en regiones frías o cálidas), será la baja disponibilidad hídrica de los suelos debido a las alteraciones en los patrones globales de temperatura y precipitación (Lobos & Hancock, 2015; IPCC, 2014). El aumento en la temperatura está asociado con variaciones extremas en los patrones climáticos, resultando en sequías severas, lluvias inusualmente fuertes y temperaturas cálidas atípicas (Allen & Ingram, 2002). En Chile, durante el siglo XX, se ha observado una disminución de las precipitaciones, cercana al 25% en la principal zona productora de arándano (aproximadamente entre 35° y 38°S) y se estima un incremento en el déficit de las precipitaciones entre un 10-15% en los próximos 30 años (Santibáñez & Santibáñez, 2007; Naciones Unidas, 2010). Altas temperaturas y sequía pueden reducir significativamente la productividad y calidad de los cultivos (Moretti et al., 2010), restringiendo las zonas donde las especies de importancia económica para el país puedan ser cultivadas (Lobos & Hancock, 2015).

Se ha descrito que *V. corymbosum* es altamente sensible al déficit hídrico del suelo debido a que presenta raíces poco profundas (Ameglio et al., 2000; Erb, 1993; Pritts & Hancock, 1992; Undurraga & Vargas, 2013). Por tanto, el riego es un factor determinante en el crecimiento y producción de los arándanos debido a la baja capacidad que tiene el sistema radicular de absorber agua, por lo que el déficit hídrico reduce el crecimiento vegetativo y, por ende, el rendimiento, siendo necesario suplementar adicionalmente el agua cuando la frecuencia y cantidad de precipitaciones no son suficientes para satisfacer sus requerimientos (Holzapfel et al., 2004).

Estudios fisiológicos en *V. corymbosum* han demostrado que los cultivares responden de manera diferenciada al estrés hídrico. Por ejemplo, al caracterizar las relaciones hídricas en condiciones de invernadero del cultivar Bluecrop (NHB) demostraron que es altamente sensible a la pérdida de agua, ya que ocurre un rápido cierre de estomas y una reducción en la tasa de transpiración (Améglío et al. 2000). En el mismo cultivar, también se evidenció una marcada sensibilidad a estrés hídrico a lo largo de todo el ciclo vegetativo, en particular, desde la primera etapa de formación del fruto hasta su maduración (Perrier et al., 2000). Por otro lado, en los cultivares Duke, Bluecrop y Elliott (todos NHB) expuestos a períodos cortos de sequía en campo, se evaluó la conductancia estomática y el potencial hídrico del tallo, observando diferencias en la sensibilidad a estrés hídrico entre estos cultivares, así como en el uso eficiente del agua (Bryla & Strik, 2007). Adicionalmente, Estrada et al. (2015) demostraron que existen alteraciones de parámetros relacionados a la fotosíntesis y fluorescencia de la clorofila en diferentes cultivares bajo condiciones de sequía. Esto reforzaría la evidencia acerca de la sensibilidad al déficit hídrico y, además, que existen diferencias en las respuestas entre cultivares a la condición de estrés.

A pesar de esta evidencia, existen escasos trabajos que dan cuenta del desempeño de *V. corymbosum* en condiciones de déficit hídrico, los que principalmente se han llevado a cabo, en cultivares NHB (Améglío et al., 2000; Bryla & Strik, 2007; Mingeau et al., 2001; Perrier et al., 2000); mientras que otros pocos antecedentes existentes corresponden a otras especies del género, las que se han descrito como más tolerantes al déficit hídrico (Estrada et al, 2015; Glass et al., 2005; Percival et al., 2003). Sin embargo, no hay evidencia que compare respuestas fisiológicas y moleculares a condiciones de estrés hídrico entre cultivares NHB y SHB desde una perspectiva de escenario de cambio climático.

Dado que en Chile existen regiones afectadas por déficit hídrico y se espera que esa situación se agudice en un escenario de cambio climático a nivel mundial, surge la necesidad de generar conocimiento en esta área, con la finalidad de identificar cultivares que sean más tolerantes a dichas condiciones y utilizar esta información en programas de mejoramiento genético, para generar el desarrollo de nuevos cultivares más tolerantes a estrés. Asimismo, es necesario identificar cultivares que puedan mantener un alto desempeño fisiológico, así como también aquellos mecanismos involucrados en lograr un

buen rendimiento incluso en condiciones de sequía. Por lo tanto, se requiere -en primer lugar- conocer cómo los cultivares de arándano responden frente a condiciones de déficit hídrico, lo cual demanda la evaluación integrada de una serie de parámetros fisiológicos y moleculares, que permitan comprender los mecanismos de respuesta a este tipo de estrés y, de esta forma, identificar cultivares tolerantes o susceptibles a déficit hídrico.

A su vez, los datos fisiológicos pueden ser empleados en el desarrollo de modelos matemáticos predictivos que faciliten la caracterización del fenotipo a través de mediciones rápidas y no destructivas, basadas en la reflectancia espectral (Araus & Cairns, 2014; Lobos & Hancock, 2015). Estas herramientas pueden complementar el potencial de nuevas técnicas moleculares y/o genotipificación, las cuales, en conjunto pueden ser una contribución al desarrollo de estrategias que ayuden a mitigar el impacto del cambio climático en la agricultura (Camargo & Lobos, 2016; Lobos & Hancock, 2015).

Considerando que los escenarios de cambio climático predicen una disminución de las precipitaciones, que la baja disponibilidad hídrica perjudica tanto el crecimiento vegetativo como la producción de frutos y que existen pocos antecedentes acerca del desempeño de cultivares de arándano en condiciones de déficit hídrico, se planteó como objetivo de esta tesis evaluar las respuestas fisiológicas y la expresión relativa de genes de la familia LEA de cultivares de *V. corymbosum*, tanto NHB como SHB, bajo condiciones de déficit hídrico. Para esto, se utilizaron seis cultivares de arándano: Elliott, Bluegold, Brigitta (NHB) y Biloxi, Sharpblue, Oneal (SHB). La evaluación de los cultivares en condiciones de déficit hídrico permitirá comparar el grado de sensibilidad o tolerancia frente al estrés, lo cual estaría determinado por los parámetros fisiológicos y moleculares putativamente involucrados. Adicionalmente, se evaluó la posibilidad de efectuar correlaciones entre los datos fisiológicos obtenidos con mediciones de reflectancia espectral, lo que podría ser utilizado como herramienta de apoyo en la fenotipificación de esta especie.

En conjunto, los resultados de esta tesis constituyen una primera aproximación en la caracterización de los efectos del estrés por déficit hídrico en distintos cultivares de arándano, lo que puede ser relevante en programas de mejoramiento genético enfocados en la obtención de cultivares más tolerantes a dicho estrés, un atributo que será de gran interés agronómico considerando el actual escenario de cambio climático.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis**

Existen diferencias en las respuestas fisiológicas y genético-moleculares en cultivares de arándano sometido a déficit hídrico, siendo los cultivares de arbusto alto del sur (SHB) los que presentan un mejor desempeño frente a este estrés respecto de sus conespecíficos del norte (NHB).

### **Objetivo general:**

Evaluar las respuestas fisiológicas y genético-moleculares de diferentes cultivares de arándano sometidos a estrés por déficit hídrico.

### **Objetivos específicos:**

- Evaluar el desempeño fisiológico y comparar la expresión relativa de genes candidatos relacionados a las proteínas LEA en distintos cultivares de arándano, bajo condiciones de déficit hídrico.
- Correlacionar datos de reflectancia espectral con parámetros fisiológicos y determinar asociación entre absorción de ciertas longitudes de onda en cultivares de arándano SHB y NHB.

**CAPÍTULO II**  
**MARCO TEÓRICO**

## **2.1. Cambio climático y plantas de cultivo**

El cambio climático plantea una creciente amenaza a la seguridad alimentaria a nivel mundial. En muchas regiones, la producción agrícola está siendo afectada de manera negativa por el aumento de las temperaturas, cambios en los niveles y frecuencia de precipitaciones, mayor frecuencia de períodos de sequías, incrementos en la intensidad y/o frecuencia de eventos climáticos extremos y la salinización de suelos cultivables (FAO, 2016; Wheeler & Braun, 2013).

Los modelos de cambio climático predicen eventos de sequía y olas de calor que cada vez serán más frecuentes (Mittler & Blumwald, 2010). La sequía y las altas temperaturas pueden causar impactos considerables en especies de cultivo agrícola, perturbando las funciones fisiológicas fundamentales de la planta, como fotosíntesis, adquisición de nutrientes esenciales, transporte a través de xilema y floema, interacciones entre órganos, así como el rendimiento del cultivo y la calidad de los frutos (Feller, 2016; Moretti et al., 2010).

Las especies de cultivo necesitan de condiciones específicas para lograr un adecuado crecimiento, lo que incluye temperaturas óptimas y suficiente agua. En algunos casos, temperaturas más cálidas pueden beneficiar el crecimiento de ciertas especies de cultivo en algunos lugares del mundo, pero si la temperatura excede el óptimo para la especie y, además, no hay disponibilidad de agua ni nutrientes suficientes, existirá una merma en el rendimiento (FAO, 2016; Myers et al., 2017).

La falta de agua es un factor clave a considerar, sobre todo en áreas donde se proyecta un incremento en las temperaturas promedio, así como disminución en las precipitaciones; esto incluso podría llevar a que las plantas sean incapaces de crecer en estos ambientes hostiles (FAO, 2016). Por esto, es necesario el desarrollo y/o selección de nuevas variedades de plantas cultivables que tengan mayor rendimiento usando menos agua, con el fin de poder suplir la demanda por alimentación a nivel mundial (Cominelli et al., 2013).

## **2.2. Las plantas y el estrés abiótico: mecanismos de respuestas a estrés hídrico**

Los factores abióticos como sequía, inundación, altas y bajas temperaturas, salinidad, contaminación y radiación son considerados como limitantes en la productividad de las especies de cultivo (Araus et al., 2002; Mittler, 2006; Mittler & Blumwald, 2010; Reddy et al., 2004). Además, estos factores juegan un papel importante en definir la distribución de las especies vegetales a través de los diferentes ambientes. El estrés abiótico y sus efectos en plantas, tanto en ambientes naturales como agrícolas, es un tema de gran interés, debido a los potenciales impactos del cambio climático en los patrones de precipitaciones y temperaturas extremas (Verslues et al., 2006).

En el campo, una planta puede experimentar distintas condiciones abióticas estresantes al mismo tiempo o en diferentes momentos a través de la temporada de crecimiento, como, por ejemplo, disminución de la disponibilidad de agua, temperaturas extremas (incluyendo congelamiento), disminución de la disponibilidad de nutrientes esenciales desde el suelo, exceso de luz o suelos muy duros que restringen el crecimiento de raíces (Verslues et al., 2006). Las distintas combinaciones entre los factores abióticos limitantes, son comunes en muchas áreas agrícolas alrededor del mundo y afectan la productividad vegetal. Se ha visto que las respuestas de las plantas a combinación de factores de estrés son únicas y no se pueden extrapolar directamente a lo que ocurre en presencia de un solo tipo de estrés (Mittler, 2006; Mittler & Blumwald, 2010).

La sequía está definida como la condición causada por escasez o ausencia de agua. En otras palabras, es cuando la disponibilidad hídrica es restringida para las plantas, lo cual puede interferir con los distintos procesos celulares que ocurren dentro del organismo (Zargar et al., 2017). Las plantas responden y se adaptan a la escasez hídrica para poder sobrevivir bajo estas condiciones. La respuesta se inicia cuando reconocen el estímulo, el cual activa vías de transducción de señales para transmitir la información dentro de las células, donde ocurrirán cambios en la expresión génica, los cuales serán integrados dentro de la respuesta adaptativa para modificar el crecimiento y desarrollo (Bray, 1997; Wang & Bughrara, 2007). La capacidad de la planta para responder y sobrevivir al déficit hídrico celular dependerá de todos los mecanismos que ella pueda integrar. Además, la respuesta dependerá de la especie y genotipo, la duración y severidad del estrés, la edad y estado de desarrollo de la planta, entre otros factores (Bray, 1997; Zargar et al., 2017).

Los primeros síntomas que presentan las plantas sometidas a estrés por sequía son: rápida inhibición del crecimiento de raíces y en menor grado, crecimiento del tallo, seguido por un cierre parcial o completo de los estomas (Osakabe et al., 2014; Zargar et al., 2017). Este último, va asociado con una reducción en la transpiración y absorción de CO<sub>2</sub> para la fotosíntesis y daño en el aparato fotosintético, lo que genera que el proceso se vea mermado (Chinnusamy et al., 2004; Zargar et al., 2017). Si la sequía no es mitigada, puede llevar a interrumpir el desarrollo reproductivo, senescencia foliar prematura, marchitamiento, desecación y muerte (Neumann, 2008). A nivel celular, el déficit hídrico genera pérdida de turgor, alteración en los gradientes de potencial hídrico, cambios en la fluidez y composición de membrana, alteración de la integridad de membrana y desnaturalización de proteínas (Bray, 1993; Valliyodan & Nguyen, 2006).

Cuando la planta se enfrenta a un estrés hídrico moderado, ésta responde potenciando la absorción de agua y evitando su pérdida (Shinozaki et al., 2017; Verslues et al., 2006) y reduce el tamaño de la hoja para evitar la transpiración (Zargar et al., 2017). Para reducir la pérdida de agua, el ácido abscísico (ABA) induce el cierre de los estomas, y además, el crecimiento de la planta podría ser inhibido y la senescencia foliar acelerada (Shinozaki et al., 2017). El cierre estomático ocurre en respuesta a una disminución en el turgor de las hojas y/o el potencial hídrico, o incluso a baja humedad del aire. No obstante, la respuesta estomática está más relacionada al contenido de humedad del suelo que al estatus hídrico foliar (Brestic & Zivcak, 2013).

Independiente de la causa del cierre estomático, la mayoría de las plantas tienden a mostrar un incremento en el uso eficiente del agua cuando el déficit hídrico es moderado. Este incremento resulta de una relación no lineal entre la asimilación de carbono y la conductancia estomática, esto quiere decir, que la pérdida de agua comienza a ser restringida antes que la inhibición de la fotosíntesis; las plantas han ido optimizando la absorción de carbono versus la pérdida de agua (Chaves et al., 2003; Lambers et al, 1998; Lawson & Blatt, 2014). Las variaciones en el metabolismo de fijación de carbono ocurren tempranamente en el proceso de deshidratación. En el caso de especies tolerantes a sequía, existen mecanismos de control de función estomática, que permiten la fijación de carbono, incluso en condiciones estresantes, por lo tanto, la eficiencia en el uso del agua aumenta.

Más aún, en estas especies, los estomas se abren más rápido cuando la condición de estrés finaliza (Brestic & Zivcak, 2013).

En las plantas, la productividad y la evapotranspiración están linealmente correlacionadas; esta relación refleja un compromiso entre la transpiración y la fotosíntesis, ya que los estomas regulan las tasas de difusión de vapor de agua hacia la atmósfera y del dióxido de carbono hacia la hoja (Lawson & Blatt, 2014). Un parámetro utilizado frecuentemente para describir el compromiso entre fotosíntesis y transpiración es la eficiencia en el uso del agua (EUA), la que se define como la proporción molar del carbono asimilado en la fotosíntesis (A) y el agua perdida por transpiración (E) (Nobel, 2005). Se ha demostrado que la EUA y el potencial hídrico están negativamente correlacionados; es decir, aumentos en la EUA están asociados con aumentos de estrés hídrico (potencial hídrico más negativo) (Squeo & Ehleringer, 2004). Adicionalmente, la EUA puede ser estimada como la tasa de acumulación de materia seca a través del tiempo con respecto al agua transpirada (eficiencia de transpiración), o como la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> respecto a la conductancia estomática o transpiración (EUA de intercambio gaseoso o instantáneo) (Moghaddam et al., 2013).

Por otro lado, el carbono en la atmósfera está presente en más de una forma isotópica, siendo el isótopo más liviano (<sup>12</sup>C) el que se encuentra de manera más abundante naturalmente respecto del isótopo más pesado (<sup>13</sup>C). Las moléculas con el isótopo más pesado (<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>) difunden lentamente, debido a la diferencia de masa y también reaccionan más lento durante los procesos bioquímicos (O'Leary, 1988). La discriminación contra el isótopo de carbono ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) más pesado durante la difusión del CO<sub>2</sub> a través del estoma y luego, durante la reacción de carboxilación, es catalizado por la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) (Kumar & Singh, 2009). Se ha propuesto que la discriminación es causada principalmente en plantas C3 por: fraccionamiento debido a la difusión del CO<sub>2</sub>; cambios en la resistencia estomática o la tasa de asimilación, lo cual afecta la relación de la concentración interna y ambiental de CO<sub>2</sub> y, fraccionamiento por la enzima Rubisco. Por lo tanto, los principales componentes de la fotosíntesis que influyen en la discriminación son la difusión del CO<sub>2</sub> a través del estoma y los procesos de carboxilación mediados por la Rubisco (Farquhar et al., 1989; Kumar & Singh, 2009).

La discriminación isotópica del carbono ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) también ha sido descrita como una forma útil para estimar el uso eficiente del agua (EUA) en plantas C3, dada la existencia de una correlación negativa entre EUA y  $\Delta^{13}\text{C}$  (Moghaddam et al., 2013). En general, las plantas discriminan contra este isótopo durante la fotosíntesis, lo que lleva a una disminución en la proporción del  $^{13}\text{C}$  respecto del  $^{12}\text{C}$  en la materia seca vegetal (Moghaddam et al., 2013). Este proceso depende a su vez de la relación entre la concentración intercelular foliar ( $C_i$ ), con respecto a la concentración atmosférica ( $C_a$ ) del  $\text{CO}_2$ , lo que ha sido relacionado con la conductancia estomática (Cattivelli et al., 2008; Farquhar & Richards, 1984). Por lo tanto, un aumento en la asimilación del  $\text{CO}_2$  o una disminución en la conductancia estomática tiene como consecuencia un aumento en la EUA, una disminución en la  $C_i$  y, en consecuencia, una disminución en la  $\Delta^{13}\text{C}$  (Moghaddam et al., 2013).

En el caso de programas de selección de mejoramiento genético, se puede utilizar la variación en la asimilación del  $\text{CO}_2$  (a través de la  $\Delta^{13}\text{C}$ ) como una herramienta útil para estimar indirectamente el EUA. Por lo tanto, cuando la discriminación isotópica del carbono es evaluada en la materia vegetal seca, se integra información sobre la eficiencia de transpiración y la tasa de fotosíntesis neta respecto del agua transpirada durante el período en el cual la materia seca es asimilada, por lo que  $\Delta$  y la eficiencia de transpiración están correlacionadas negativamente (Araus et al., 2003; Farquhar & Richards, 1984). Sin embargo, es necesario señalar que, si bien las plantas fraccionan el isótopo de carbono más pesado ( $^{13}\text{C}$ ) durante la fotosíntesis, la magnitud del fraccionamiento varía con el tipo de planta, el genotipo, el ambiente, entre otros factores (Cattivelli et al., 2008; Farquhar & Richards, 1984; Kumar & Singh, 2009).

Se ha descrito que la disminución en el contenido relativo de agua (RWC) y el potencial hídrico induce el cierre estomático, lo que a su vez conlleva una disminución en la tasa fotosintética foliar (Cornic, 2000; Mahajan & Tuteja, 2005; Reddy et al., 2004). Por ejemplo, en cultivares de *Olea europea*, sometidos a un período de 28 días de estrés severo (suprimiendo el riego), se observaron diferencias significativas entre cultivares de olivo al medir el RWC, así como también al comparar plantas control versus las estresadas, donde éstas últimas muestran una disminución que llega al 55% contra el 90% de RWC que mantienen las plantas control a los 28 días de tratamiento (Faraloni et al., 2011).

Por otro lado, la limitación de la fotosíntesis bajo condiciones de estrés por sequía, ocurriría por cambios en el metabolismo celular del carbono, reduciendo la capacidad bioquímica para la asimilación y utilización del carbono, debido a la baja actividad y cantidad de la enzima Rubisco y la regeneración de ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP), debido a escasez de ATP (Lawlor, 2002). El estrés hídrico también puede incrementar la actividad oxigenasa de la Rubisco, reduciendo así la eficiencia de la carboxilación (Brestic & Zivcak, 2013; Mahajan & Tuteja, 2005; Reddy et al., 2004). Además, se ha visto que las plantas pierden clorofila o desvían la luz absorbida a otros procesos, como disipación térmica para proteger el aparato fotosintético (Mahajan & Tuteja, 2005 Reddy et al., 2004), mediante un proceso no radiativo, jugando un papel central en la fotoprotección foliar. Este proceso puede disipar 75% o más de los fotones absorbidos por las hojas, lo que lleva a una disminución en la eficiencia fotoquímica del Fotosistema II (PSII) (Chaves et al., 2003).

La eficiencia fotosintética bajo estrés hídrico puede ser monitoreada a través de mediciones de fluorescencia de la clorofila. Esta herramienta es utilizada como un método rápido y no destructivo para obtener información acerca del estado del aparato fotosintético y especialmente del PSII (Baker, 2008), debido a que éste es uno de los procesos fisiológicos que primero se afecta bajo condiciones de estrés, incluso antes de que los síntomas visibles aparezcan (Lawlor & Cornic, 2002). El daño al centro de reacción del PSII inhibe los procesos fotoquímicos primarios, afectando el transporte de electrones desde el centro de reacción a la quinona A, quinona B y plastoquinona (Falqueto et al., 2017; Zushi & Matsuzoe, 2017). Sin embargo, el grado del daño al PSII varía entre especies, ya que existen algunas tolerantes y otras altamente susceptibles a la falta de agua (Ow et al., 2011).

La eficiencia fotoquímica del PSII ha sido propuesta como un buen indicador del estado fisiológico de las plantas, la cual puede ser estudiada a través del rendimiento fotoquímico del PSII ( $F_v/F_m$ , la relación entre la fluorescencia variable y máxima) (Falqueto et al., 2017; Guo & Tan, 2015; Ow et al., 2011). Por ejemplo, en estudios llevados a cabo en cultivares tolerantes y susceptibles de *O. europea* a estrés por falta de agua, se observó una disminución en la tasa de  $F_v/F_m$  a los 21 días iniciado el tratamiento en los cultivares estudiados (Faraloni et al., 2011). Sin embargo, a los 28 días existieron cultivares que mantuvieron los rangos de  $F_v/F_m$  cercanos a los valores reportados como

óptimos a plantas no estresadas (~0,8), mientras que otros, decayeron abruptamente, por lo tanto, el rendimiento fotoquímico del PSII permite discriminar entre cultivares tolerantes y susceptibles a la sequía (Faraloni et al., 2011; Ow et al., 2011).

Por lo tanto, las plantas poseen mecanismos fisiológicos que permiten disminuir la pérdida de agua en condiciones de estrés hídrico y de esta forma mantener procesos fisiológicos claves, como la fotosíntesis, lo que a su vez se ha correlacionado positivamente con una mantención de la productividad en diferentes especies de cultivo (Silva et al., 2013). Es por esto, que existen diversos parámetros que, en su conjunto, entregan información acerca del estado fisiológico de las plantas bajo condiciones de estrés hídrico, los que han sido utilizados como indicadores que permitirían estimar la actividad metabólica y el desempeño de las plantas bajo este tipo de estrés, por ejemplo, el RWC, Fv/Fm y la  $\Delta^{13}\text{C}$  (McCann & Huang, 2008).

### **2.3. Respuestas moleculares a estrés por déficit hídrico: acumulación de prolina y proteínas LEA como mecanismos de respuesta**

Las plantas responden y se adaptan a condiciones de déficit hídrico, tanto a nivel celular y molecular, mediante la acumulación de osmolitos y proteínas específicas involucradas en la tolerancia al estrés, en donde un conjunto de genes con diversas funciones es inducido o reprimido (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Diferentes aproximaciones, basadas en estudios moleculares y genéticos, han mostrado que muchos genes, proteínas y metabolitos modulan una red muy compleja de respuesta a estrés ambiental en las plantas (Cominelli et al., 2013; Munns, 2011), quienes protegen a las células del daño por estrés osmótico (Shinozaki et al., 2017).

Dentro de los principales productos de los genes inducibles por déficit hídrico, se pueden distinguir dos grupos: proteínas cuya función es aumentar la tolerancia bajo condiciones de estrés abiótico y proteínas regulatorias (genes con única función y genes regulatorios). El primer grupo incluye moléculas como chaperonas, *late embryogenesis abundant proteins* (proteínas LEA), osmotinas, proteínas anticongelantes, proteínas de unión a ARNm, enzimas claves para la biosíntesis de osmolitos, proteínas de canales hídricos, transportadores de azúcares, enzimas de detoxificación y proteasas (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). El segundo grupo reúne varios factores de transcripción,

proteínas quinasas y fosfatasas, enzimas del metabolismo de lípidos, entre otros (Cominelli et al., 2013; Nakashima et al., 2014; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

El ajuste osmótico es un mecanismo que permite a las plantas responder a estrés por déficit hídrico. Se define como la disminución del potencial osmótico debido a la acumulación neta de solutos (Chen & Jiang, 2010). La osmorregulación, en cambio, está definida como la regulación del potencial osmótico dentro de una célula por la adición o remoción de solutos de la solución hasta que el potencial osmótico intracelular es similar al potencial osmótico del medio que rodea la célula (Zhang et al., 1999).

Las plantas para evadir la deshidratación sintetizan y acumulan osmolitos (o solutos compatibles). Éstos se pueden acumular en grandes cantidades sin interrumpir las funciones celulares; actúan como agentes osmóticos balanceantes y posteriormente son degradadas una vez finalizado el evento estresante (Valliyodan & Nguyen, 2006). Son moléculas de bajo peso molecular, altamente solubles y no tóxicas para la célula a altas concentraciones celulares (Bray, 1997; Hayat et al., 2012). Además, se pueden acumular uno o más tipos de solutos compatibles (Verslues et al., 2006). Dentro de ellos podemos mencionar aminoácidos como prolinas; alcoholes azucarados, como por ejemplo pinitol y azúcares como glicina betaína, entre otros. La acumulación de estos solutos compatibles permite el ajuste osmótico, disminuyendo el potencial osmótico, lo que permite mantener el turgor celular (Bray, 1997; Chaves et al., 2003; Valliyodan & Nguyen, 2006).

La prolina es uno de los osmolitos que ha sido ampliamente estudiado en respuesta a estrés hídrico en plantas. Además, se ha reportado su acumulación frente a otros eventos de estrés, como salinidad, bajas temperaturas, exposición a metales pesados, radiación UV, entre otros (Hayat et al., 2012; Liang et al., 2013; Szabados & Saviouré, 2010). Son aminoácidos con una excepcional rigidez conformacional y son esenciales en el metabolismo primario (Szabados & Saviouré, 2010; Verbruggen & Hermans, 2008). Su acumulación en el citoplasma de la célula disminuye el potencial osmótico para balancear la disminución del potencial hídrico en el suelo (ajuste osmótico), permitiendo mantener el turgor y el contenido de agua dentro de ella (Hayat et al., 2012), protegiendo las estructuras celulares y macromoléculas durante la deshidratación, es decir, cuando el contenido de agua celular disminuye pueden actuar como “sustitutos” del agua, estabilizando la estructura celular a través de interacciones hidrofílicas y puentes de hidrógeno (Verslues &

Sharma, 2010). Las prolinas, en conjunto, funcionan como moléculas chaperonas, capaces de proteger la integridad de proteínas y potenciar las actividades de distintas enzimas. También, se le han atribuido características antioxidantes, ya que protege al aparato fotosintético y enzimas involucradas en la detoxificación de ROS (Reactive oxygen species, entre otras funciones descritas (Liang et al., 2013; Szabados & Saviouré, 2010; Valliyodan & Nguyen, 2006).

Existe un grupo de proteínas muy hidrofílicas conocidas como *late embryogenesis abundant* (LEA), las cuales se acumulan en grandes cantidades durante el último estado de maduración de la semilla, esto es, cuando ocurre la adquisición de tolerancia a desecación por parte del embrión y durante déficit hídrico en órganos vegetativos, lo que sugiere que poseen un rol de protección cuando hay limitaciones hídricas (Battaglia et al., 2008; Pedrosa et al., 2015). La presencia de proteínas LEA ha sido asociado con tolerancia celular a la deshidratación, la cual puede ser inducida por falta de agua, estrés salino y bajas temperaturas (Hundertmark & Hinch, 2008). Estas proteínas pueden ser parte del mecanismo de respuesta que tienen las plantas frente a ambientes limitantes, aminorando el efecto de los factores estresantes (Battaglia et al., 2008).

Se ha observado que la sobreexpresión de genes que codifican para proteínas LEA en plantas transgénicas ha resultado en un incremento de la tolerancia a estrés abiótico. Por esta razón, se ha propuesto que existe una correlación positiva entre la acumulación de proteínas LEA y la tolerancia de las plantas a estrés abiótico (Babu et al., 2004; Duan & Cai, 2012; Pedrosa et al., 2015). En condiciones de estrés, las posibles funciones que cumplen estas proteínas pueden ser: prevenir la inactivación de enzimas; evitar la agregación de proteínas interactuando directamente con ellas; estabilizador de membrana y secuestradores de iones (Pedrosa et al., 2015).

La mayoría de las proteínas LEA están compuestas de aminoácidos hidrofílicos ordenados en secuencias repetidas (familia de las “hidrofilinas”), caracterizado por una composición rica en glicinas y otros residuos pequeños, como alanina y serina, que favorecen una conformación flexible en soluciones acuosas (Battaglia & Covarrubias, 2013). Análisis de las secuencias aminoacídicas han separado a las proteínas LEA en 7 grupos, cada uno de ellos conteniendo motivos conservados a través de las especies, los

cuales son únicos a cada grupo (Battaglia et al., 2008; Olvera-Carrillo et al., 2011; Pedrosa et al., 2015).

#### **2.4. Reflectancia espectral y su aplicación en estudios de fenotipificación en diferentes condiciones ambientales.**

Una técnica que tiene aplicaciones en la investigación de caracteres fisiológicos es la reflectancia espectral. Ésta permite estimar, entre otras cosas, el contenido de clorofila, índice de área foliar, estatus hídrico de la planta, así como otros rasgos agronómicos y fisiológicos, los cuales son de gran interés para programas de mejoramiento genético (Araus et al., 2002). Esta técnica se basa en la capacidad que poseen las plantas de absorber y reflejar ciertas longitudes de onda de la radiación solar (Knipling, 1970), con respecto a las características fisiológicas y estructurales de las plantas (Araus et al., 2002). La ventaja de estas mediciones es que son rápidas y no destructivas, lo que permite realizar seguimientos a un gran número de individuos a lo largo de las temporadas o de un período de tiempo determinado (Araus & Cairns, 2014; Lobos et al., 2014).

La reflectancia espectral se define como la proporción entre la cantidad de fotones de luz que se reflejan en un objeto respecto de la cantidad que incide (Gates et al., 1965). Con el uso de espectrorradiómetros que miden en las longitudes de onda del rango visible e infrarrojo cercano (VIS/NIR), es posible determinar la energía reflejada por la hoja y establecer la relación entre la reflectancia a ciertas longitudes de onda y determinadas propiedades o condiciones fisiológicas de la hoja (Araus et al., 2002).

Los datos de reflectancia son utilizados para calcular Índices de Reflectancia Espectral (IREs) (Lobos & Hancock, 2015), los cuales se definen como relaciones entre valores de reflectancia de ciertas longitudes de onda. Sin embargo, el potencial uso de IREs como una herramienta para estimar diferentes variables fisiológicas y/o características fenotípicas en diferentes condiciones ambientales en un gran número de individuos, requiere necesariamente de la generación de bases de datos de parámetros fisiológicos que puedan, posteriormente, ser correlacionados con los IREs (Garriga et al., 2014; Lobos et al., 2014; Lobos & Hancock, 2015). Una vez obtenidas las correlaciones entre IREs y variables fisiológicas, se deben llevar a cabo análisis de modelos matemáticos (por ejemplo, análisis

de regresiones) para determinar el potencial predictivo de cada IRE (Garriga et al., 2017; Lobos et al., 2014).

Actualmente, los IREs reportados en literatura han sido recopilados y se encuentran disponibles en bases de datos públicas (Lobos & Poblete-Echeverría, 2017). Esto genera la posibilidad de llevar a cabo estudios que utilicen mediciones de reflectancia espectral, en donde se evalúe un gran número de IREs, los cuales deben ser correlacionados necesariamente con datos fisiológicos, morfológicos y moleculares obtenidos de manera experimental, para luego ser empleados como herramienta predictiva. En el caso del arándano, esta aproximación puede ser de gran utilidad para estimar a gran escala el rendimiento fisiológico de diferentes cultivares bajo distintas condiciones climáticas, por ejemplo, en condiciones de déficit hídrico.

## **2.5. El arándano como cultivo frutícola de interés: generalidades de la especie, estrés hídrico y su situación en Chile.**

Los arándanos (blueberries) son miembros de la familia Ericaceae, la cual incluye rododendron, azaleas, cranberry, bilberry, entre otras (Sakhanokho et al., 2018). Esta familia está dividida en cuatro subfamilias; una de ellas es Vaccinioideae, la cual contiene el género *Vaccinium* L., que a su vez contempla a la sección *Cyanococcus*, donde se encuentran las principales especies cultivadas comercialmente: arándano de arbusto bajo (*V. angustifolium* Ait.), la cual se cosecha de predios silvestres manejados en las provincias este de Canadá y el noreste de Estados Unidos; arándano ojo de conejo (*V. ashei* Reade), el cual crece en el sureste de Estados Unidos y arándano de arbusto alto (*V. corymbosum* L.), la principal especie cultivada en Norteamérica y que se puede encontrar de manera silvestre desde el sur de Nueva Escocia oeste, hacia el sur de Wisconsin y a lo largo de la costa Atlántica y al este de Texas (Pritts & Hancock, 1992).

El arándano de arbusto alto (“highbush blueberry: HB”) está ampliamente distribuido como cultivo. Se dividen en tipos del norte (northern highbush: NHB) y del sur (southern highbush: SHB), dependiendo de sus requerimientos de horas frío y resistencia al frío invernal para un desarrollo normal de las yemas florales (Lobos & Hancock, 2015; Pritts & Hancock, 1992; Retamales & Hancock, 2012).

La mayoría de las especies que integran esta familia requieren de suelos ácidos (pH entre 4,4 hasta 6) para un buen crecimiento y reproducción (Pritts & Hancock, 1992). Son arbustos caducifolios, que poseen un sistema radicular poco profundo, compuesto principalmente por raíces finas y fibrosas, las cuales carecen de pelos radiculares y tienen relativamente baja capacidad de absorción, que lo hace muy sensible al déficit y exceso de agua (Pritts & Hancock, 1992). Además, no son capaces de atravesar superficies de suelos compactas y requieren de suelos sueltos y bien drenados, con buen contenido de materia orgánica (Undurraga & Vargas, 2013).

Actualmente, es posible encontrar una gran diversidad de cultivares de arándano de arbusto alto, que derivan de programas de mejoramiento genético. Dichos programas han generado híbridos entre cultivares de la misma especie, así como híbridos interespecíficos (Brevis et al., 2008; Retamales & Hancock, 2012; Rowland et al., 2011); estos programas han apuntado a la reducción de requerimiento de horas-frío y un aumento de vida post-cosecha, entre otros atributos de interés comercial (Retamales & Hancock, 2012; Rowland et al., 2011).

Por ejemplo, la incorporación de características como tolerancia a sequía, bajos requerimientos de frío y maduración temprana ha sido logrado a través de la transferencia de genes con arándano ojo de conejo y con otras especies nativas, como *V. darrowii*, lo cual debería ser un rico pool genético para futuros mejoramientos (Lobos & Hancock, 2015; Pritts & Hancock, 1992; Rowland et al., 2011). Por lo tanto, muchos cultivares de arándano de arbusto alto son híbridos complejos, teniendo genes desde cuatro o cinco especies. Por ejemplo, el cultivar Oneal, contiene genes de *V. corymbosum*, *V. darrowii*, *V. ashei* y *V. angustifolium* (Hancock et al., 2008; Retamales & Hancock, 2012).

La falta de pelos radiculares en el arándano hace que el sistema conductor de agua sea relativamente ineficiente, a diferencia de lo que ocurre en otras especies del género, tal como *V. arboreum*, donde la presencia de una raíz principal profunda estaría confiriendo una mayor tolerancia frente a la baja disponibilidad hídrica en el suelo (Gough, 1994; Lobos & Hancock, 2015). Por el contrario, *V. corymbosum* posee raíces poco profundas, provocando que esta especie sea altamente sensible al déficit hídrico del suelo (Ameglio et al., 2000; Erb, 1993; Pritts & Hancock, 1992; Undurraga & Vargas, 2013)

Estudios previos han descrito la existencia de alteraciones en los parámetros fisiológicos en respuesta a condiciones de estrés por sequía. Por ejemplo, Moon et al., (1987) encontraron que la tasa de transpiración y la conductancia foliar fue más baja en *V. darrowii* que en un cultivar de *V. corymbosum* a altas temperaturas, lo que sugiere que *V. darrowii* puede tener mayor tolerancia a déficit hídrico a través de una disminución de la apertura de estomas y la subsecuente restricción de la pérdida de agua. En cambio, *V. corymbosum* ha mostrado ser altamente sensible al déficit hídrico, mostrando un rápido cierre estomático y reducido intercambio gaseoso (Rho et al., 2012), además de una disminución en el tamaño del fruto y del rendimiento (Ameglio et al., 2000). Adicionalmente, Estrada et al. (2015) demostraron que existen alteraciones de parámetros relacionados a la fotosíntesis y fluorescencia de la clorofila en diferentes cultivares de *Vaccinium*, pero combinando condiciones de sequía y estrés térmico. Es posible que las diferencias observadas puedan ser atribuidas a la composición genética de cada cultivar, pues existen híbridos con aportes de especies como *V. ashei* o *V. darrowii*, que han sido descritas como más tolerantes a condiciones de estrés (Lobos & Hancock, 2015).

El arándano se ha adaptado muy bien a la variedad de climas y condiciones de suelo que están presente en Chile (Bañados, 2006), sin embargo, aún falta por conocer como esta especie y sus cultivares toleran nuevas condiciones ambientales. En la principal área de producción de arándano del país, las precipitaciones han disminuido un 25% durante el siglo XX y se estima que habrá una reducción mayor, entre un 10-15% en los próximos 30 años, lo cual restringiría las áreas donde las especies de importancia económica pueden crecer (Lobos & Hancock, 2015; Moretti et al., 2010; Santibáñez & Santibáñez, 2007). Esta situación marca la necesidad de realizar estudios para evaluar como esta especie es afectada por la falta de agua y de esa forma, seleccionar genotipos que sean más tolerantes a dicha condición.

### **CAPÍTULO III**

## **DIFERENCIAS FISIOLÓGICAS Y MOLECULARES EN RESPUESTA AL ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO EN CULTIVARES DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L.)**

### 3.1. Introducción

El estrés hídrico es uno de los factores ambientales más severos que limita la productividad de los cultivos. Éste puede surgir como resultado de dos condiciones, exceso o déficit hídrico, siendo el más común la falta de agua (Mahajan & Tuteja, 2005). Por otro lado, este efecto puede verse exacerbado ya que el calentamiento global puede potenciar el déficit hídrico en muchos lugares del mundo, disminuyendo la productividad en especies cultivables que tienen importancia económica (Shinozaki et al., 2017).

Los actuales modelos de cambio climático predicen incrementos drásticos en la temperatura, así como reducciones en las precipitaciones, en especial en zonas de climas mediterráneos, lo que puede llevar a eventos de sequía prolongada (IPCC, 2014; Mittler & Blumwald, 2010). La sequía puede generar impactos considerables sobre las funciones fisiológicas fundamentales de la planta, como fotosíntesis, adquisición de nutrientes esenciales, así como en el rendimiento (Feller, 2016). Diferentes aproximaciones, basadas en estudios moleculares y genéticos, han mostrado que muchos genes, proteínas y metabolitos modulan una red muy compleja de respuesta a estrés ambiental en las plantas (Cominelli et al., 2013; Nakashima et al., 2014).

Por ejemplo, se ha documentado que la acumulación de osmolitos y proteínas específicas, reguladas por un conjunto de genes que se inducen o reprimen por el estrés, sería un mecanismo exitoso que permite tolerar condiciones de déficit hídrico (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Uno de estos osmolitos es la prolina, quien participa en el ajuste osmótico, permitiendo mantener el turgor y el contenido de agua intracelular. Además, protege las estructuras celulares y macromoléculas durante la deshidratación y se ha mostrado que funcionan como moléculas chaperonas, capaces de proteger la integridad de proteínas y potenciar las actividades de distintas enzimas, entre otras funciones (Hayat et al., 2012; Liang et al., 2013; Szabados & Saviouré, 2010; Valliyodan & Nguyen, 2006; Verslues & Sharma, 2010). Por otro lado, la acumulación de proteínas LEA ha sido asociada con tolerancia celular a la deshidratación, la cual puede ser inducida por falta de agua, estrés salino y/o bajas temperaturas (Hundertmark & Hinch, 2008).

En la literatura se han reportado diversos genes que se inducen en respuesta a condiciones de déficit hídrico. Por ejemplo, *AREB1* y *AREB2* (los cuales son factores de transcripción tipo bZIP) son inducidos por déficit hídrico en raíces y tallos de tomate; a su

vez, *AREBI* induce la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas a estrés oxidativo, proteínas de transferencia de lípidos y proteínas LEA, quienes ayudan a aumentar la tolerancia a estrés (Orellana et al., 2010). Otro caso es el gen *LEA3* (del grupo 3 de proteínas LEA) identificado en maíz, en donde la acumulación de transcritos aumentó en tejido foliar bajo distintos tipos de condiciones estresantes, entre ellas, estrés osmótico; además, la sobreexpresión de este gen en plantas transgénicas de tabaco confirió tolerancia a estrés osmótico y oxidativo (Liu et al., 2013). Por último, análisis de perfiles de expresión mostraron que muchos genes que codifican para proteínas LEA fueron altamente expresados en cultivares de algodón tolerantes a déficit hídrico (*G. tomentosum*) comparado con los cultivares susceptibles a este estrés (*G. hirsutum*) (Magwanga et al., 2018).

A nivel fisiológico, cuando la planta se enfrenta a estrés hídrico, ésta responde potenciando la absorción de agua y reduciendo su pérdida por transpiración, a través del cierre de los estomas, proceso regulado por ABA (Shinozaki et al., 2017; Verslues et al., 2006). Este mecanismo, si bien reduce la pérdida de agua por transpiración, genera también una disminución en la absorción de CO<sub>2</sub> para la fotosíntesis, provocando que el rendimiento fotosintético disminuya (Chaves et al., 2009; Chinnusamy et al., 2004; Zargar et al., 2017). A pesar de estas respuestas de mitigación, el déficit hídrico puede llevar a una reducción en el crecimiento y una disminución en el rendimiento del cultivo (Seki et al., 2002; Shinozaki et al., 2017). Esta situación se agudiza aún más en especies que poseen un sistema radicular poco profundo, ya que se genera una permanente dependencia de riego, como es el caso de frutillas (Adak et al., 2018), frambuesas (Morales et al., 2013) y arándanos (Retamales & Hancock, 2012).

El arándano de arbusto alto (*Vaccinium corymbosum* L.) es un arbusto caducifolio, que posee un sistema radicular compuesto de raíces finas y sin pelos radiculares (Pritts & Hancock, 1992), las cuales se concentran, en su mayoría, dentro de los primeros 30 cm del suelo (Bryla & Strick, 2007). Esto significa que el déficit hídrico tendrá un efecto rápido en la planta (Estrada et al., 2015). En Sudamérica, el arándano está siendo ampliamente cultivado, ya que permite abastecer en contraestación al mercado norteamericano. La mayor demanda de este fruto está dada por los altos niveles de antocianinas que posee el fruto, transformándolo en una fuente de antioxidantes naturales (Huang et al., 2012; Routray & Orsat, 2011).

La especie se subdivide en cultivares del norte (NHB: northern highbush blueberry) y del sur (SHB: southern highbush blueberry). Los cultivares NHB están adaptados a bajas temperaturas, son más resistentes al frío invernal y tienen requerimientos de frío superiores que los SHB; éstos últimos no toleran temperaturas inferiores al congelamiento y requieren menos horas-frío de acumulación para que las yemas florales puedan brotar (Hancock et al., 2008; Lobos & Hancock, 2015; Retamales & Hancock, 2012). Estas características definen donde pueden crecer y ser explotados comercialmente (Strik, 2005). Los cultivares SHB han derivado de programas de mejoramiento genético que buscan reducir el requerimiento de horas-frío, obteniéndose híbridos entre *V. corymbosum* con otras especies del género que tienen menores requerimientos de horas-frío (Brevis et al., 2008). A raíz de este hecho, se ha mencionado en la literatura que los SHB pudiesen ser más tolerantes a condiciones de déficit hídrico, debido a que muchos de los cultivares de este grupo son híbridos interespecíficos, en donde las especies parentales son más tolerantes a este tipo de estrés, característica que podría ser transferida a la descendencia (Galleta & Ballington, 1996; Lobos & Hancock, 2015; Retamales & Hancock, 2012). Sin embargo, no existe evidencia experimental que confirme esta hipótesis.

Chile se ha convertido en un importante productor y exportador de frutos de arándanos en el hemisferio sur. La región centro-sur del país (34° a 38°S) es el área más importante de producción de arándanos, caracterizada por excelentes condiciones para su crecimiento y es donde se obtienen los mayores rendimientos (Bañados, 2006; Retamales et al., 2014). Sin embargo, esta región productora ha mostrado una disminución en las precipitaciones, lo cual se espera que se agudice en los próximos años (Naciones Unidas, 2010; Santibáñez & Santibáñez, 2007), producto de las alteraciones en los patrones globales de temperatura y precipitaciones (Lobos & Hancock, 2015). La falta de agua para riego pone en alerta a los productores, ya que el arándano, debido a las características del sistema radicular que posee depende de riego suministrado (Lobos & Hancock, 2015).

A pesar de que el arándano se ha adaptado muy bien a una variedad de condiciones de suelo y clima en nuestro país, aún existen desafíos en diversos aspectos de este cultivo, como, por ejemplo, mayor tolerancia a déficit hídrico (Bañados, 2006; Retamales et al., 2014). Este hecho es relevante dada las nuevas condiciones que enfrenta la actividad frutícola debido al cambio climático a nivel mundial, donde se proyecta una disminución en

las precipitaciones, por lo tanto, habrá una menor disponibilidad hídrica en el suelo y para el riego (IPCC, 2014). Cabe señalar que, hasta la fecha, pocos son los estudios que han evaluado los efectos del estrés hídrico en arándano u otras especies del género (Estrada et al., 2015; Glass et al., 2005; Mingeau et al., 2001; Percival et al., 2003; Taulavouri et al., 2010), además de los posibles mecanismos que se inducen en respuestas al déficit hídrico y que permitan una mayor tolerancia a dicha condición. Esto marca la necesidad de generar conocimiento respecto a cómo influye el estrés hídrico en el desempeño de distintos cultivares de arándano y de esa forma, seleccionar genotipos que sean más tolerantes a dichas condiciones o escenarios ambientales futuros.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el desempeño fisiológico y molecular de cultivares de arándano bajo condiciones de déficit hídrico, a través de distintas mediciones fisiológicas y expresión relativa de genes candidatos relacionados a proteínas LEA, para posteriormente, comparar las respuestas entre cultivares NHB y SHB e identificar cultivares más tolerantes y susceptibles a dicho estrés.

## 3.2. Materiales y Métodos

### Obtención de material biológico y condiciones de estrés

Para este estudio, se trabajaron con 6 cultivares de arándano. En la Tabla 3.1 se detalla la clasificación de estos cultivares (NHB o SHB), el pedigree y la composición genética de cada uno de ellos. Las plantas utilizadas en el experimento fueron obtenidas a partir de cultivo *in vitro*, material disponible del banco de germoplasma del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, de la Universidad de Talca. Cabe señalar que estos cultivares fueron seleccionados debido a que son de importancia agrícola y se cultivan en diferentes regiones de Chile (Retamales et al, 2014).

El material vegetal fue propagado en medio de cultivo que contiene las sales de WPM (Woody Plant Medium) (Lloyd & McCown, 1980) y las vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con sacarosa y 2-iP (6- $\gamma$ , $\gamma$ -dimetilalilaminopurina, un regulador de crecimiento) a diferentes concentraciones dependiendo del cultivar de arándano, las cuales fueron evaluadas y determinadas en ensayos preliminares del laboratorio (Tabla 3.2). El pH fue ajustado a 5.2 con NaOH y/o HCl previo a la esterilización en autoclave a 121° C por 20 minutos. Las plantas en cultivo *in vitro* fueron mantenidas en condiciones controladas en cámaras de crecimiento a 23°C, con fotoperíodo de 16 hrs luz/8 hrs oscuridad, en dependencias del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Talca.

Obtenido el banco de germoplasma, las plantas fueron distribuidas en bandejas almacigueras (conteniendo turba y perlita, 4:1 como sustrato), las que fueron cubiertas con una tapa de policarbonato hasta que enraizaran, con fotoperíodo de 16 hrs luz/8 hrs oscuridad y temperatura de 23°C en cámaras de crecimiento. Se regaron periódicamente con agua y cada dos semanas se aplicó fertilizante Ultrasol® Crecimiento (SQM, Chile) en el riego. Posteriormente, las plantas fueron traspasadas a maceteros de plástico de 800 ml en el mismo sustrato indicado anteriormente, manteniéndose el mismo esquema de riego y fertilización, para finalmente ser llevadas al invernadero donde se realizó el procedimiento experimental. El tiempo transcurrido desde el trabajo en cultivo *in vitro* hasta la obtención de plantas en macetas, fue aproximadamente de 12 meses.

**Tabla 3.1.** Clasificación de los cultivares de arándano utilizados en los experimentos de estrés por déficit hídrico. Se indica el pedigree de cada uno de los cultivares (<https://www.ars-grin.gov/cor/catalogs/vacblue.html>), así como también la composición de especies que tiene cada uno de ellos (extraído de Lobos et al., 2015; Rowland et al., 2003). NHB: arándano de arbusto alto del norte, SHB: arándano de arbusto alto del sur. VC: *Vaccinium corymbosum*; VA: *V. angustifolium*; VD: *V. darrowii*; Vas: *V. ashei*.

Tipo de arándano	Cultivar	Pedigree	Composición de especies (%)
NHB	Elliott	Burlington x US 1 [Dixi x (Jersey x Pioneer)]	100 VC
	Bluegold	Bluehaven x Me-US 5 (Ashworth x Bluecrop)	89,5 VC 14,1 VA
	Brigitta	open pollinated Lateblue (at Michigan State University) selected in Australia	100 VC
SHB	Biloxi	Sharpblue x [US210(US67 x US132) x Florida 4-76(Bluecrop x13-236)]	41,8 VC
			1,8 VA 32,5 VD 11,3 Vas
	Sharpblue	<i>V. corymbosum</i> x <i>V. ashei</i> & <i>V. darrowii</i> (Fla 61-5 x Fla 62-4) tetraploid	43,7 VC
			28,8 VA
			15 VD 12,5 otras
O'Neal	Wolcott x Fla. 4-15 mainly <i>V. corymbosum</i> , some <i>V. angustifolium</i> , <i>V. ashei</i> , <i>V. darrowii</i>	84 VC 10 VA 3 VD 3 Vas	

**Tabla 3.2.** Medio de cultivo utilizado en la micropropagación de variedades de arándano. WPM: Woody Plant Medium; MS: Murashige & Skoog; 2-iP: 6- $\gamma,\gamma$ -dimetilalilaminopurina.

<b>Cultivar</b>	<b>Medio Multiplicación</b>	<b>Sacarosa</b>	<b>Regulador de crecimiento</b>	<b>pH</b>
Biloxi	WPM + vitaminas de MS	35 g	2 mgL <sup>-1</sup> <b>2ip</b>	5,2
Sharpblue	WPM + vitaminas de MS	30 g	3 mgL <sup>-1</sup> <b>2ip</b>	5,2
Brigitta	WPM + vitaminas de MS	35 g	3 mgL <sup>-1</sup> <b>2ip</b>	5,2
Elliott	WPM + vitaminas de MS	30 g	4 mgL <sup>-1</sup> <b>2ip</b>	5,2
O'Neal	WPM + vitaminas de MS	30 g	5 mgL <sup>-1</sup> <b>2ip</b>	5,2
Bluegold	WPM + vitaminas de MS	30 g	5 mgL <sup>-1</sup> <b>2ip</b>	5,2

Para determinar el volumen de agua a utilizar en cada tratamiento, se estimó el contenido relativo de humedad del sustrato, a través de la medición de la conductividad eléctrica del suelo (Freeland, 1989) utilizando sensores de humedad (sondas ECHO-R2; Onset, USA). Esta técnica se basa en la correlación negativa existente entre la resistencia eléctrica del suelo y su contenido de agua: a medida que el contenido de agua del suelo disminuye, su resistencia eléctrica aumenta y puede medirse a través de su conductividad (Freeland, 1989).

Se evaluaron 5 volúmenes de riego diferentes: 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml y 300 ml, los cuales fueron aplicados día por medio durante una semana en 5 macetas sin plantas, pero con las mismas condiciones de sustrato. La información fue registrada en un datalogger y a partir de los resultados obtenidos, se estimó un volumen de riego de 300 ml para la condición control y un volumen de riego de 150 ml para la condición de estrés. Estos volúmenes de riego fueron utilizados en el ensayo posterior en plantas mantenidas en macetas y en el mismo sustrato evaluado. Asimismo, se mantuvo la periodicidad del riego, aplicando día por medio para mantener las condiciones del tratamiento estables en el tiempo.

El procedimiento experimental fue llevado a cabo en un invernadero de policarbonato, ubicado en las dependencias de la Universidad de Talca campus Lircay, bajo condiciones naturales de luz y temperatura, durante un período de 6 semanas (entre diciembre 2016 y enero 2017). Las plantas fueron dispuestas aleatoriamente sobre un mesón e identificadas de acuerdo al cultivar y tratamiento correspondiente. El riego

diferenciado fue aplicado día por medio y las mediciones y muestreos de material vegetal se realizaron al inicio, 2, 4 y 6 semanas del inicio del experimento. En cada fecha se tomaron mediciones y muestras de 5 réplicas biológicas por cultivar. En el siguiente punto, se detallan las variables respuestas que se midieron para evaluar la respuesta a estrés por déficit hídrico en los distintos cultivares de arándano.

### **Parámetros fisiológicos utilizados para evaluar estrés hídrico**

**Contenido relativo de agua (RWC):** se colectó una hoja representativa y completamente extendida de la zona media de cada planta, de las cuales se obtuvieron valores de peso fresco (FW), peso turgente (TW) y peso seco (DW), donde el RWC se calculó según Kaya et al., (2002):

$$RWC = [(FW-DW)/(TW-DW)]*100$$

En cada muestreo, las hojas obtenidas por cada cultivar y tratamiento fueron pesadas de manera independiente para obtener el peso fresco, luego incubadas en agua destilada por 24 horas a temperatura ambiente y oscuridad. Transcurrido el tiempo, fueron sacadas del agua destilada y el exceso de agua fue retirada con papel absorbente y pesadas nuevamente, obteniendo el peso turgente (TW). Luego de ello, las hojas fueron puestas a secar en estufa a 65°C por 48 horas para obtener el peso seco (Taulavuori et al., 2010; Wu et al., 2016).

**Fluorescencia de la clorofila:** se estimó el desempeño fotoquímico del fotosistema II (PSII) como la eficiencia fotoquímica (Fv/Fm), donde Fv= [Fm-Fo], Fm= rendimiento máximo de la fluorescencia y Fo= rendimiento mínimo de la fluorescencia, usando un fluorímetro portátil de amplitud modulada Pocket PEA (Hansatech Instruments, UK). Las hojas fueron adaptadas previamente a oscuridad durante 20 minutos. Se consideraron dos hojas completamente extendida de la zona media de cada réplica biológica.

**Contenido de prolina:** para la determinación del contenido de prolina se siguió el protocolo descrito por Bates et al., (1973) con modificaciones. Se colectaron hojas de cada planta las cuales fueron inmediatamente colocadas en nitrógeno líquido hasta su almacenamiento a -80°C. El tejido almacenado fue posteriormente molido con nitrógeno líquido y a partir de esto, se utilizó 100 mg de tejido pulverizado, el cual fue colocado en un

tubo de 15 ml y se homogenizó con 2 ul de ácido sulfosalicílico al 3%. Se centrifugó a 7000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Del sobrenadante se obtuvo 1 ml y se mezcló con 1 ml de reactivo de ninhidrina y 1 ml de ácido acético glacial. Se calentó en un baño a 100°C por 45 minutos y luego se enfrió en hielo por 30 minutos. Finalmente, se adicionó 1,5 ml de tolueno y se homogenizó. Una última centrifugación fue realizada a 7000 rpm por 10 minutos. La absorbancia fue leída a 520 nm, en un espectrofotómetro Jenway 6300 (Cole-Parmer, Staffordshire, UK), usando tolueno como blanco. La concentración de prolina fue determinada en base a la curva estándar y al peso fresco.

**Composición isotópica del  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ):** por cada cultivar y condición de riego se obtuvieron hojas a la sexta semana de iniciado el experimento y se colocaron en estufa a secar por 3 días a 60°C, previo al análisis de isótopos. Para ello, las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Isótopos Estables, de la Universidad de Montana, donde fueron pesadas y calcinadas en cápsulas de estaño (IVA Analysentechnik, Meerbusch, Germany) en un analizador elemental (vario PYRO CUBE) acoplado con un espectrómetro de masa (IsoPrime100, UK). La composición isotópica del  $^{13}\text{C}$  fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [({}^{13}\text{C} / {}^{12}\text{C})_{\text{muestra}} / ({}^{13}\text{C} / {}^{12}\text{C})_{\text{estándar}} - 1]$$

Donde el estándar corresponde a carbonato de calcio de Pee Dee Belemnite (PBD) (Farquhar et al., 1989; Farquhar & Richards, 1984). A su vez, la discriminación isotópica fue obtenida de la siguiente manera:

$$\Delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = (\delta^{13}\text{C}_a - \delta^{13}\text{C}_p) / [1 + (\delta^{13}\text{C}_p / 1000)]$$

Donde a y p se refiere al aire y la planta, respectivamente.

### **Análisis de perfiles transcripcionales de genes candidatos de la familia LEA**

**Extracción y purificación de ARN total de hojas:** se colectaron hojas las cuales fueron colocadas en nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. El tejido fue molido hasta polvo con morteros estériles y se utilizó nitrógeno líquido para este proceso. El método utilizado para la extracción de ARN fue el del Perclorato de Sodio con modificaciones Davies & Robinson (1996). El buffer de

extracción contenía: 5M perclorato de sodio, 300 mM Tris-HCl pH 8, 1% SDS, 2% v/v PEG-20000, 8,5 p/v PVPP y 3% v/v 2-mercaptoetanol. Las modificaciones consistieron en precipitar los ARNs con 0,25 vol. de LiCl 10M.

Obtenido el ARN total, se procedió a la verificación de la calidad e integridad del ARN mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, además de sus relaciones de absorbancia 260/280 nm, en el rango de 1,8 a 2,0. Todas las muestras fueron cuantificadas empleando un espectrofotómetro de placa (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek). Posterior a ello, el ARN total fue purificado utilizando el kit comercial TURBO DNA-Free (Ambion by Life Technologies), siguiendo el protocolo establecido por el proveedor, para remover el ADN genómico contaminante.

**Síntesis de ADN complementario (cDNA):** la reacción de transcripción reversa para la síntesis de cDNA de cadena simple se realizó a partir de 1-2 ug de ARN total, previamente tratado con Turbo DNA-Free. Los cDNA fueron obtenidos con el kit comercial Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 ul, conteniendo 2 ug de ARN total, 0,25 ul de Oligo (dT)<sub>18</sub> primer, agua libre de nucleasa llevando a un volumen de 14 ul y luego adicionando 4 ul 5X Reaction Buffer, 1 ul dNTPs Mix (10 mM) y 1 ul M-MuLV Reverse Transcriptase. El perfil térmico de reacción consistió en una incubación a 25°C por 10 minutos, luego 15 minutos a 50°C y para terminar la reacción 5 minutos a 85°C. Los cDNA fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

**Búsqueda de secuencias y diseño de partidores:** se llevó a cabo la búsqueda de genes candidatos codificantes para proteínas de la familia LEA, utilizando como referencia dos transcriptomas de arándano anotados y publicados (Gupta et al., 2015; Rowland et al., 2012). Asimismo, se utilizaron secuencias ESTs (expressed sequence tags) provenientes de una librería de *V. corymbosum* cultivar Bluecrop disponibles en NCBI (Dhanaraj et al., 2004). Los ESTs fueron ensamblados utilizando el software CAP3 (Huang & Madan, 1999) utilizando los parámetros por defecto. Esta librería ensamblada fue anotada mediante alineamientos con BLASTx utilizando como referencia la base de datos NR (NCBI), para

posteriormente buscar en esta anotación genes codificantes para proteínas de la familia LEA.

Seleccionadas las secuencias de interés, se realizó un alineamiento en Blastx para determinar los marcos de lecturas abiertos (ORF) y diseñar partidores específicos de la región 3'UTR. Se emplearon herramientas como Genscan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN>) y Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>) para verificar los ORF y realizar la traducción de las putativas proteínas. El diseño de partidores específicos para los genes candidatos se realizó en la región terminal 3'-UTR, utilizando como temperatura de “melting”  $59^{\circ}\text{C}\pm 1$ , largo de amplicon entre 60 a 200 pares de bases (pb) y longitud del partidor entre 18 a 24 pb. Todos los partidores fueron obtenidos con el programa Beacon Designer 8.12 (Premier Biosoft, USA), los cuales se muestran en la Tabla 3.3.

**Análisis de expresión génica:** La expresión de los genes de interés fue determinada mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR) utilizando un termociclador Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, USA). Las reacciones de amplificación del cDNA se llevaron a cabo con el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), en un volumen final de 20 ul, conteniendo 2 ul de cDNA diluido (50 ng), 10 ul de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 0,8 ul de cada partidor específico (forward y reverse) a una concentración de 10 nM, completando el volumen final con agua libre de nucleasas. Dos réplicas técnicas fueron corridas por cada réplica biológica. Como control negativo se utilizó agua en vez de cDNA y como control positivo ADN genómico de arándano.

El perfil de temperaturas utilizado para qRT-PCR fue el siguiente:  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de:  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $60^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto,  $72^{\circ}\text{C}$  por 20 segundos (Vashisth et al., 2011). Al final de cada paso de amplificación se midió la fluorescencia y al término de la amplificación, se generó una curva de disociación mediante la lectura continua de la fluorescencia durante el incremento de temperatura desde  $55$  a  $95^{\circ}\text{C}$ . Para los cálculos de expresión relativa de cada gen de interés se utilizó el método descrito por Pfaffl (2001), siendo expresada en relación a genes normalizadores

*Polyubiquitin 3 (UBQ3b)*, *Actin 7 (ACT7)* y *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* descritos para arándano por Vashisth et al., (2011) y Zifkin et al., (2012).

**Clasificación según dominios conservados:** para un análisis más profundo de las secuencias anotadas como putativas proteínas LEA (de acuerdo a la información disponible en las bases de datos de arándano), se realizó la búsqueda de dominios conservados en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), con el fin de poder clasificar las proteínas según los grupos de LEA reportados en literatura y de esa manera, relacionar las funciones que pudiesen estar cumpliendo la acumulación de los distintos transcritos frente a estrés hídrico.

### **Diseño experimental y análisis estadísticos**

El ensayo se llevó a cabo con 6 cultivares de arándano, donde se utilizaron 5 réplicas biológicas (una planta en una maceta) por cada condición (control y estrés) y el diseño fue en bloques completamente aleatorio. Se utilizaron diferentes aproximaciones estadísticas para analizar las variables respuestas medidas e integrar los resultados, y a partir de ello, inferir grados de tolerancia o susceptibilidad al déficit hídrico.

En primer lugar, se determinaron las diferencias estadísticas entre los tratamientos, mediante análisis de varianza de dos vías (ANOVA), seguido por un test de Tukey's ( $p \leq 0,05$ ); esto fue realizado por cada cultivar en los casos donde se obtuvieron mediciones a través del tiempo (sólo para RWC y Fv/Fm) y en otros casos, sólo a la sexta semana de tratamiento para todos los cultivares ( $\delta^{13}\text{C}$ , contenido de prolina y expresión relativa de genes candidatos). Todo esto se llevó a cabo con el programa STATISTICA 8.0 (StatSoft, USA), previa verificación de los supuestos de normalidad. Además, se obtuvieron las diferencias (delta) de las variables medidas en condición de estrés respecto de la condición control, a partir de los promedios de cada caso. De esta manera, se compararon las magnitudes de las diferencias de cada variable respuesta en el tiempo.

Para la integración de las variables de respuestas medidas a la sexta semana de estrés (RWC, Fv/Fm,  $\delta^{13}\text{C}$  y contenido de prolina) en los distintos tratamientos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para determinar si existen diferencias entre los tratamientos (control y estrés), así como también, entre cultivares NHB y SHB

sometidos a estrés hídrico. Como factores de agrupación se utilizaron los cultivares y tratamiento (control y estrés) y el tipo de cultivar (NHB y SHB) solo considerando plantas estresadas. Para esto, se utilizó el programa StatGraphics Centurion XV (StatPoint Technologies, USA). Además, se generó una ecuación para proporcionar una estimación general del desempeño de los cultivares usando los valores de RWC, Fv/Fm,  $\delta^{13}\text{C}$  y contenido de prolina, transformando los valores de cada variable a una escala de 0 a 1. Se consideró una ponderación de 0,3 para RWC, Fv/Fm y  $\delta^{13}\text{C}$ , debido a que son factores más relevantes en cuanto al desempeño de las plantas y una ponderación de 0,1 para el contenido de prolina. El desempeño del cultivar (Dc) fue calculado de la siguiente manera:

$$\text{Desempeño} = [(0,3*\text{RWC}) + (0,3*\text{Fv/Fm}) + (0,3* \delta^{13}\text{C}) + (0,1*\text{Prolina})*100$$

**Tabla 3.1** Partidores usados en los análisis de expresión génica. Se indican partidores para genes candidatos de la familia LEA y genes normalizadores. Los números de identificación no subrayados corresponden a secuencias disponibles en Genbank y los subrayados corresponden a secuencias públicas disponibles y asociadas a proyectos de secuenciación de arándano. Partidores reportados por \*Walworth et al., (2012); \*\*Zifkin et al., (2012); \*\*\* Vashisth et al., (2011).

<b>Nombre del gen candidato</b>	<b>Número de identificación</b>	<b>Secuencia de partidores</b>
<i>Dehidrina 1</i>	AF030180.1	FW-5'- GGTGGTGGTGTGATAAG-3' RV-5'-GACGTGATGATGAATCAATCTAAT-3'
<i>Dehidrina 2</i>	AY660960.1	FW-5'- ATC TCT AGG TGT GGA CAG-3' RV-5'- AGC ACT CTT CTC ATT TCT TT-3'
<i>Dehidrina 3</i> (*)	AY660959.1	FW-5'-CGCGGCGATTAGATCGAA-3' RV-5'-AGCTAGCGTAGAGGCGGAAA-3'
<i>Lea 1</i>	<u>CUFF.38534.1</u>	F-5'-CACATTATTGTTGTCGTACTAT-3' R-5'- ACAAGATAGAAGGGAATCAC-3'
<i>Lea 2</i>	<u>contig07652</u>	F-5'- GATAAACACCAAAACTGAAGA-3' R-5'- GGTCAAATCCAAACAAATATAAC-3'
<i>Lea 3</i>	<u>contig13365</u>	F-5'-GTTTGTGTTGTA ACTCCATCA-3' R-5'-TTAAATATCAGAAACCAAGGTAC-3'
<i>RD22</i>	<u>gene.g32217.t1.1</u>	FW-5'- CCACAAGACCACCACCAA-3' RV-5'- ACACAGCCACTGCCTTAGC-3'
<i>GAPDH</i> (**)	-	FW- 5'-GGTTATCAATGATAGGTTTGGCA-3' RV-5'- CAGTCCTTGCTTGATGGACC-3'
<i>UBQ3b</i> (***)	-	FW-5'-CCTCCAATTGGTGCTCCGT-3' RV-5'-AGATGAGCCTCTGCTGATCCG-3'
<i>ACT7</i> (***)	-	FW-5'-TGGTCCATCCATTGTCCACAGGAA-3' RV-5'-TATGCCCTTCCAGTTGCAATCACC-3'

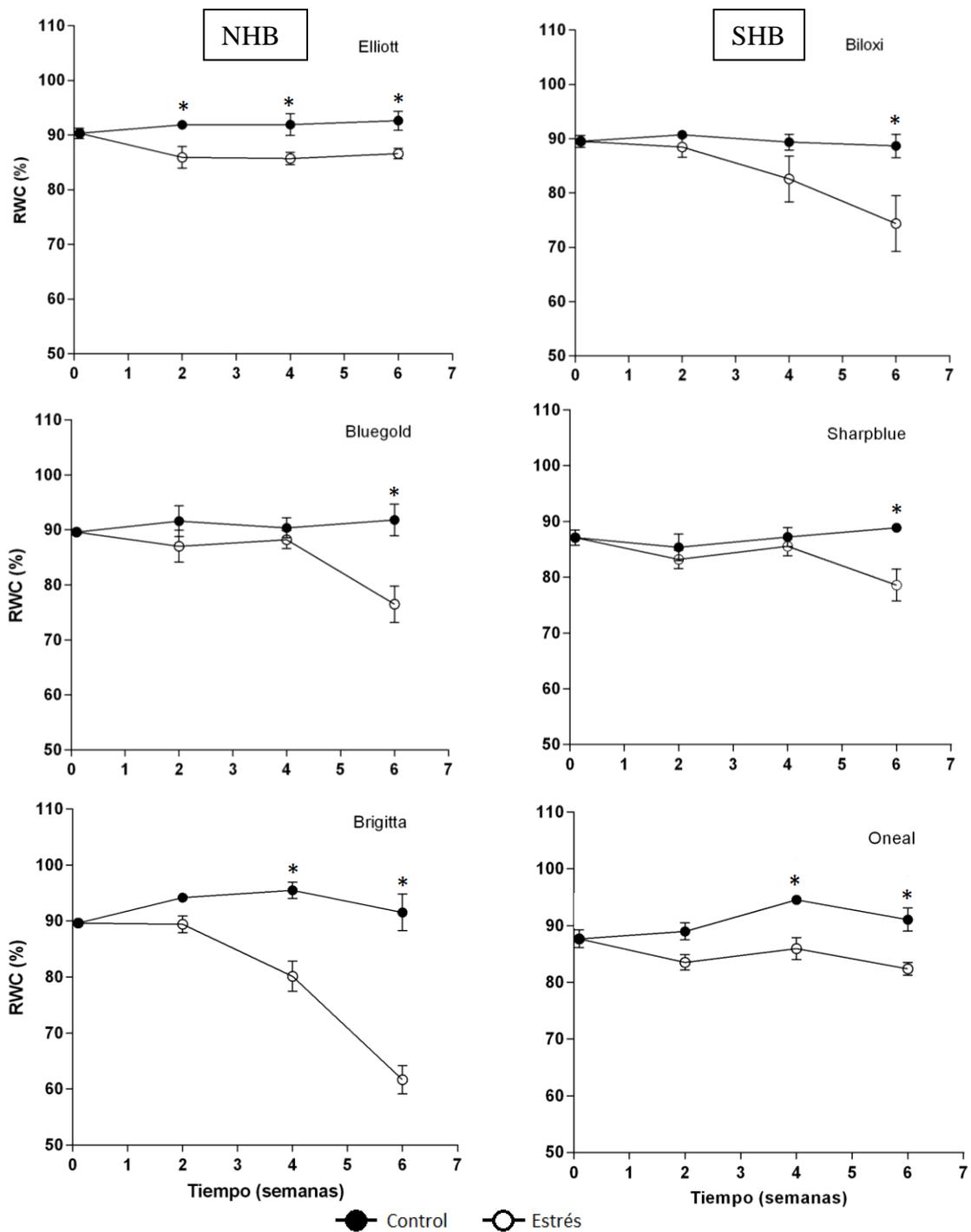
### 3.3. Resultados

#### Contenido relativo de agua

El contenido relativo de agua (RWC) disminuyó significativamente en todos los cultivares bajo el tratamiento de estrés, a lo largo de un período de 6 semanas (Figura 3.1). Los valores arrojados por el ANOVA, analizando por cultivar, se pueden apreciar en la Tabla S.1, donde se evidenció que, para todos los cultivares, el riego tuvo un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre el RWC. El tiempo también tuvo un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre el RWC, excepto para Elliott y Sharpblue ( $p = 0,52$  y  $p = 0,92$ , respectivamente).

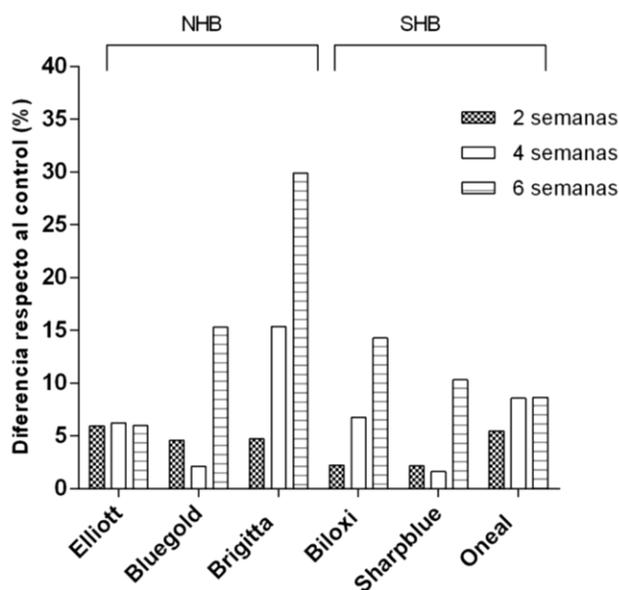
En la mayoría de los cultivares, la disminución del RWC se hace evidente entre las 4 y 6 semanas de iniciado el experimento (Figura 3.1). Si se comparan los resultados a la semana 6, el cultivar que presentó la disminución más drástica fue Brigitta, donde las plantas estresadas alcanzaron un 61,7% en promedio, versus, un 91,5% de RWC de las plantas control a la sexta semana de tratamiento. Por el contrario, los cultivares donde se mantuvieron valores de RWC muy similares durante todo el tiempo del experimento (plantas estresadas versus control) fueron Elliott, Oneal y Sharpblue. Para el caso de Elliott, las plantas estresadas alcanzaron un 86,6% de RWC, mientras que las plantas control un 92,6%. Oneal obtuvo un 82,3% de RWC en plantas estresadas y un 91% en plantas control y Sharpblue alcanzó como promedio para plantas estresadas un 78,5% y un 88,8% de RWC en plantas control.

Al analizar las diferencias porcentuales entre las plantas estresadas respecto de las plantas control, en los distintos tiempos de mediciones (2, 4 y 6 semanas, respectivamente), se pudo observar que el cultivar Elliott es quien presenta la menor variación del RWC durante todo el tiempo del experimento, esto es, alrededor de un 6% de diferencia entre plantas control y estresadas (Figura 3.2). Luego, sigue el cultivar Oneal, quien a la segunda semana mostró una diferencia cercana al 5%. Este mismo cultivar mostró una diferencia de un 9% aproximadamente a la cuarta y sexta semana de tratamiento. En el caso del cultivar Sharpblue, se observaron diferencia respecto al control de un 2% aproximadamente (segunda y cuarta semana); a la sexta semana alcanzó un 10% (Figura 3.2).



**Figura 3.1.** Contenido relativo de agua (RWC) de cultivares de arándanos durante un período de 6 semanas. Plantas condición control regadas con 300 ml de agua y condición de estrés regadas con 150 ml de agua. NHB: arándano arbusto alto del norte, SHB: arándano arbusto alto del sur. Se indican las barras de error estándar. Las letras indican las diferencias entre tratamientos. \* representa diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en un mismo tiempo.

Los cultivares Bluegold y Biloxi presentaron diferencias porcentuales similares a la sexta semana de estrés, esto es, aproximadamente un 15% de diferencia entre plantas estresadas respecto al control (Figura 3.2) y durante la segunda y cuarta semana, se comportaron similar a lo descrito para los cultivares mencionados en el párrafo anterior. Por último, el cultivar Brigitta es quien presentó las mayores diferencias entre plantas estresadas y plantas control, alcanzando un 30% de diferencia respecto al control a la sexta semana (Figura 3.2).



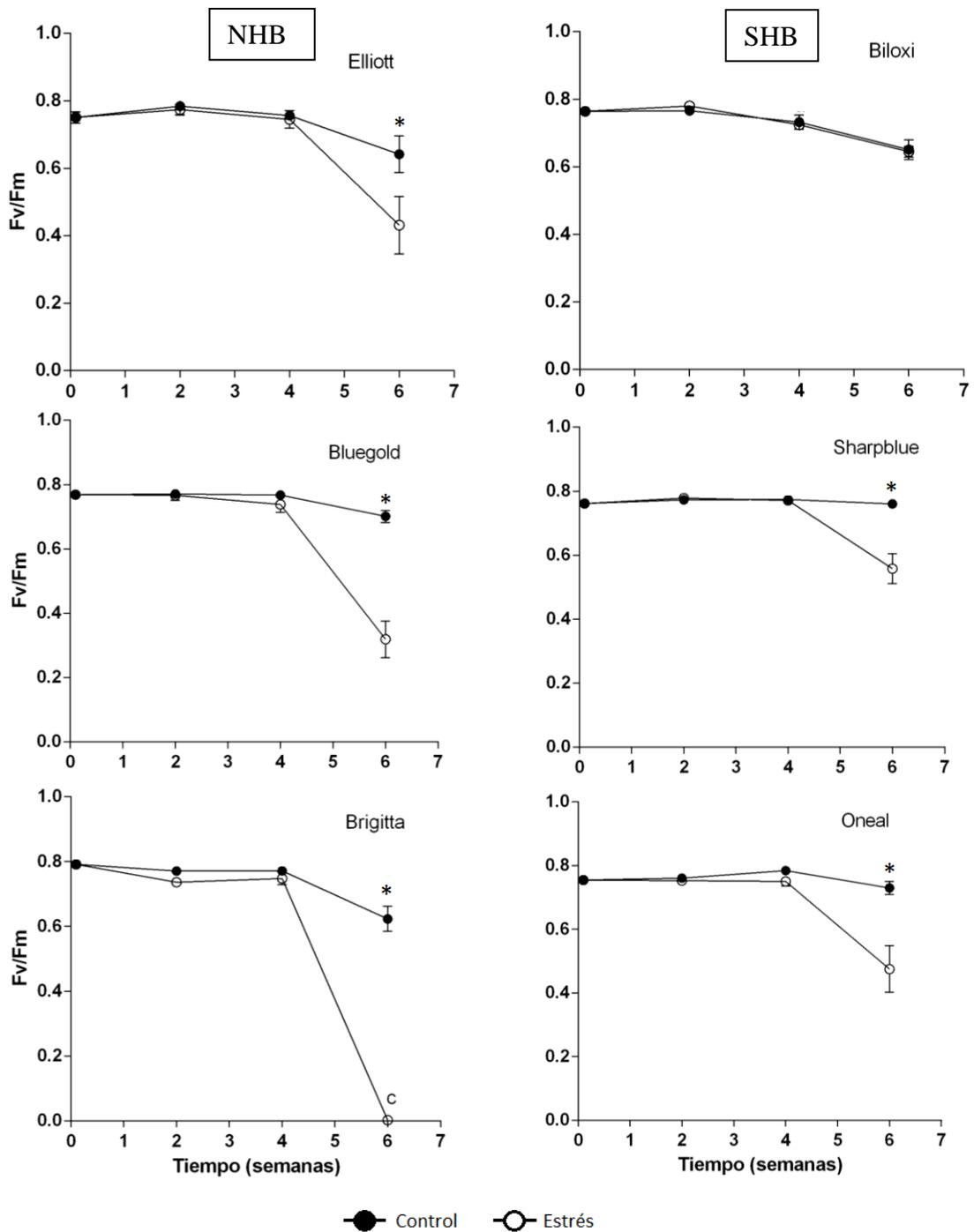
**Figura 3.2.** Diferencias porcentuales del contenido relativo de agua de cultivares de arándano a las 2, 4 y 6 semanas de estrés respecto de la condición control. NHB: arándano arbusto alto del norte (Elliott, Bluegold, Brigitta); SHB: arándano arbusto alto del sur (Biloxi, Sharpblue, Oneal).

### **Fluorescencia de la clorofila**

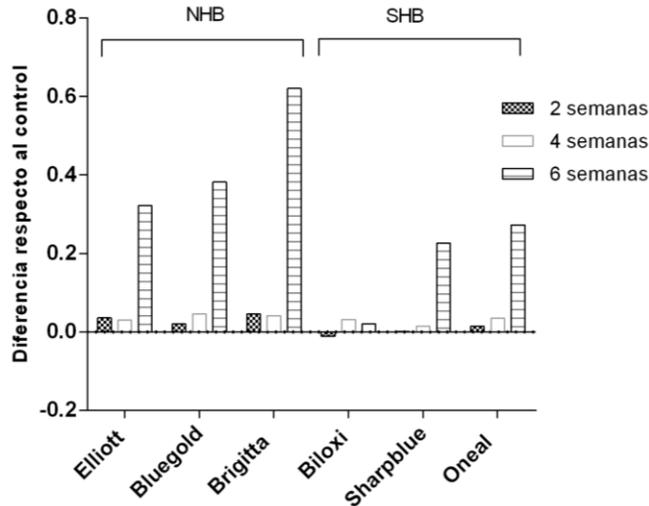
El rendimiento fotoquímico del fotosistema II (Fv/Fm) disminuyó principalmente, entre la cuarta y sexta semana de estrés, en todos los cultivares de arándano estudiados (Figura 3.3). El ANOVA realizado por cultivar (Tabla S.2), reveló que el riego tuvo un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre el Fv/Fm, excepto en el cultivar Biloxi ( $p = 0,98$ ). Asimismo, el tiempo tuvo un efecto significativo en el Fv/Fm ( $p < 0,05$ ) en todos los cultivares. Es interesante observar lo que ocurre en Biloxi donde, si bien disminuye el Fv/Fm a través del tiempo, no existe variación entre plantas estresadas y control (Figura 3.3).

El Fv/Fm de plantas control de Bluegold, Sharpblue y Oneal se encuentran dentro de los rangos esperados para plantas no estresadas, esto es, valores superiores a 0,7 (Maxwell & Johnson, 2000); sin embargo, en los cultivares Biloxi, Elliott y Brigitta los valores son levemente inferiores (0,65; 0,64 y 0,62; respectivamente). Para el caso de plantas sometidas a estrés, las del cultivar Bluegold alcanzaron el valor promedio más bajo de Fv/Fm (0,31), seguido por Elliott y Oneal (0,43 y 0,47). Biloxi y Sharpblue obtuvieron valores promedios de 0,64 y 0,55, respectivamente. Es importante señalar, que las plantas estresadas del cultivar Brigitta, arrojaron valores bajísimos para este parámetro, indicando que podrían estar muy estresadas.

Cuando se analizaron las diferencias que existen entre las plantas estresadas respecto de las plantas control, se observó que el cultivar Biloxi presentó la menor variación de Fv/Fm durante todo el tiempo del experimento, seguido por Sharpblue y Oneal (Figura 3.4). Elliott, Bluegold y Brigitta fueron los cultivares que mostraron mayores diferencias del Fv/Fm de plantas estresadas, a la sexta semana de tratamiento (Figura 3.4).



**Figura 3.3.** Rendimiento fotoquímico del PSII (Fv/Fm) en los cultivares de arándanos estudiados en un período de 6 semanas con riego diferenciado. Plantas condición control regadas con 300 ml de agua y condición de estrés regadas con 150 ml de agua. NHB: arándano arbusto alto del norte, SHB: arándano arbusto alto del sur. Se muestran las barras de error estándar. Las letras indican las diferencias entre tratamientos. (\*) representan las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en un mismo tiempo.



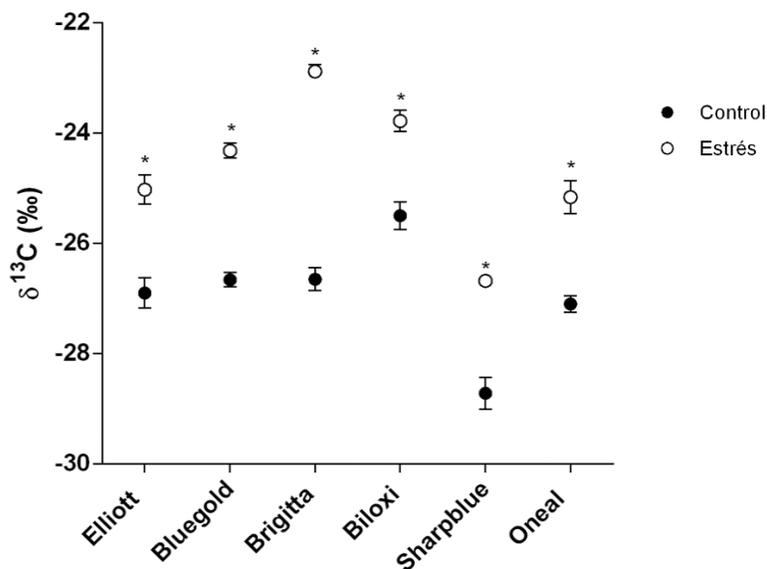
**Figura 3.4.** Diferencias en el rendimiento fotoquímico del PSII ( $F_v/F_m$ ) en los cultivares de arándano a las 2, 4 y 6 semanas de estrés respecto de la condición control. NHB: arándano arbusto alto del norte (Elliott, Bluegold, Brigitta); SHB: arándano arbusto alto del sur (Biloxi, Sharpblue, Oneal).

### Composición y discriminación isotópica del $^{13}\text{C}$

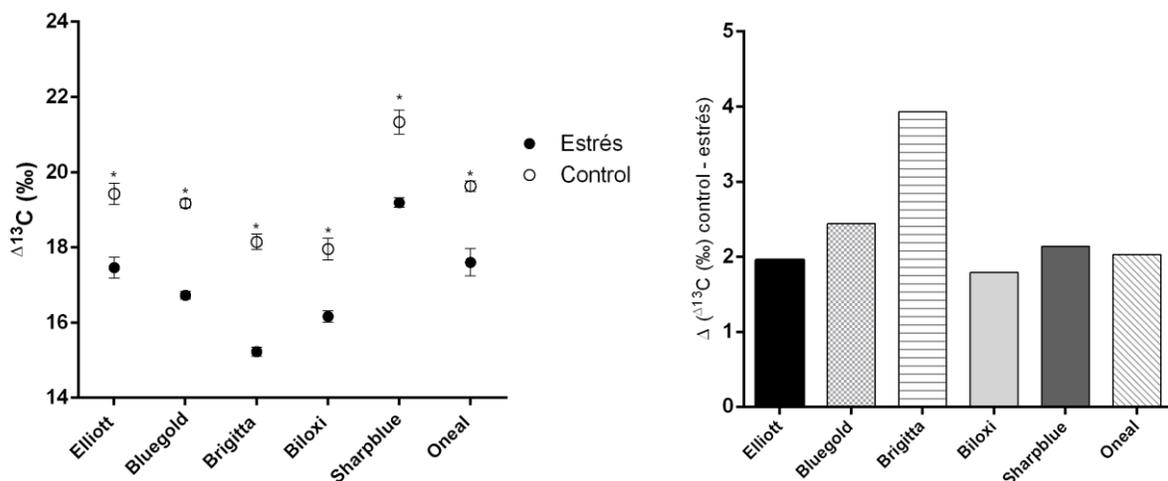
La composición isotópica del  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) fue distinta entre los cultivares estudiados y hubo variación entre plantas control y estresadas a la sexta semana de tratamiento (Figura 3.5). Los valores promedios de las plantas control fluctuaron desde -25,5 a -28,72 (‰), y corresponde a los cultivares Biloxi y Sharpblue, respectivamente. Las plantas bajo condiciones de estrés moderado, evidenciaron una composición entre -22,9 y -26,6 (‰), y corresponden a Brigitta y Sharpblue, respectivamente (Figura 3.5). El ANOVA mostró que el riego tuvo un efecto significativo sobre la discriminación isotópica ( $p < 0,05$ ) y que estas diferencias son significativas en cada cultivar estudiado (Tabla S.3).

A partir de los valores de composición isotópica obtenidos, se calculó la discriminación isotópica ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) para cada cultivar y tratamiento, de acuerdo a la fórmula señalada en la metodología. En condiciones de estrés hídrico, el cultivar que discriminó más contra el  $^{13}\text{C}$  fue Sharpblue y el que discriminó menos fue Brigitta (Figura 3.6 a), ya que valores más alejados de cero indican que la planta discrimina más contra el isótopo pesado ( $^{13}\text{C}$ ), esto quiere decir, que en la cavidad subestomática estará enriquecido con  $^{12}\text{CO}_2$  y valores más cercanos a cero indican que la planta discrimina menos contra el  $^{13}\text{C}$ , por lo que en la

cavidad subestomática habrá una mayor proporción de  $^{13}\text{CO}_2$ . Asimismo, el cálculo de la diferencia de la  $\Delta^{13}\text{C}$  entre plantas control y tratamiento por cada cultivar (Figura 3.6 b), mostró que el cultivar con mayor diferencia fue Brigitta comparado con el resto de cultivares que mostraron una diferencia similar entre ellos.



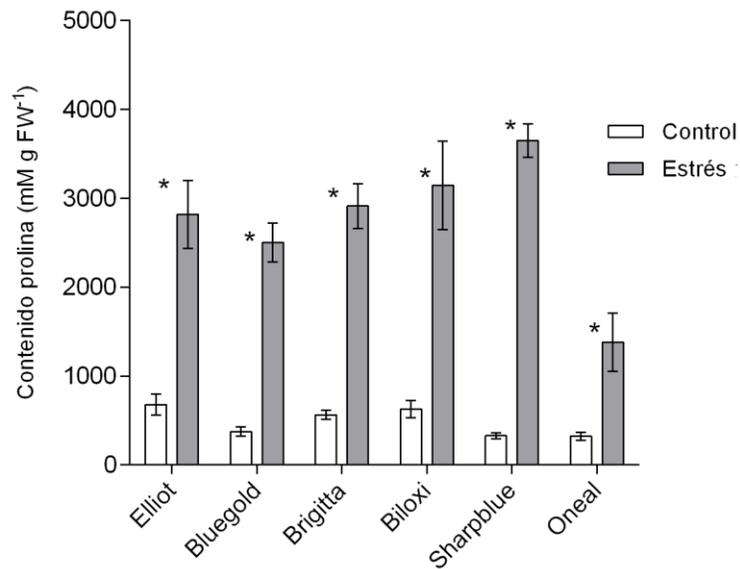
**Figura 3.5.** Composición isotópica del  $^{13}\text{C}$  (‰) de los cultivares de arándano a la semana 6 de estrés. Círculos negros indican plantas en condición control (regadas con 300 ml de agua) y círculos blancos muestran plantas sometidas a estrés hídrico moderado (regadas con 150 ml de agua). Se muestran las barras de error estándar. \* representan las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en un mismo tiempo.



**Figura 3.6 a)** Discriminación isotópica del  $^{13}\text{C}$  (‰) de los cultivares de arándano a la semana 6 de estrés. Círculos negros indican plantas en condición control (regadas con 300 ml de agua) y círculos blancos muestran plantas sometidas a estrés hídrico moderado (regadas con 150 ml de agua). Se muestran las barras de error estándar. \* representan las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en un mismo tiempo. **b)** Diferencias entre control y estrés respecto de la  $\Delta^{13}\text{C}$  en cada cultivar.

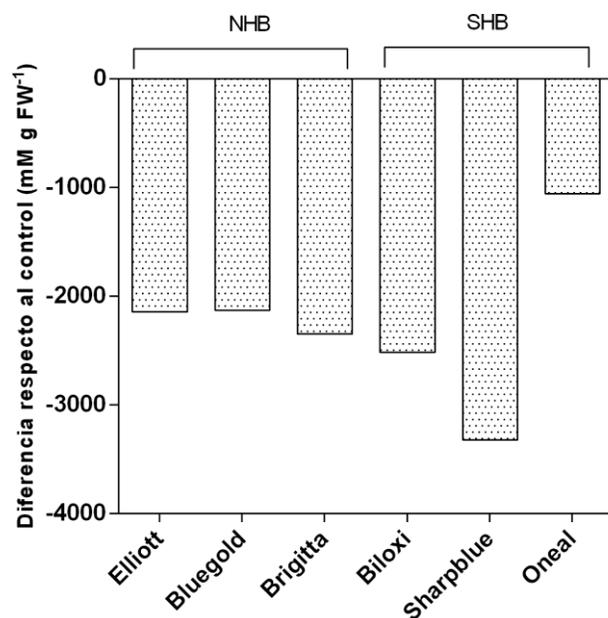
### Contenido de prolina

Cuando se midió el contenido de prolina a la sexta semana de tratamiento, se observó un aumento en la acumulación de este osmolito en las plantas sometidas a estrés moderado, respecto de las plantas control (Figura 3.7). El aumento se observó en todos los cultivares de arándano estudiados. Sin embargo, el cultivar que mostró una mayor acumulación en condiciones de estrés fue Sharpblue y el que acumuló menos prolina fue Oneal (Figura 3.7). El aumento en la acumulación de prolina en plantas estresadas alcanzó el doble o triple de la concentración, respecto de las plantas control. El ANOVA reveló que el riego tiene un efecto significativo sobre la acumulación de prolina ( $p < 0,05$ ) y que las diferencias observadas son significativas en todos los cultivares de arándano evaluados (Tabla S.3).



**Figura 3.7.** Concentración de prolina en los cultivares de arándano, medida a la sexta semana de experimento. Plantas en condición control, regadas con 300 ml de agua (barras blancas) y plantas bajo estrés moderado, regadas con 150 ml de agua (barras grises). Se muestra el error estándar en cada barra. \* representan las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en un mismo tiempo.

Cuando se calcularon las diferencias entre el contenido de prolina de las plantas estresadas respecto al control (Figura 3.8), se pudo observar que para los cultivares del grupo NHB (Elliott y Bluegold, y en Brigitta), las diferencias de las plantas estresadas respecto al control son similares entre ellos. Por el contrario, en los cultivares del grupo SHB, las diferencias respecto al control son mayores; particularmente, el cultivar Sharpblue mostró la mayor diferencia respecto al control. Sin embargo, el cultivar Oneal evidenció la menor diferencia respecto al control, lo cual está correlacionado con la menor acumulación de prolina en plantas estresadas.



**Figura 3.8.** Diferencias respecto al control en el contenido de prolina de los cultivares de arándano a la semana 6 de tratamiento de estrés. NHB: arándano arbusto alto del norte, SHB: arándano arbusto alto del sur.

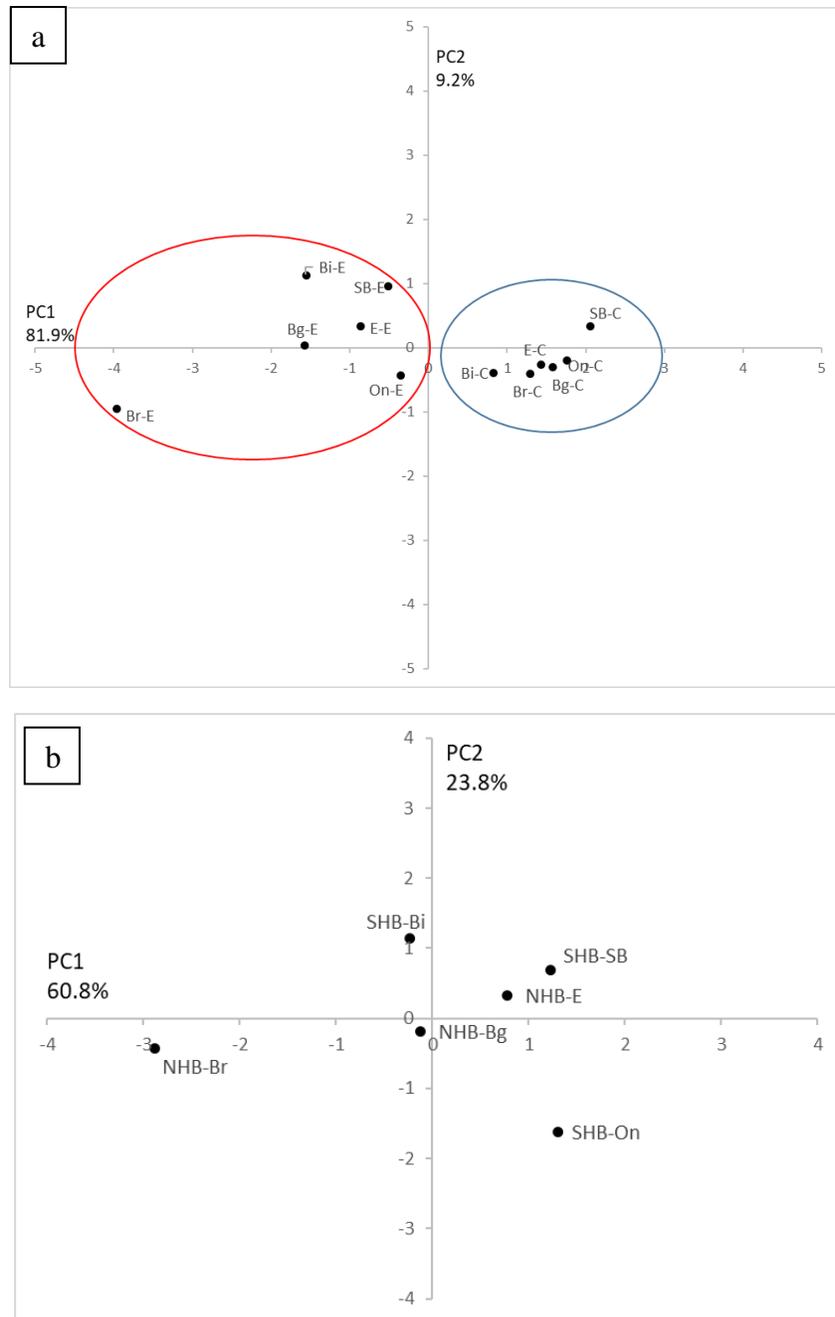
### **Análisis de componentes principales y estimación del desempeño de los cultivares**

Los resultados del análisis de componentes principales permitieron integrar las variables de respuestas medidas en condiciones de déficit hídrico y de esta manera, que nos permitiera separar entre cultivares o grupos (NHB y SHB. Como factores de agrupación se utilizaron los cultivares y tratamiento (control y estrés) (Figura 3.9 a) y el tipo de cultivar (NHB y SHB) solo considerando plantas estresadas (Figura 3.9 b).

En la Figura 3.9a, se puede observar que el componente 1 aportó 81,9% de la varianza de los datos y el componente 2 aportó 9,2%, que en total estarían explicando el 91,1% de la varianza de los datos. Resulta interesante señalar, que el análisis de componentes separó claramente a las plantas control (lado positivo del PC2) y las plantas sometidas a estrés hídrico moderado (lado negativo del PC1). Por otro lado, en la Figura 3.9b, se observa que el componente 1 aportó el 60,8% de la varianza y el componente 2 el 23,8% de la varianza de los datos, que en total representan el 84,6%. En este caso, al realizar el análisis de componentes sólo con plantas estresadas y considerando el tipo de

cultivar como factor de agrupación, no se distingue un patrón claro que separe NHB y SHB, ya que los cultivares-según origen- se distribuyen en ambos componentes. Sin embargo, los cultivares NHB se distribuyen cercano al eje (X), mientras que los cultivares SHB se separan con tendencia al eje (Y) (Figura 3.9b).

En cuanto a la estimación del desempeño de cada cultivar, los resultados obtenidos para cada cultivar en los respectivos tratamientos, permitió generar una categorización de ellos en función de las variables de respuesta medidos a la sexta semana. En condiciones control, el cultivar que tuvo el mejor desempeño fue Sharpblue ( $D_c=41,96\%$ ) y el cultivar que tuvo el menor desempeño fue Brigitta ( $D_c=37,7\%$ ). Por el contrario, en condiciones de estrés hídrico moderado, el cultivar que tuvo mejor desempeño fue Biloxi ( $D_c=36,26$ ) y el que tuvo el peor desempeño, coincidente con lo ocurrido en condiciones control, fue el cultivar Brigitta ( $D_c=13,29\%$ ) (Tabla 3.4). Cabe señalar que el patrón observado como mejor y peor cultivar en condiciones control y bajo estrés, fue el mismo utilizando distintas ponderaciones a las variables de respuesta en la ecuación del cálculo del desempeño.



**Figura 3.9.** Análisis de componentes principales (PCA) realizado con las variables fisiológicas medidas. **a)** PCA que representa los cultivares de arándano a la sexta semana de tratamiento (plantas control encerradas con círculo rojo y plantas estresadas encerradas con círculo azul), **b)** PCA que representa a las plantas estresadas de los cultivares de arándano y su origen (NHB: arándano arbusto alto del norte, SHB: arándano arbusto alto del sur) a la sexta semana de tratamiento. Br: Brigitta, Bi: Biloxi, SB: Sharpblue, Bg: Bluegold, E: Elliott, On: Oneal.

**Tabla 3.4:** Desempeño de los cultivares (%) calculado a partir de las variables fisiológicas medidas a la sexta semana de tratamiento (RWC, Fv/Fm,  $\delta^{13}\text{C}$  y Contenido de prolina). Se destacan en negrita los cultivares con mejor y peor desempeño en condición control y estrés.

<b>Cultivar</b>	<b>Desempeño Control</b>	<b>%</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Desempeño Estrés</b>	<b>%</b>
<b>Sharpblue (SHB)</b>	0,41954	<b>41,96</b>	<b>Biloxi (SHB)</b>	0,36256	<b>36,26</b>
Oneal (SHB)	0,41573	41,57	Sharpblue (SHB)	0,33699	33,70
Bluegold (NHB)	0,40688	40,69	Elliott (NHB)	0,33389	33,39
Elliott (NHB)	0,39443	39,44	Oneal (SHB)	0,32229	32,23
Biloxi (SHB)	0,39010	39,01	Bluegold (NHB)	0,26773	26,77
<b>Brigitta (NHB)</b>	0,37700	<b>37,70</b>	<b>Brigitta (NHB)</b>	0,13288	<b>13,29</b>

### **Expresión relativa de genes de la familia LEA**

Mediante la búsqueda de secuencias nucleotídicas en bases de datos disponibles para arándano (transcriptomas y librerías de EST), se identificaron, en una primera etapa, 40 secuencias candidatas putativamente anotadas como proteínas LEA. El análisis posterior de ellas permitió filtrar secuencias duplicadas, así como secuencias contenidas dentro de otras. Se obtuvo un total de 18 secuencias diferentes sobre las cuales se diseñaron los partidores en la región 3'-UTR. Los partidores fueron evaluados en un pool de cDNA de cultivares de arándano, logrando amplificar un total de 6 secuencias (Tabla 3.3). Además, se obtuvo un putativo gen marcador de estrés (*RD22*: dehydration-responsive protein), a partir de las secuencias disponibles.

La clasificación según dominios conservados de las 7 secuencias que se utilizaron para el análisis de expresión relativa, arrojó que la mayoría tuvo similitud con genes que codifican para proteínas de la familia LEA (Tabla 3.5). Los genes candidatos denominados como *dehidrina 1*, *dehidrina 2* y *dehidrina 3* fueron clasificadas dentro de “Dehydrin superfamily”. *Lea 1* fue clasificado como “Late embryogenesis abundant protein LEA4”; *Lea 2* dentro del grupo “Late embryogenesis abundant protein LEA3” y *Lea 3* fue clasificada como “Laminin Domain II”. Por último, el gen candidato *RD22* fue clasificado como una “BURP (*RD22*) containing domain protein”. Por lo tanto, esta clasificación basada en la búsqueda de dominios conservados, permitió relacionar estos genes candidatos

con secuencias homólogas descritas en otras especies y confirmar que las secuencias estudiadas corresponden a putativos genes que codifican para proteínas LEA y para el gen marcador de estrés *RD22*.

Para el análisis de expresión diferencial de los putativos genes codificantes de proteínas LEA, se evaluaron 3 genes normalizadores: *GAPDH*, *ACT7* y *UBQ3b*. Se determinó cuál de estos genes tuvo expresión más estable, utilizando el programa basado en Excel, NormFinder (Andersen et al, 2004). Los resultados de este análisis arrojaron que el gen normalizador más estable fue *ACT7*. Por lo tanto, los niveles de expresión relativa de los genes candidatos fueron normalizados con *ACT7* (Figura 3.10).

**Tabla 3.5.** Clasificación de los genes candidatos empleados en el análisis de expresión relativa mediante qRT-PCR. Se indica el nombre del candidato (designado en este trabajo), la anotación correspondiente indicada en la base de datos desde donde se extrajo la secuencia, clasificación según dominios conservados (Pfam) y el identificador de la secuencia.

Nombre gen candidato	Anotación en bases de datos	Clasificación según dominios conservados	E-value	Identificador de secuencia
<i>Dehidrina 1</i>	Dehydrin 1 (bbdhn1)	Dehydrin superfamily	7.5e-19	AF030180.1
<i>Dehidrina 2</i>	COR11 (bbdhn7)	Dehydrin superfamily	2.3e-17	AY660960.1
<i>Dehidrina 3</i>	14-kDa dehydrin (bbdhn6)	Dehydrin superfamily	2.3e-03	AY660959.1
<i>Lea1</i>	Late embryogenesis abundant protein Dc3	Late embryogenesis abundant protein LEA4	1.0e-019	CUFF.38534.1
<i>Lea2</i>	Late embryogenesis abundant protein Lea5	Late embryogenesis abundant protein LEA3	8.3e-20	contig07652
<i>Lea3</i>	Late embryogenesis abundant protein	Laminin Domain II	3.4e-03	contig13365
<i>RD22</i>	Dehydration-responsive protein RD22	BURP (RD22) containing domain protein	9.72e-93	gene.g32217.t1.1

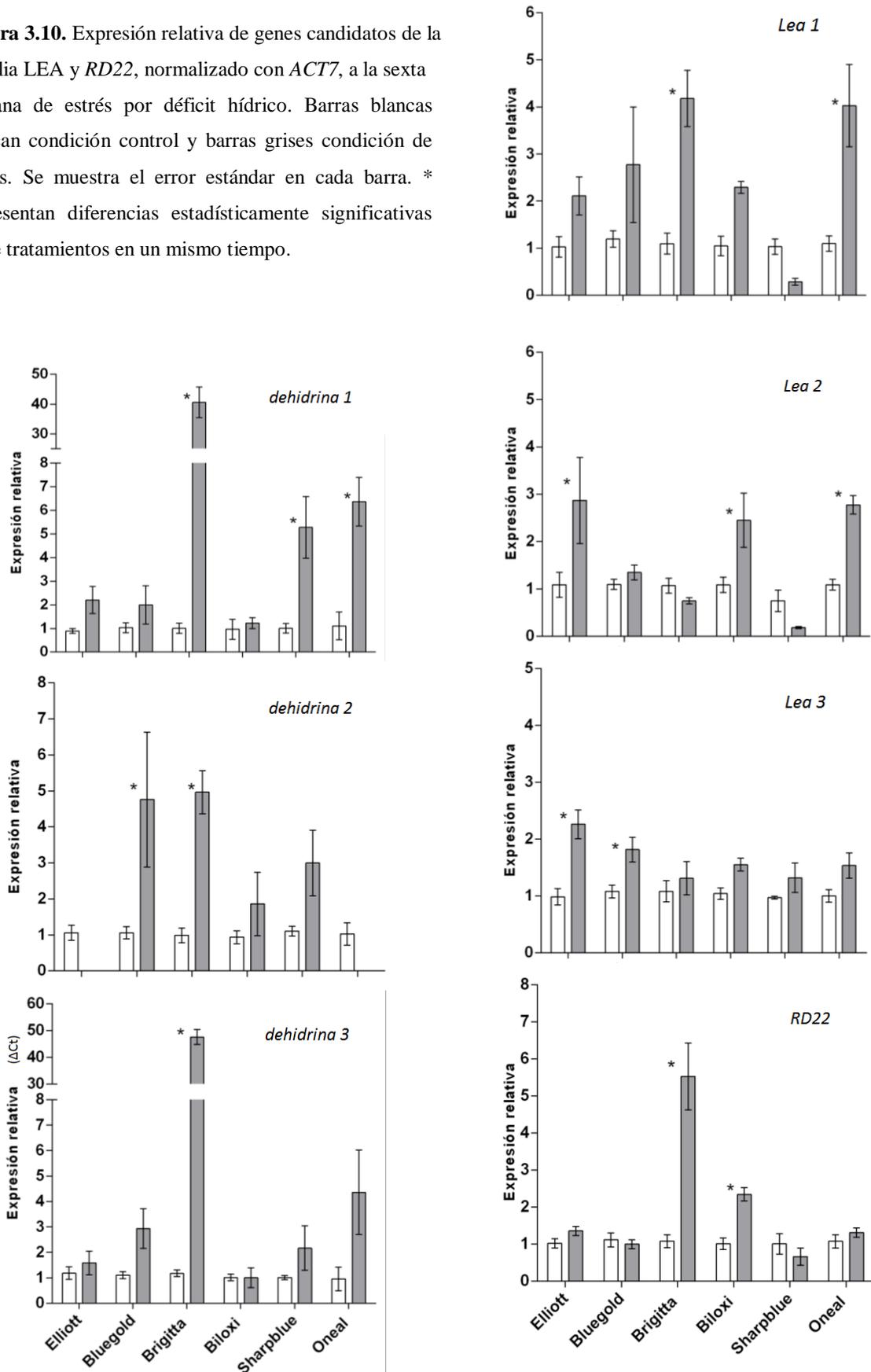
Los niveles de expresión relativa, medidos a la sexta semana de estrés hídrico, variaron entre los cultivares de arándano estudiados (Figura 3.10). El gen candidato *dehidrina 1* mostró un aumento en los niveles de transcritos en la condición de estrés

respecto a la condición control en todos los cultivares, siendo mayor la inducción en los cultivares Brigitta, Sharpblue y Oneal (Figura 3.10). Para el gen candidato *dehidrina 2*, dos cultivares no evidenciaron inducción (Elliott y Oneal), a diferencia de los restantes cultivares que aumentan los niveles de acumulación de transcritos (Figura 3.10). En el caso del gen candidato *dehidrina 3*, hubo acumulación de transcritos en casi todos los cultivares, excepto en Biloxi, donde los niveles de expresión relativa en condición de estrés fue igual al control (Figura 3.10).

El gen *Lea 1* mostró inducción en todos los cultivares, excepto en Sharpblue (Figura 3.10). Los niveles de expresión relativa del gen *Lea 2* mostró un aumento significativo en los cultivares Elliott, Biloxi y Oneal, situación distinta a los cultivares Brigitta y Sharpblue, donde no se observó un aumento de transcritos. En el caso del cultivar Bluegold hubo una leve inducción del gen (Figura 3.10). El candidato *Lea 3* mostró un aumento de los niveles de transcritos en todos los cultivares (Figura 3.10). Por último, el gen candidato *RD22* mostró una inducción, principalmente en el cultivar Brigitta y Biloxi. Por el contrario, en el cultivar Sharpblue hubo una reducción en su expresión (Figura 3.10).

El ANOVA mostró que, a la sexta semana de tratamiento, el riego tiene un efecto significativo en la expresión relativa de los distintos genes candidatos ( $p < 0,05$ ) (Tabla S.4). Las diferencias observadas en la expresión relativa de genes fueron significativamente distintas según el cultivar ( $p < 0,05$ ); sin embargo, esto no fue así para el candidato *Lea 3* ( $p = 0,14$ ) (Tabla S.4).

**Figura 3.10.** Expresión relativa de genes candidatos de la familia LEA y *RD22*, normalizado con *ACT7*, a la sexta semana de estrés por déficit hídrico. Barras blancas indican condición control y barras grises condición de estrés. Se muestra el error estándar en cada barra. \* representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en un mismo tiempo.



### 3.4. Discusión

#### *Tolerancia o susceptibilidad de cultivares de arándano a condiciones de déficit hídrico*

La falta de agua es uno de los factores ambientales que afecta el rendimiento de las especies de cultivo, ya que su escasez afecta tanto la formación de biomasa como la calidad de los frutos, generando grandes pérdidas a nivel mundial (Lopez et al., 2012). Las respuestas de las plantas al déficit hídrico pueden ser medidas y cuantificadas, a través de distintas aproximaciones. En nuestro estudio se evaluaron parámetros fisiológicos de seis cultivares de arándano (*V. corymbosum*) en respuesta a estrés hídrico, lo que evidenció que el déficit hídrico tiene un efecto sobre el desempeño de las plantas y que existen diferencias entre cultivares, siendo algunos más sensibles que otros a la falta de agua.

La medición del contenido relativo de agua es un método directo que permite estimar el contenido de agua de una muestra, en este caso tejido foliar, respecto de la cantidad máxima de agua que puede retener en condiciones de máxima turgencia. En general, los valores de RWC fluctúan entre un 98% (hojas turgentes) y un 40% (hojas con deshidratación severa). En la mayoría de las especies de cultivo, el RWC cercano al punto de marchitamiento es de alrededor del 60 a 70% (Retamales & Hancock, 2012). En este trabajo, las plantas control de todos los cultivares de arándano tuvieron un RWC cercano al 90% durante el desarrollo del experimento (Figura 3.1); mientras que en plantas estresadas (Figura 3.1) el RWC fluctuó entre un 61,7% (Brigitta) y un 86,6% (Elliot). Esto sugiere que el cultivar más sensible a la falta de agua es Brigitta (NHB) y que el más tolerante sería Elliot (NHB), ya que pierde menos agua en condiciones de déficit hídrico. De acuerdo a esta variable, dentro del grupo NHB se encontraría un cultivar tolerante y uno sensible. Sin embargo, las diferencias en cuanto a la magnitud de la respuesta muestran que los cultivares NHB difieren más entre ellos que los SHB, excepto Elliott, quien se comportó de manera estable durante todo el tiempo de duración del ensayo (Figura 3.2).

Resultados de RWC reportados por Panta et al. (2001) para dos cultivares, Bluecrop (*V. corymbosum*) y Premier (*V. ashei*) sometidos a estrés hídrico, mostraron que la mayor disminución del RWC fue en el cultivar Bluecrop respecto de Premier creciendo bajo las mismas condiciones (misma maceta). Incluso, una vez volviendo a regar, Premier logra recuperarse completamente a diferencia de Bluecrop que no lo hace y muere. Estos datos sugieren que Bluecrop, que es un cultivar NHB, es menos tolerante a la desecación en

comparación con Premier, que es un cultivar de arándano ojo de conejo (*V. ashei*), especie que se ha mencionado como más tolerante a déficit hídrico respecto de *V. corymbosum* (Estrada et al., 2015; Panta et al., 2001).

En relación al rendimiento fotoquímico del fotosistema II (PSII), determinado a través de la relación Fv/Fm, también se observaron diferencias significativas entre los cultivares estudiados, en donde el Fv/Fm decayó, principalmente, entre la cuarta y sexta semana de estrés (Figura 3.3). La relación Fv/Fm cuantifica la excitación de los pigmentos accesorios y clorofila a en el PSII producto de la luz y que luego son usadas fotoquímicamente para realizar fotosíntesis (Nobel, 2005). Este parámetro permite estimar el desempeño del aparato fotosintético, donde los valores en plantas no estresadas oscilan entre 0,76 a 0,83, mientras que en plantas estresadas puede llegar a valores inferiores a 0,50 (Maxwell & Johnson, 2000; Osório et al., 2014). Para los cultivares aquí estudiados, los valores de Fv/Fm registrados para plantas estresadas fluctuaron entre 0,31 (Bluegold) y 0,64 (Biloxi) (Figura 3.3). Interesantemente, los valores de Fv/Fm medidos en Brigitta fueron cercanos a 0, sugiriendo que este cultivar presentó una muy baja o nula actividad fotosintética, que pudo sufrir daño por luz y que sería un cultivar extremadamente sensible al estrés hídrico. Mientras que Biloxi sería un cultivar sensible al déficit hídrico, ya que el Fv/Fm se encuentran dentro de lo esperado para plantas estresadas y para Bluegold está por debajo de lo esperado (Figura 3.3), sugiriendo que sería un cultivar muy sensible al estrés según esta evaluación. Las diferencias entre grupos (Figura 3.4) sugieren que los cultivares SHB tienden a ser menos perjudicados en el rendimiento fotoquímico del PSII bajo condiciones de déficit hídrico, dado que la magnitud de las diferencias entre plantas control y estresadas son bajas en comparación con los NHB.

Estrada et al. (2015) reportaron parámetros asociados a fluorescencia de la clorofila en cultivares de arándano NHB y SHB creciendo bajo condiciones de invernadero, donde se simuló estrés hídrico. Bluegold, Elliott y Liberty (NHB) alcanzaron valores de Fv/Fm de 0,52, 0,59 y 0,59 respectivamente. Por el contrario, cultivares Bluecrisp, Jewel y Star (SHB) obtuvieron valores de 0,58, 0,56 y 0,62, respectivamente. Esto indicaría que los cultivares SHB son afectados en menor medida por el estrés hídrico respecto de los NHB, de acuerdo con los cultivares estudiados (Estrada et al., 2015). La información entregada por estos autores concuerda con lo obtenido en esta tesis, ya que, si bien se evaluaron

cultivares distintos (excepto Bluegold y Elliott), la tendencia se mantendría, sugiriendo que los cultivares NHB son más sensibles y que los SHB son más tolerantes a déficit hídrico.

Por otro lado, la utilización de la discriminación isotópica del carbono ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) para estimar el uso eficiente del agua (EUA) ha demostrado que, en general, las plantas más eficientes en el uso del agua debieran tener valores de discriminación isotópica del  $^{13}\text{C}$  menores (Berriél et al., 2014). Para los cultivares de arándanos estudiados, se pudo observar que la  $\Delta^{13}\text{C}$  disminuyó para todos los cultivares de arándano en condición de estrés respecto de sus controles (Figura 3.6a), lo que puede ser atribuido a un cierre parcial o completo del estoma frente al déficit hídrico, lo que a su vez limita la difusión del  $\text{CO}_2$  y del  $\text{H}_2\text{O}$ , resultando en una menor  $\Delta^{13}\text{C}$  (Kumar & Sing, 2009). Sin embargo, se observaron variaciones entre cultivares cuando se llevó a cabo el cálculo de las diferencias entre control y estrés (Figura 3.6b). En este experimento, se observó que el cultivar Brigitta fue quien tuvo el mayor delta entre ambas condiciones, por lo que es plausible pensar que Brigitta es aquel cultivar que presenta una menor discriminación contra el  $^{13}\text{C}$  en condiciones de estrés. A su vez, estos resultados sugieren que este cultivar sería el más eficiente en el uso del agua. Por el contrario, el resto de los cultivares discriminaron de manera similar (en relación al delta, Figura 3.6b). Específicamente, Biloxi fue el cultivar que tiene la diferencia más pequeña entre control y tratamiento, por lo que sería el que más discriminó contra el  $^{13}\text{C}$  bajo estrés hídrico y por ende, sería el cultivar menos eficiente en el uso del agua, con respecto a los otros cultivares estudiados en esta tesis. Interesantemente, los cultivares del grupo SHB (Biloxi, Sharpblue y Oneal) discriminaron de manera similar entre ellos (en relación a la diferencia entre control y tratamiento) (Figura 3.6b), semejante a lo que ocurre con el cultivar Elliott (NHB). Esto sugiere que los SHB pudiesen ser más tolerantes al déficit hídrico y que dentro de los NHB, el cultivar Elliott es más tolerante respecto de los otros cultivares estudiados.

La gran variabilidad entre los cultivares en cuanto a  $\Delta^{13}\text{C}$ , tanto en plantas de condición control como déficit hídrico, sugiere que existe variabilidad genotípica o entre genotipos para la discriminación isotópica del carbono, lo que también se ha observado en otras especies sometidas a estrés hídrico (Adiredjo et al., 2014; Kumar & Singh, 2009).

### ***Acumulación de prolina en respuesta a condiciones de déficit hídrico***

Uno de los mecanismos utilizados por las plantas bajo condiciones de estrés por sequía es la síntesis de solutos compatibles, como la prolina; esto permite prevenir la pérdida de agua en las células y mantener el turgor (Bhargava & Sawant, 2013). En plantas bajo estrés osmótico, se ha observado un aumento en el contenido de prolina comparado con plantas control y dicho aumento dependería de la severidad del estrés aplicado (Naik et al., 2011). Los cultivares de arándano estudiados en esta tesis mostraron un incremento significativo del contenido de prolina a la sexta semana de estrés respecto del control (Figura 3.7). Sin embargo, hubo variación en los niveles de prolina acumuladas entre cultivares (Figura 3.7). Las plantas del cultivar Oneal en condiciones de estrés tuvieron la menor acumulación de prolina, en relación a las plantas de los otros cultivares bajo la misma condición. Esto podría sugerir que la acumulación de prolina no tendría un rol tan significativo como osmolito protector en este cultivar (Naik et al., 2011) y que, además, Oneal puede tener una estrategia alternativa a este mecanismo para protección y tolerancia al estrés hídrico.

Las diferencias de las magnitudes entre plantas control y estresadas por grupo en la acumulación de prolina (Figura 3.8) mostraron que los NHB acumulan de manera similar este osmolito, lo que podría indicar que este mecanismo de tolerancia es común para todos los cultivares de este grupo. Sin embargo, el grupo SHB muestra variabilidad entre sus cultivares (Figura 3.8), siendo Sharpblue el cultivar que acumula más prolina en condiciones de estrés. Es probable que este osmolito juegue un papel importante en tolerar la condición de déficit hídrico en dicho cultivar, contrario a lo observado en Oneal y que fue discutido anteriormente.

### ***Integrando las respuestas fisiológicas medidas***

El análisis de componentes principales que consideró todas las variables fisiológicas medidas a la sexta semana de estrés por déficit hídrico, logró separar dos grupos de plantas: estresadas y control (Figura 3.9a). A partir de esto, se confirma que el riego suministrado tuvo efectos significativos en las plantas. Es interesante destacar que, dentro del grupo de plantas estresadas, el cultivar Brigitta es quien se separa más del resto de cultivares bajo la misma condición (Figura 3.9a), indicando que este cultivar es el más sensible al déficit hídrico.

Cuando se consideró el tipo de cultivar (NHB o SHB) sólo para plantas estresadas, no fue posible separar SHB y NHB en dos grupos claramente definidos (Figura 3.9b), por lo que, aparentemente, existe una alta variabilidad de los cultivares en cuanto a los mecanismos de respuesta al estrés por déficit hídrico. Sin embargo, existe una ligera tendencia distribución, en donde los cultivares NHB están más cercanos al eje (Y) y los SHB más cercanos al eje (X), pero en ambos casos, se encuentran presentes en distintos componentes espaciales.

Con respecto al cálculo del desempeño de los cultivares (Tabla 3.4), los resultados evidenciaron que el cultivar con mejor desempeño en condiciones control, de acuerdo a las variables de respuesta medidas, fue el cultivar Sharpblue y el que tuvo el peor desempeño fue Brigitta. Sin embargo, al obtener el desempeño en condiciones de estrés, el mejor cultivar fue Biloxi y el peor fue Brigitta. Esto sugiere que Brigitta es un cultivar que podría presentar un bajo desempeño, tanto en condiciones de riego adecuado como en un futuro escenario de cambio climático con menor disponibilidad hídrica. Por otro lado, y de acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, es posible proponer que el cultivar Biloxi tendría un mejor desempeño en escenarios de déficit hídrico. Sin embargo, esta aproximación requiere ser complementada con la medición de un mayor número de variables de respuesta, ya sean respuestas fisiológicas (por ejemplo, conductancia estomática, intercambio gaseoso, tasa fotosintética, entre otras) o relacionadas a la producción de fruto (como, por ejemplo, número de frutos, tamaño del fruto, cualidades organolépticas, entre otras). Por lo tanto, una forma de robustecer el modelo predictivo de desempeño de los cultivares obtenido en esta tesis es mediante la medición e integración de un mayor número de variables de respuesta.

#### ***Acumulación de transcritos de putativos genes que codifican para proteínas LEA en respuesta a estrés por déficit hídrico***

La familia de proteínas LEA (late embryogenesis abundant) se acumulan durante los últimos estadios de maduración de la semilla y durante déficit hídrico en órganos vegetativos, lo que sugiere un papel protector durante limitaciones hídricas (Amara et al., 2014; Battaglia et al., 2008; Hundertmark & Hinch, 2008; Magwanga et al., 2018). En base a los resultados de los análisis bioinformáticos en esta tesis, se encontraron putativas

secuencias de genes que codifican para proteínas LEA (Tabla 3.5). La clasificación, basada en la búsqueda de dominios conservados, permitió identificar a qué grupo de LEAs pertenecen los putativos genes candidatos, obteniendo que tres de ellos se clasifican como “Dehydrin superfamily” y dos de ellos como LEA 3 y 4 (también LEA III y LEA IV), respectivamente (Tabla 3.8).

Se ha descrito que la superfamilia de las Dehidrasas, indicada como Grupo II de LEA según Battaglia et al. (2008), cumplen diversas funciones bajo distintos tipos de estrés abiótico: actividad chaperona, protección de membranas, crioprotección, tolerancia a metales pesados, secuestrador de radicales, tolerancia a congelamiento, tolerancia a estrés salino y tolerancia a estrés hídrico (Banerjee & Roychoudhury, 2016). Para el caso de proteínas LEA del grupo III y IV (Battaglia et al., 2008), se ha reportado una correlación entre mayores niveles de acumulación de estas proteínas y/o sus transcritos y el inicio de eventos de estrés, inducidos por bajas temperaturas, salinidad o deshidratación (Banerjee & Roychoudhury, 2016; Battaglia et al., 2008; Battaglia & Covarrubias, 2013; Gao & Lan, 2016; Liu et al., 2013). En consecuencia, las putativas proteínas LEAs identificadas en nuestro trabajo, podrían tener un papel fundamental en tolerancia a estrés hídrico en los cultivares de arándano.

En arándano, las proteínas LEA han sido principalmente, identificadas y estudiadas desde la perspectiva de la aclimatación a frío, aunque también se han estudiado en condiciones de estrés hídrico (Dhanaraj et al., 2005; Levi et al., 1999; Naik et al., 2007; Parmentier-Line et al., 2002; Rowland et al., 2004). La acumulación de transcritos de *VcDEH14* (Rowland et al., 2004) (*dehidrina 3* en este trabajo) en yemas florales de Bluecrop (NHB) fue mayor respecto de Premier (*V. ashei*), así como también la acumulación de proteína VcDEH14, tanto en estrés por frío y estrés hídrico.

De acuerdo con los perfiles de expresión relativa (Figura 3.10), se observó que en general, los genes candidatos se indujeron en las plantas de la mayoría de los cultivares bajo condiciones de déficit hídrico respecto al control, a la sexta semana de tratamiento. Además, la acumulación de transcritos fue diferente entre cultivares y se observaron diferencias entre NHB y SHB. En los cultivares NHB hubo mayor inducción de genes LEA y dentro de ellos, Brigitta fue quien tuvo mayores incrementos en la acumulación de transcritos. Esto sugiere que la acumulación de proteínas LEA responde a un evento de

estrés hídrico prolongado, pudiendo ejercer un rol como agente protector de las células. Alternativamente, Brigitta mostró ser más sensible al estrés hídrico (de acuerdo con los datos fisiológicos observados), por tanto, la síntesis de proteínas LEA se induce como un mecanismo de respuesta. Para el caso de los otros cultivares NHB (Elliott y Bluegold) las respuestas fisiológicas sugieren que éstos serían más tolerantes que Brigitta. Sin embargo, la acumulación de transcritos detectados no fueron tan elevados, excepto en algunos casos, donde existieron diferencias estadísticamente significativas para genes candidatos puntales (*dehidrina 2* y *Lea 3* para Bluegold, *Lea 2* para Elliott).

Para los cultivares SHB, la mayor inducción de los genes candidatos estudiados ocurre en Sharpblue y Oneal (Figura 3.10). Sin embargo, esto no ocurre con algunos genes candidatos (por ejemplo, *dehidrina 2* no se induce en Oneal, *Lea 1* y *2* no se induce en Sharpblue). En el caso de Biloxi, se observa acumulación de transcritos de los distintos genes candidatos, excepto del gen *dehidrina 3*, en donde no se aprecia inducción. Es interesante destacar que los parámetros fisiológicos sugieren que los cultivares SHB serían más tolerantes al estrés hídrico, respecto de los NHB, por lo que se hubiese esperado una mayor acumulación de transcritos en los cultivares SHB, como parte del mecanismo de respuesta protector y que le confiere mayor tolerancia al estrés hídrico; sin embargo, esto no fue así de claro. Por lo tanto, podemos señalar que las proteínas LEA pueden tener un mayor o menor papel protector ante estrés hídrico, dependiendo del genotipo (cultivar) estudiado.

Adicionalmente, es importante señalar que los genes candidatos estudiados pudiesen tener una inducción más temprana ante condiciones de estrés hídrico y, por lo tanto, la acumulación de transcritos observada a la sexta semana no refleje el comportamiento transcripcional de estos genes durante el desarrollo del evento de estrés. Otra posible explicación que permite dar cuenta de los perfiles de expresión relativa observados es la variabilidad/composición genética existente entre cultivares de arándano, así como también el grado de tolerancia y/o susceptibilidad de cada cultivar. Es posible que las regiones promotoras de estos genes pudiesen determinar una regulación diferencial entre cultivares.

### 3.5. Consideraciones finales

Los parámetros fisiológicos evaluados, así como la expresión relativa de genes candidatos de la familia LEA en condiciones de estrés por déficit hídrico, permitieron determinar diferencias en los cultivares de arándanos, siendo el cultivar Brigitta (NHB) el más sensible. En cuanto a la composición genética de este cultivar, corresponde a 100% *V. corymbosum*, lo que podría explicar su sensibilidad a estrés hídrico. Sin embargo, esta característica relacionada a la composición genética no sería útil para identificar un cultivar sensible respecto de uno tolerante. Esto debido a que Elliott, siendo también 100% *V. corymbosum* y NHB, no tuvo las mismas respuestas y más bien, se comportó como un cultivar tolerante. Por el contrario, los cultivares más tolerantes al déficit hídrico serían los SHB, quienes en su composición genética tienen aportes de otras especies del género *Vaccinium* descritas como más tolerantes a déficit hídrico, atributo que pudiese haber sido transferido a los híbridos, por tanto, los SHB pudiesen ser más tolerantes al déficit hídrico. Sin embargo, los resultados de esta tesis sugieren que no sería posible generalizar el grado de tolerancia de los SHB, ya que dentro de este grupo también hubo variación (aunque en menor grado) de las respuestas medidas entre los cultivares analizados. Una posible explicación para la variabilidad observada, es que los cultivares SHB son diferentes entre sí en cuanto a su composición genética.

Por lo tanto, para identificar cultivares tolerantes o susceptibles, es necesario considerar la evaluación de una mayor cantidad de variables de respuestas, junto con un número más alto de cultivares de los distintos grupos. Esto permitirá incrementar la posibilidad de identificar cultivares tolerantes con una mayor precisión, los que puedan ser capaces de tener mayor éxito bajo escenarios de cambio climático y déficit hídrico.

## **CAPÍTULO IV**

# **ESTUDIO PROSPECTIVO DEL USO DE LA REFLECTANCIA ESPECTRAL EN LA IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L.) TOLERANTES A ESTRÉS HÍDRICO**

## 4.1. Introducción

Los programas de mejoramiento genético evalúan fenotípicamente un gran número de individuos, por ejemplo, para el desarrollo de cultivos mejor adaptados a condiciones ambientales adversas (Araus & Cairns, 2014). Para llevar a cabo esto, existen diversas aproximaciones, las que dependen de la evaluación de una serie de rasgos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos (Camargo & Lobos, 2016; Lobos & Hancock, 2015). Sin embargo, para lograr las mediciones de estos parámetros y tener indicadores del estado de la planta, es necesario tomar muestras de tejido vegetal, generando un problema cuando se dispone de poco material vegetal o, por el contrario, consume mucho tiempo cuando el estudio requiere la evaluación de muchos genotipos. Por lo tanto, toma relevancia la posibilidad de adquirir datos fenotípicos de alta resolución, llamado también fenómica, mediante el uso de dispositivos, técnicas y análisis de detección remota, en su mayoría no destructivos (Araus & Cairns, 2014; Lobos & Hancock, 2015). Este enfoque puede predecir caracteres complejos que son relevantes para la selección de plantas y también puede dar respuestas acerca de cómo ciertos genotipos se destacan en un entorno específico (Camargo & Lobos, 2016).

Dentro de las tecnologías utilizadas en fenómica, está la espectrorradiometría. Esta técnica se basa en la medición de reflectancia de las plantas, cuya firma espectral (caracterización gráfica de la radiación reflejada por la planta a diversas longitudes de onda) está asociada con la absorción de luz a ciertas longitudes de onda, lo que ha sido utilizado para generar modelos matemáticos que permitan predecir caracteres específicos o establecer determinadas condiciones de la planta (Araus & Cairns, 2014; Garriga et al., 2014).

Para poder predecir los parámetros fisiológicos a partir de datos de reflectancia espectral, se requiere de índices de reflectancia espectral (IREs), los cuales son definidos como relaciones simples entre longitudes de onda o bandas espectrales, y usualmente considerados como inmunes a cambios en la radiación solar (Lobos & Hancock, 2015). Estos IREs pueden ser correlacionados con una serie de parámetros fisiológicos medidos en una determinada condición, los cuales deben ser previamente obtenidos de forma

experimental para la especie vegetal de interés (e.j: estrés por salinidad, estrés hídrico, entre otros). Posteriormente, y a partir de la integración de datos experimentales y de reflectancia espectral, se pueden construir modelos matemáticos modelos que permitan estimar estas variables, de forma rápida y no destructiva en un gran número de individuos (Yendrek et al., 2017).

Actualmente, existen un gran número de IREs que han sido correlacionados con cambios cuantitativos en el fenotipo de distintas especies vegetales, como en frutillas y trigo (Garriga et al., 2017, 2014). Esto ha permitido estimar diferentes rasgos de interés, por ejemplo, índice de área foliar, fluorescencia, contenido de pigmentos, estado hídrico de la planta, discriminación isotópica del carbono, entre otros (Lobos & Poblete-Echeverría, 2017).

En arándano, los datos de reflectancia espectral han sido utilizados en el estudio de diferentes atributos y rasgos de interés agronómicos, tales como el contenido de antioxidantes, (antocianinas, flavonoides, polifenoles y ácido ascórbico), sólidos solubles, firmeza del fruto, niveles de nitrógeno foliar, evaluación de parámetros vegetativos y reproductivos, entre otros (Bai et al., 2014; Guidetti et al., 2009; Maqbool et al., 2012; Percival et al., 2012). Sin embargo, no hay mayores antecedentes respecto del uso de datos espectrales y su correlación con parámetros fisiológicos en cultivares de arándano bajo condiciones de estrés hídrico. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue utilizar las variables fisiológicas medidas experimentalmente, bajo condiciones de estrés hídrico en distintos cultivares de arándano y correlacionarlas con datos de reflectancia espectral. De esta forma, se evaluó de manera prospectiva la posibilidad de utilizar estas correlaciones como un primer paso en la identificación de cultivares de arándano tolerantes o susceptibles a condiciones de estrés hídrico.

## 4.2. Material biológico y mediciones experimentales

Se trabajó con 6 cultivares de arándano mencionados en la Tabla 3.2 (Capítulo III), los cuales fueron sometidos a condiciones de déficit hídrico (en dos ensayos independientes, año 2014 y 2015) simuladas con Polietilenglicol-6000 (PEG-6000) en cámaras de crecimiento del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Talca, con temperatura y fotoperiodo controlados. Las plantas fueron aclimatadas desde cultivo *in vitro* a sustrato perlita: vermiculita (4:1) y las mediciones se realizaron sobre plantas jóvenes de 50 cm de altura aproximadamente. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por cultivar (una planta en un macetero).

Se midieron las siguientes variables: contenido relativo de agua (RWC) (Taulavuori et al., 2010; Wu et al., 2016), contenido de clorofila (Inskeep & Bloom, 1985; Moran & Porath, 1980), contenido de antocianinas (Strack & Wray, 1989), contenido de prolina (Bates et al., 1973) y concentración de malondialdehído (MDA) (Taulavuori et al, 2001), además de parámetros relacionados a fluorescencia de la clorofila (detallados en la Tabla 4.1)

**Tabla 4.1.** Abreviaturas y significado de los parámetros de fluorescencia de la clorofila (Heinz Walz GmbH, 2008).

	<b>Significado de la abreviatura</b>
<b>F<sub>o</sub></b>	Rendimiento básico de la fluorescencia de la clorofila medida con bajas intensidades de luz
<b>F<sub>m</sub></b>	Rendimiento máximo de fluorescencia de la clorofila cuando los centros de reacción del fotosistema II (PSII) están cerrados por un pulso de saturación
<b>F<sub>m</sub>'</b>	Rendimiento máximo de fluorescencia de la clorofila cuando los centros de reacción del PSII están cerrados por un pulso de luz
<b>Y(II)</b>	Rendimiento cuántico máximo fotoquímico efectivo del PSII.
<b>NPQ</b>	“Quenching” no fotoquímico de la fluorescencia
<b>Y(NPQ)</b>	Rendimiento cuántico de la conversión de energía no fotoquímica en el PSII debido a la disminución de captura de luz
<b>Y(NO)</b>	Rendimiento cuántico de la conversión de energía no fotoquímica en el PSII, distinta a la ocasionada por la disminución de captura de luz

Las mediciones de reflectancia absoluta fueron realizadas con un espectrorradiómetro portátil (Field Spec 3 JR, ASD, Boulder, USA) entre las 12:00 y 13:00 horas de día, sobre una hoja joven totalmente expandida de cada planta. El equipo fue ajustado para integrar 5 escaneos por muestra y para los análisis se usó el promedio de cada longitud de onda.

Los datos del espectro de reflectancia (350 a 2500 nm) fueron utilizados para determinar el desempeño predictivo de un conjunto de Índices de Reflectancia Espectral (IREs) cargados en SK-UTALCA (Lobos & Poblete-Echeverría, 2017). Este programa incorpora la opción de analizar las relaciones entre los parámetros fisiológicos medidos en las distintas condiciones (control y estrés hídrico) para cada cultivar de arándano con diferentes IREs, mediante un análisis de regresión lineal, empleando varios modelos integrados en el software y generando los coeficientes de determinación ( $r^2$ ) respectivos.

### **4.3. Resultados preliminares**

#### **Parámetros fisiológicos**

Los resultados de todas las mediciones fisiológicas se resumen en la Tabla 4.2. Para esta etapa prospectiva, todas las mediciones, independiente del cultivar y tratamiento, se reunieron y se analizaron de manera conjunta.

#### **Firma espectral de cultivares de arándano**

Los cultivares de arándano mostraron firmas espectrales diferentes, tanto en plantas en condición control como en plantas estresadas (Figura 4.1). Estas diferencias se observan principalmente, en el rango del infrarrojo cercano (NIR), entre 750 nm y 1300 nm, lo que sugiere que este rango puede ser útil en la discriminación entre cultivares. En el caso de las plantas control, los cultivares que alcanzaron los valores más altos de reflectancia fueron Oneal, seguido por Sharpblue, Biloxi y Elliott (Figura 4.1a), quienes mostraron valores muy similares de reflectancia. Brigitta y Bluegold fueron los cultivares que mostraron los valores más bajos de reflectancia (Figura 4.1a). En plantas estresadas, los cultivares de arándano que obtuvieron los valores más altos de reflectancia fueron Sharpblue y Elliott,

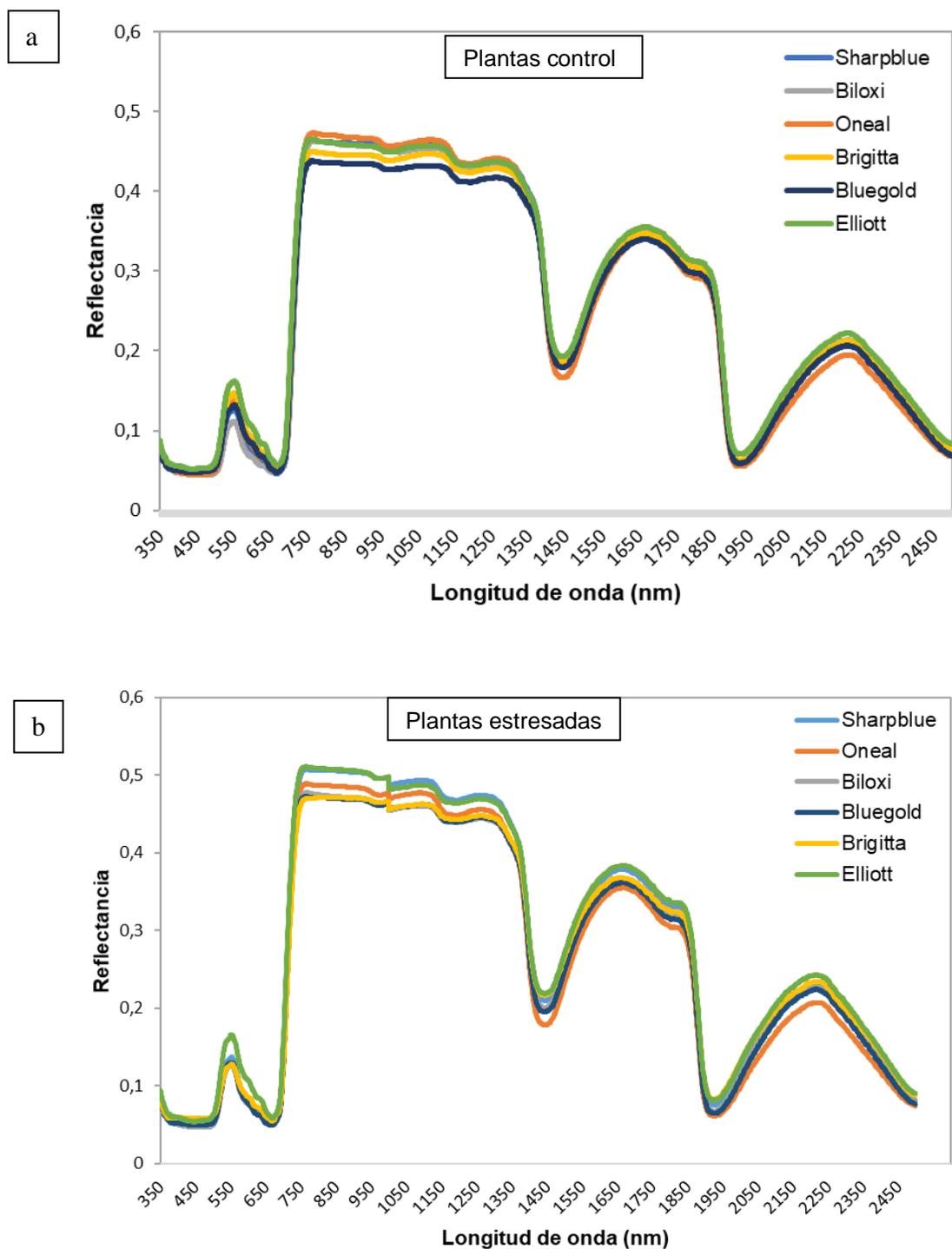
seguido por Oneal (Figura 4.1b). Brigitta, Biloxi y Bluegold fueron los cultivares que alcanzaron los valores más bajos de reflectancia (Figura 4.1b). En conjunto, las diferencias observadas en cuanto a la firma espectral, sugieren que cada cultivar respondería de manera diferente bajo a una misma condición (control o estrés); asimismo, esta técnica sería capaz de diferenciar entre cultivares.

Cuando los cultivares de arándano son agrupados de acuerdo al tipo NHB (arándano de arbusto alto del norte) y SHB (arándano de arbusto alto del sur), también se observaron diferencias en las firmas de reflectancia espectral (Figura 4.2). Estas diferencias sugieren que ambos grupos de cultivares presentan respuestas al estrés hídrico, pero de manera diferente. En relación a la misma figura (4.2), se puede observar que existe una clara separación entre plantas control y plantas estresadas en el rango del infrarrojo cercano (NIR), entre 750 nm y 1300 nm, siendo las plantas estresadas, tanto NHB y SHB, quienes alcanzan los valores más altos de reflectancia. Por otro lado, las plantas estresadas del grupo SHB fueron las que obtuvieron en promedio, los valores más bajos de reflectancia.

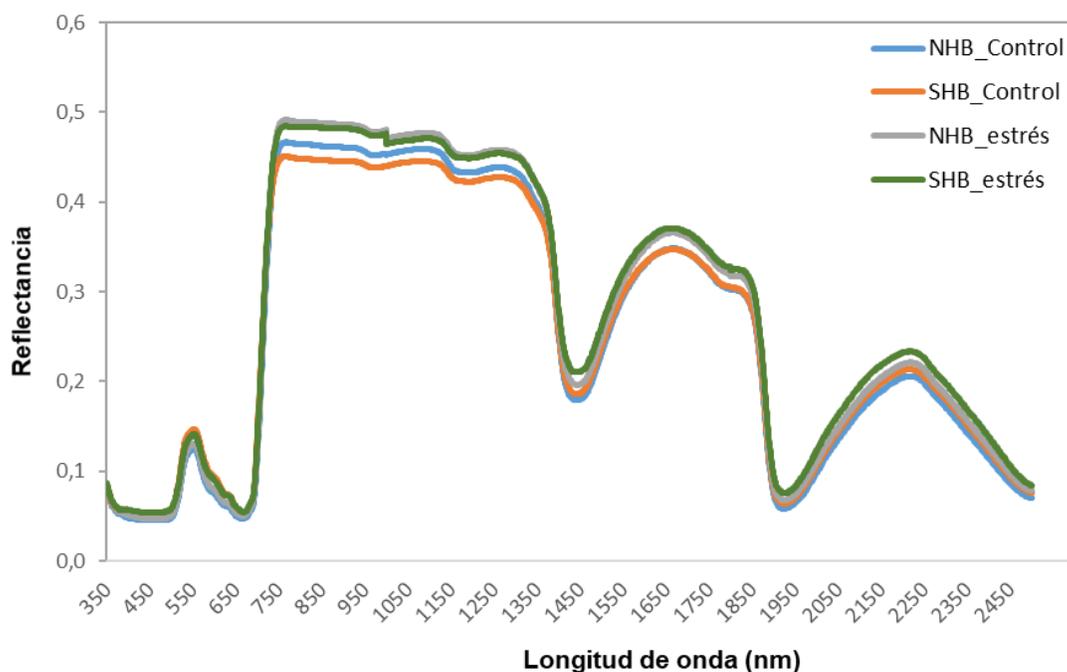
**Tabla 4.2.** Parámetros fisiológicos y de fluorescencia de la clorofila medidos en el ensayo de estrés en cultivares de arándano. Se indica el número de datos por cada variable medida (n), promedio, desviación estándar, valor mínimo y máximo de cada parámetro.

<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>
<b>RWC (%)</b>	245	74,650	15,792	6,133	100
<b>Clorofila a (<math>\mu\text{g cm}^{-2}</math>)</b>	249	3,946	1,026	1,303	7,274
<b>Clorofila b (<math>\mu\text{g cm}^{-2}</math>)</b>	247	3,117	2,405	0,674	15,223
<b>ChlA/ChlB</b>	247	1,795	0,932	0,392	3,699
<b>Clorofila total (<math>\mu\text{g cm}^{-2}</math>)</b>	249	7,118	3,133	2,283	21,745
<b>Antocianinas (<math>\mu\text{g cm}^{-2}</math>)</b>	248	1,444	0,876	0,048	4,606
<b>Prolina (mM gr FW<sup>-1</sup>)</b>	248	247,955	365,623	10	4058,51
<b>MDA (<math>\mu\text{M gr FW}^{-1}</math>)</b>	125	19,211	8,649	6,781	56,732
<b>F</b>	172	1,735	0,206	0,892	3,863
<b>Fm'</b>	171	6,655	0,631	2,22	6,874
<b>Fo</b>	174	1,616	0,212	1,085	3,837
<b>Fm</b>	174	6,759	0,551	2,28	6,874
<b>Y(II)</b>	174	0,754	0,082	0,023	0,798
<b>NPQ</b>	171	0,020	0,101	-0,506	1,112
<b>Y(NO)</b>	174	0,259	0,088	0	0,969
<b>Y(NPQ)</b>	171	0,004	0,027	-0,272	0,144

**Figura 4.1.** Respuesta de las hojas de los cultivares de arándano en condiciones control (a) y estrés hídrico (b), en términos de reflectancia absoluta en el rango espectral de 350 nm a 2450 nm. Rango del visible entre 400-700 nm, rango de infrarrojo cercano entre 700-1300 y rango infrarrojo de onda corta entre 1300-2500 nm.



**Figura 4.2.** Respuesta de las hojas de los cultivares de arándano considerados como dos grupos (NHB y SHB) en condiciones control y con estrés hídrico, en términos de reflectancia absoluta en el rango espectral de 350 nm a 2450 nm. Rango del visible entre 400-700 nm, rango de infrarrojo cercano entre 700-1300 y rango infrarrojo de onda corta entre 1300-2500 nm.



### **Relación entre reflectancia espectral y mediciones experimentales**

Los resultados de las correlaciones entre parámetros fisiológicos medidos e índices de reflectancia espectral (IREs) (Tabla 4.3), muestran que los mayores coeficientes de determinación ( $r^2$ ) fueron para: Antocianinas con Relación Simple ( $r^2= 0,545$ ), Y(NPQ) con Índice Espectral de Diferencia Normalizada ( $r^2= 0,720$ ) y relación ChlA/ChlB con Índice Espectral de Diferencia Normalizada ( $r^2= 0,721$ ). Por otro lado, los menores valores para coeficientes de determinación fueron en las correlaciones entre RWC con Relación Simple ( $r^2= 0,057$ ), seguido por Fo con Índice Sodio Potasio ( $r^2= 0,062$ ) y Prolina con Índice Espectral de Diferencia Normalizada ( $r^2= 0,104$ ).

**Tabla 4.3.** Coeficientes de determinación ( $r^2$ ) para los mejores índices de reflectancia espectral por cada parámetro fisiológico medido en los 6 cultivares de arándano, sometidos a condiciones de déficit hídrico. \*: En paréntesis se indican las longitudes de onda utilizadas en el cálculo de cada índice.

<b>Variable fisiológica</b>	<b>Índice de reflectancia espectral *</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Modelo</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>Referencia</b>
<b>Antocianinas</b>	Relación Simple (533;537)	$R_{553} / R_{537}$	polinomial 2	<b>0,545</b>	Tian et al., 2013
<b>ChIA/ChIB</b>	Índice Espectral de Diferencia Normalizada (1107;1110)	$(R_{1107} - R_{1110}) / (R_{1107} + R_{1110})$	polinomial 2	<b>0,721</b>	Inoue et al., 2008
<b>ChIA</b>	Índice Espectral de Diferencia Normalizada (520;710)	$(R_{520} - R_{710}) / (R_{520} + R_{710})$	exponencial	0,170	Inoue et al., 2008
<b>ChIB</b>	Índice Espectral de Diferencia Normalizada (1107;1110)	$(R_{1107} - R_{1110}) / (R_{1107} + R_{1110})$	polinomial 2	0,364	Inoue et al., 2008
<b>Chl Total</b>	Relación Simple (545;538)	$R_{545} / R_{538}$	weibull	0,280	Tian et al., 2013
<b>Prolina</b>	Índice Espectral de Diferencia Normalizada (422;419)	$(R_{422} - R_{419}) / (R_{422} + R_{419})$	exponencial	<b>0,104</b>	Inoue et al., 2008
<b>RWC</b>	Relación Simple (1070;1340)	$R_{1070} / R_{1340}$	polinomial 2	<b>0,057</b>	Rodríguez-Pérez et al., 2007
<b>MDA</b>	Índice de Humedad de Diferencia Normalizada (2200;1100)	$(R_{2200} - R_{1100}) / (R_{2200} + R_{1100})$	exponencial	0,205	Inoue et al., 2008
<b>Fm</b>	Índice reflectancia del agua/ Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (970;900;800;680)	$(R_{900} / R_{970}) / [(R_{800} - R_{680}) / (R_{800} + R_{680})]$	polinomial 2	0,416	Peñuelas et al, 1997

<b>Fm'</b>	Índice reflectancia del agua/ Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (970;900;800;680)	$(R_{900} / R_{970}) / [(R_{800} - R_{680}) / (R_{800} + R_{680})]$	polinomial 2	0,381	Peñuelas et al, 1997
<b>Fo</b>	Índice Potasio:Fósforo (Índice PK) (1645;1715)	$(R_{1645} - R_{1715}) / (R_{1645} + R_{1715})$	polinomial 2	<b>0,062</b>	Pimstein et al., 2011
<b>NPQ</b>	Índice Espectral de Diferencia Normalizada (962;964)	$(R_{962} - R_{964}) / (R_{962} + R_{964})$	polinomial 2	0,173	Inoue et al., 2008
<b>Y(II)</b>	Índice reflectancia del agua /Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (970;900;800;680)	$(R_{900} / R_{970}) / [(R_{800} - R_{680}) / (R_{800} + R_{680})]$	polinomial 2	0,437	Peñuelas et al, 1997
<b>Y(NO)</b>	Índice reflectancia del agua/Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (970;900;800;680)	$(R_{900} / R_{970}) / [(R_{800} - R_{680}) / (R_{800} + R_{680})]$	polinomial 2	0,380	Peñuelas et al, 1997
<b>Y(NPQ)</b>	Índice Espectral de Diferencia Normalizada (962;964)	$(R_{962} - R_{964}) / (R_{962} + R_{964})$	polinomial 2	<b>0,720</b>	Inoue et al., 2008

#### 4.4. Consideraciones y direcciones futuras

El estrés por déficit hídrico causa una gran cantidad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los que inhiben el crecimiento vegetal, el desarrollo desde la germinación hasta la formación del fruto y la fotosíntesis (Arabzadeh, 2013). Una forma de determinar el efecto del estrés por déficit hídrico en las plantas es mediante la medición de ciertos parámetros fisiológicos, reportados como indicadores del estado fisiológico bajo estas condiciones de estrés (Faraloni et al., 2011; Taulavuori et al., 2010; entre otros). Sin embargo, para lograr estas mediciones, es necesario realizar muestreos de tejido vegetal (principalmente hojas), lo cual es complicado de llevar a cabo cuando se dispone de poco material vegetal y se desea evaluar una serie de parámetros sobre el mismo individuo en distintos tiempos. En otros casos, cuando se requiere la evaluación de muchos genotipos, son demasiadas muestras las que se deben procesar, consumiendo un tiempo excesivo. Por lo tanto, toma relevancia el uso de la reflectancia espectral como herramienta que permite evaluar en un menor tiempo un alto número de individuos, sin la necesidad de muestreos destructivos y así caracterizar el estado fisiológico de los mismos.

La firma espectral está estrechamente asociada con la absorción a ciertas longitudes de onda, las que están vinculadas a características específicas o condición de las plantas (Araus & Cairns, 2014), por lo que los índices de reflectancia espectral (relaciones entre longitudes de onda) se han utilizado para estimar distintos caracteres de las plantas (Lobos & Hancock, 2015). Sin embargo, para lograr estimar los parámetros fisiológicos a través de IREs, se requiere en primera instancia, generar las correlaciones entre ellos. En consecuencia, los datos presentados en este estudio son el primer reporte de IREs correlacionados con parámetros fisiológicos obtenidos a partir de tratamientos de estrés por déficit hídrico en cultivares de arándano NHB y SHB, los cuales serán un aporte en la fenotipificación de los cultivares en condiciones de estrés.

En esta primera aproximación, las correlaciones de IREs con los parámetros fisiológicos medidos mostraron 3 correlaciones con coeficientes de determinación ( $r^2$ ) sobre 0,5 (Tabla 4.3), lo que sugiere que dichos índices podrían ser útiles para la predicción de determinadas variables fisiológicas. Dentro de ellos, la relación clorofila a/b y el Índice Espectral de Diferencia Normalizada (1107;1110), el cual es una relación entre longitudes

de onda medidas a 1107 nm y 1110 nm asociadas al infrarrojo cercano (Inoue et al., 2008), tuvieron un coeficiente de correlación de  $r^2= 0,721$ , por lo que sería un buen predictor de esta variable. Además, se ha reportado que la relación clorofila a/b aumenta en plantas sometidas a déficit hídrico (Guo et al., 2016).

A partir de estos resultados preliminares, se propone utilizar aquellos parámetros fisiológicos que tuvieron un mayor grado de correlación con índices de reflectancia espectral como una base para la posterior generación de modelos predictivos, basados en análisis de regresiones múltiples lineales, que sirvan para la estimación de dichos parámetros y que ellos, a su vez, contribuyan a la identificación de cultivares de arándano tolerantes a estrés hídrico. Por lo tanto, los datos presentados en este capítulo constituyen un aporte fundamental para futuros estudios que involucren mediciones de reflectancia espectral y de esta forma, predecir respuestas fisiológicas de forma rápida y confiable, sin la necesidad de muestreos destructivos.

## CONCLUSIONES GENERALES DEL ESTUDIO

- Los cultivares de arándano presentaron diferentes respuestas frente a un mismo tratamiento de estrés por déficit hídrico. Estas diferencias en las respuestas podrían estar asociadas a la composición genética de cada cultivar, más que a su clasificación como NHB o SHB.
- Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que los cultivares SHB serían más tolerantes al estrés hídrico que los NHB. Sin embargo, esta tendencia no se cumple para los cultivares estudiados, ya que, en algunos casos, los cultivares del grupo NHB mostraron respuestas similares respecto de los SHB. Por lo tanto, se sugiere que la respuesta sería específica en cada cultivar.
- De acuerdo con el modelo predictivo, el cultivar Biloxi presentó el mejor desempeño bajo condiciones de estrés hídrico, por lo que se esperaría que bajo un escenario de cambio climático este cultivar podría ser más exitoso y/o mantener su desempeño. Se propone incorporar un mayor número de variables de respuestas fisiológicas que permitan mejorar la predicción del desempeño, así como también evaluar características del fruto.
- El uso de mediciones de reflectancia espectral permitió la correlación entre diversos Índices de Reflectancia Espectral con las variables fisiológicas medidas en este estudio. Estas correlaciones permitieron identificar algunos IREs promisorios (valores de coeficientes de determinación superiores a 0,5). Este trabajo propone como proyección seleccionar y utilizar estos IREs para la generación de modelos predictivos basados en mediciones de reflectancia espectral, los que a su vez permitirían estimar las variables fisiológicas de respuesta, sin recurrir a un muestro destructivo. Esto facilitará el proceso de fenotipificación de un gran número de individuos en diferentes tratamientos.

## REFERENCIAS

- Adak, N., Gubbuk, H., Tetik, N. 2018. Yield, quality and biochemical properties of various strawberry cultivars under water stress. *J. Sci. Food Agric.* 98: 304–311.
- Adiredjo, A.L., Navaud, O., Muños, S., Langlade, N.B., Lamaze, T., Grieu, P., 2014. Genetic control of water use efficiency and leaf carbon isotope discrimination in sunflower (*Helianthus annuus* L.) subjected to two drought scenarios. *PLoS One* 9(7): e101218.
- Allen, M.R., Ingram, W.J. 2002. Constraints on future changes in climate and the hydrologic cycle. *Nature* 419: 224–232.
- Amara, I., Zaidi, I., Masmoudi, K., Ludevid, M.D. 2014. Insights into Late Embryogenesis Abundant (LEA) Proteins in Plants: From Structure to the Functions. *Am. J. Plant Sciences* 5: 3440–3455.
- Ameglio, T., Le Roux, X., Mingeau, M., Perrier, C. 2000. Water relations of highbush blueberry under drought conditions. *Acta Hort.* 537: 273–278.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Orntoft, T.F. 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research* 64: 5245-5250.
- Arabzadeh, N. 2013. The impact of drought stress on photosynthetic quantum yield in *Haloxylon aphyllum* and *Haloxylon persicum*. *African J. Plant Sci.* 7: 185–189.
- Araus, J.L., Cairns, J.E. 2014. Field high-throughput phenotyping: The new crop breeding frontier. *Trends Plant Sci.* 19: 52–61.
- Araus, J.L., Slafer, G.A., Reynolds, M.P., Royo, C. 2002. Plant breeding and drought in C3 cereals: What should we breed for? *Ann. Bot.* 89: 925–940.
- Araus, J.L., Villegas, D., Aparicio, N., García del Moral, L.F., El Hani, S., Rharrabti, Y., Ferrio, J.P., Royo, C. 2003. Environmental Factors Determining Carbon Isotope Discrimination and Yield in Durum Wheat under Mediterranean Conditions. *Crop Sci.*

43: 170–180.

- Bai, W., Yoshimura, N., Takayanagi, M. 2014. Quantitative analysis of ingredients of blueberry fruits by near infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.* 22: 357–365.
- Baker, N.R. 2008. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 89–113.
- Bañados, M.P. 2006. Blueberry production in South America. *Acta Hort.* 715: 165–172.
- Banerjee, A., Roychoudhury, A. 2016. Group II late embryogenesis abundant (LEA) proteins: structural and functional aspects in plant abiotic stress. *Plant Growth Regul.* 79: 1–17.
- Bartels, D., Sunkar, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24(1): 23–58.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39: 205–207.
- Battaglia, M., Covarrubias, A.A. 2013. Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. *Front. Plant Sci.* 4: 1–11.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcíarrubio, A., Campos, F., Covarrubias, A. 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.* 148: 6–24.
- Beck, E.H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., Bhattarai, T. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *J. Biosci.* 32: 501–510.
- Berriel, V., Cristina, M., Carlos, P. 2014. Estatus hídrico y discriminación isotópica de <sup>13</sup>C de dos pasturas convencionales de Uruguay. *Agrociencia* 18(2): 1–13.
- Bhargava, S., Sawant, K. 2013. Drought stress adaptation: Metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breed.* 132: 21–32.
- Blum, A. 2005. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential—are they compatible, dissonant, or mutually exclusive?. *Aust. J. Agric. Res.* 56: 1159–1168.

- Bray, E. 2002. Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: An analysis using microarray and differential expression data. *Ann. Bot.* 89: 803-811.
- Bray, E. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2(2): 48-54.
- Bray, E. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035-1040.
- Brestic, M., Zivcak, M. 2013. PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plant: protocols and applications. In: Rout GR, Das, AB. (eds). *Molecular Stress Physiology of Plants* pp. 87-131.
- Brevis, P.A., Bassil, N. V, Ballington, J.R., Hancock, J.F. 2008. Impact of wide hybridization on highbush blueberry breeding. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 133: 427–437.
- Bryla, D., Strik, B. 2007. Effects of cultivar and plant spacing on the seasonal water requirements of highbush blueberry. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 132(2): 270-277.
- Caligari, P.D.S., Retamales, J.B., Lobos, G.A. 2009. Blueberry Breeding for Chilean Conditions. *Acta Hortic.* 810: 125–128.
- Camargo, A.V., Lobos, G.A. 2016. Latin America: a development pole for phenomics. *Front. Plant Sci.* 7: 1–6.
- Campbell, B.M., Vermeulen, S.J., Aggarwal, P.K., Corner-Dolloff, C., Girvetz, E., Loboguerrero, A.M., Ramirez-Villegas, J., Rosenstock, T., Sebastian, L., Thornton, P.K., Wollenberg, E. 2016. Reducing risks to food security from climate change. *Glob. Food Sec.* 11: 34–43.
- Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F.W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A.M., Francia, E., Marè, C., et al. 2008. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *F. Crop. Res.* 105: 1–14.
- Chandra Babu, R., Zhang, J., Blum, A., David Ho, T.-H., Wu, R., Nguyen, H.T. 2004. *HVA1*, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Sci.* 166: 855–862.
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress:

- regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103: 551–560.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S. 2003. Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 30: 239-264.
- Chen, H., Jiang, J. 2010. Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environ. Rev.* 18: 309–319.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., Zhu, J.K. 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany.* 55(395): 225–236.
- Cominelli, E., Conti, L., Tonelli, C., Galbiati, M. 2013. Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *N. Biotechnol.* 30: 355–361.
- Cornic, G., 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture-not by affecting ATP synthesis. *Trends Plant Sci.* 5: 187–188.
- Davies, C., Robinson, S.P. 1996. Sugar Accumulation in Grape Berries (Cloning of Two Putative Vacuolar Invertase cDNAs and Their Expression in Grapevine Tissues). *Plant Physiol.* 111: 275-283.
- Dhanaraj, A.L., Slovin, J., Rowland, L. 2004. Analysis of gene expression associated with cold acclimation in blueberry floral buds using expressed sequence tags. *Plant Sci.* 166(4): 863-872.
- Dhanaraj, A.L., Slovin, J.P., Rowland, L.J. 2005. Isolation of a cDNA clone and characterization of expression of the highly abundant, cold acclimation-associated 14 kDa dehydrin of blueberry. *Plant Sci.* 168: 949–957.
- Duan, J., Cai, W., 2012. *OsLEA3-2*, an Abiotic Stress Induced Gene of Rice Plays a Key Role in Salt and Drought Tolerance. *PLoS One* 7: e45117.
- Erb, W. 1993. Improved drought tolerance and root development as components of a scheme to breed blueberries for mineral soil adaptability. *Euphytica* 70: 9-16.
- Estrada, F., Escobar, A., Romero-Bravo, S., González-Talice, J., Poblete-Echeverría, C., Caligari, P.D.S., Lobos, G.A. 2015. Fluorescence phenotyping in blueberry breeding

- for genotype selection under drought conditions, with or without heat stress. *Sci. Hortic.* 181: 147–161.
- Falqueto, A.R., da Silva Júnior, R.A., Gomes, M.T.G., Martins, J.P.R., Silva, D.M., Partelli, F.L. 2017. Effects of drought stress on chlorophyll a fluorescence in two rubber tree clones. *Sci. Hortic.* 224: 238–243.
- FAO, 2008. Climate change and food security: a framework document. Rome: FAO, 1-27.
- FAO, 2016. El estado mundial de la agricultura y la alimentación: cambio climático, agricultura y seguridad alimentaria. Roma; FAO, 1-99
- Faraloni, C., Cutino, I., Petruccelli, R. 2011. Chlorophyll fluorescence technique as a rapid tool for in vitro screening of olive cultivars (*Olea europaea* L.) tolerant to drought stress. *Environ. Exp. Bot.* 73: 49-56.
- Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R., Hubick, K.T. 1989. Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 40: 503–537.
- Farquhar, G.D., Richards, R.A. 1984. Isotopic Composition of Plant Carbon Correlates with Water-use Efficiency of Wheat Genotypes. *Aust. J. Plant Physiol* 11: 539–52.
- Feller, U. 2016. Drought stress and carbon assimilation in a warming climate: Reversible and irreversible impacts. *J. Plant Physiol.* 20(203): 84-94.
- Freeland, R.S. 1989. Review of soil moisture sensing using soil electrical conductivity. *Transactions of the ASAE* 32(6): 2190-2194.
- Galleta, G.J., Ballington, J.R. 1996. “Blueberries, cranberries and lingonberries”, in *Fruit Breeding, Vine and Small Fruit Crop*, vol.2, eds. J. Janick, J.N. Moore. New York, NY: John Wiley and Sons, Inc. 1-107.
- Gao, J., Lan, T. 2016. Functional characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) protein gene family from *Pinus tabuliformis* (Pinaceae) in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 6: 1–10.
- Garriga, M., Retamales, J.B., Romero-Bravo, S., Caligari, P.D.S., Lobos, G.A. 2014. Chlorophyll, anthocyanin, and gas exchange changes assessed by spectroradiometry in

- Fragaria chiloensis* under salt stress. J. Integr. Plant Biol. 56: 505–515.
- Garriga, M., Romero-Bravo, S., Estrada, F., Escobar, A., Matus, I.A., del Pozo, A., Astudillo, C.A., Lobos, G.A. 2017. Assessing Wheat Traits by Spectral Reflectance: Do We Really Need to Focus on Predicted Trait-Values or Directly Identify the Elite Genotypes Group? Front. Plant Sci. 8, 280.
- Gates, D.M., Keegan, H.J., Schleter, J.C., Weidner, V.R. 1965. Spectral Properties of Plants. Appl. Opt. 4: 11-20.
- Glass, V., Percival, D., Proctor, J. 2005. Tolerance of lowbush blueberries (*Vaccinium angustifolium* Ait.) to drought stress. II. Leaf gas exchange, stem water potential and dry matter partitioning. Can. J. plant Sci. 85(4): 911-917.
- Gough, R.E. 1994. The highbush blueberry and its management. Binghamton, NY: Food Product Press an Imprint of the Haworth Press, Inc.
- Guidetti, R., Beghi, R., Bodria, L., Spinardi, A., Mignani, I., Folini, L. 2009. Prediction of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) ripeness by a portable vis-NIR device. Acta Hortic. 810: 877–886.
- Guo, Y.Y., Yu, H.Y., Kong, D.S., Yan, F., Zhang, Y.J. 2016. Effects of drought stress on growth and chlorophyll fluorescence of *Lycium ruthenicum* Murr. seedlings. Photosynthetica 54: 524–531.
- Guo, Y., Tan, J. 2015. Recent advances in the application of chlorophyll a fluorescence from photosystem II. Photochem. Photobiol. 91: 1–14.
- Gupta, V., Estrada, A.D., Blakley, I., Reid, R., Patel, K., Meyer, M.D., Andersen, S.U., Brown, A.F., Lila, M.A., Loraine, A.E. 2015. RNA-Seq analysis and annotation of a draft blueberry genome assembly identifies candidate genes involved in fruit ripening, biosynthesis of bioactive compounds, and stage-specific alternative splicing. Gigascience 4, 5.
- Hancock, J.F., Lyrene, P., Finn, C.E., Vorsa, N., Lobos, G.A. 2008. “Blueberries and cranberries”, in Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics, ed. J.F. Hancock. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 115-149.

- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., Ahmad, A. 2012. Role of proline under changing environments. *Plant Signal. Behav.* 7: 1456–1466.
- Holzzapfel, E.A., Hepp, R.F., Mariño, M.A. 2004. Effect of irrigation on fruit production in blueberry. *Agric. Water Manag.* 67: 173–184.
- Huang, W., Zhang, H., Liu, W., Li, C., 2012. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 13(2): 94–102.
- Huang, X., Madan, A. 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9(9): 868-877.
- Hundertmark, M., Hinch, D.K., 2008. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9, 118.
- Inoue, Y., Peñuelas, J., Miyata, A., Mano, M., 2008. Normalized difference spectral indices for estimating photosynthetic efficiency and capacity at a canopy scale derived from hyperspectral and CO<sub>2</sub> flux measurements in rice. *Remote Sens. Environ.* 112: 156–172.
- Inskip, W.P., Bloom, P.R. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in n,n-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol.* 77: 483–485.
- Intergovernmental Panel of Climatic Change (IPCC). 2014. *Climate Change 2014 Synthesis report.*
- Kaya, C., Kirnak, H., Higgs, D., Saltali, K. 2002. Supplementary calcium enhances plant growth and fruit yield in strawberry cultivars grown at high (NaCl) salinity. *Sci. Hortic.* 93: 65–74.
- Knipling, E.B. 1970. Physical and physiological basis for the reflectance of visible and near-infrared radiation from vegetation. *Remote Sens. Environ.* 1: 155–159.
- Kumar, S., Singh, B., 2009. Effect of water stress on carbon isotope discrimination and Rubisco activity in bread and durum wheat genotypes. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 15: 281–286.

- Lambers, H., Chapin, F.S., Pons, T.L. 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer Science, USA. 540 pp.
- Lawlor, D.W. 2002. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: Stomata vs. Metabolism and the role of ATP. *Ann. Bot.* 89: 871–885.
- Lawlor, D.W., Cornic, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant. Cell Environ.* 25: 275–294.
- Lawson, T., Blatt, M.R., 2014. Stomatal Size, Speed, and Responsiveness Impact on Photosynthesis and Water Use Efficiency. *Plant Physiol.* 164: 1556–1570.
- Levi, P., Panta, G., Parmentier, C.M., Muthalif, M.M., Arora, R., Shanker, S., Rowland, L.J. 1999. Complementary DNA cloning, sequencing and expression of an unusual dehydrin from blueberry floral buds. *Physiol. Plant.* 107: 98-109.
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K., Becker, D.F. 2013. Proline Mechanisms of Stress Survival. *Antioxid. Redox Signal.* 19: 998–1011.
- Liu, Y., Wang, L., Xing, X., Sun, L., Pan, J., Kong, X., Zhang, M., et al. 2013. *ZmLEA3*, a multifunctional group 3 LEA protein from maize (*Zea mays* L.), is involved in biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Physiol.* 54: 944–959.
- Lloyd, G., McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings - International Plant Propagators' Society (USA).
- Lobos, G.A., Hancock, J.F. 2015. Breeding blueberries for a changing global environment: a review. *Front. Plant Sci.* 6: 1–14.
- Lobos, G.A., Matus, I., Rodriguez, A., Romero-Bravo, S., Araus, J.L., Del Pozo, A. 2014. Wheat genotypic variability in grain yield and carbon isotope discrimination under Mediterranean conditions assessed by spectral reflectance. *J. Integr. Plant Biol.* 56: 470–479.
- Lobos, G.A., Poblete-Echeverría, C., 2017. Spectral Knowledge (SK-UTALCA): Software

- for Exploratory Analysis of High-Resolution Spectral Reflectance Data on Plant Breeding. *Front. Plant Sci.* 7. 1996. doi: 10.3389/fpls.2016.01996
- Lopez, G., Behboudian, M.H., Girona, J., Marsal, J. 2012. Drought in deciduous fruit trees: implications for yield and fruit quality. In: *Plant Responses to Drought Stress*. Ed. R. Aroca. Pp. 441–459.
- Magwanga, R.O., Lu, P., Kirungu, J.N., Lu, H., Wang, X., Cai, X., Zhou, Z., et al. 2018. Characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) proteins family and their role in drought stress tolerance in upland cotton. *BMC Genet.* 19, 1–31.
- Mahajan, S., Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444: 139-158.
- Maqbool, R., Percival, D.C., Adl, M.S., Zaman, Q.U., Buszard, D. 2012. In situ estimation of foliar nitrogen in wild blueberry using reflectance spectra. *Can. J. Plant Sci.* 92: 1155–1161.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659–668.
- McCann, S.E., Huang, B. 2008. Evaluation of drought tolerance and avoidance traits for six creeping bentgrass cultivars. *HortScience* 43(2): 519-524.
- Mingeau, M., Perrier, C., Améglio, T. 2001. Evidence of drought-sensitive periods from flowering to maturity on highbush blueberry. *Sci. Hortic.* 89: 23–40.
- Misra, A.K.. 2014. Climate change and challenges of water and food security. *Int. J. Sustain. Environ.* 3(1): 153-165.
- Mittler, R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* 11: 15–19.
- Mittler, R., Blumwald, E. 2010. Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 443–462.
- Moghaddam, A., Raza, A., Vollmann, J., Ardakani, M.R., Wanek, W., Gollner, G., Friedel, J.K. 2013. Carbon isotope discrimination and water use efficiency relationships of

- alfalfa genotypes under irrigated and rain-fed organic farming. *Eur. J. Agron.* 50: 82–89.
- Moon, J.W.J., Hancock, J.F.J., Draper, A.D., Flore, J.A. 1987. Genotypic differences in the effect of temperature on CO<sub>2</sub> assimilation and water use efficiency in blueberry. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 112: 170-173.
- Morales, C.G., Pino, M.T., del Pozo, A. 2013. Phenological and physiological responses to drought stress and subsequent rehydration cycles in two raspberry cultivars. *Sci. Hortic.* 162: 234–241.
- Moretti, C.L., Mattos, L.M., Calbo, A.G., Sargent, S.A. 2010. Climate changes and potential impacts on postharvest quality of fruit and vegetable crops: A review. *Food Res. Int.* 43: 1824–1832.
- Munns, R., 2011. Chapter 1 - Plant Adaptations to Salt and Water Stress: Differences and Commonalities, in: Turkan, I.B.T.-A. in B.R. (Ed.), *Plant Responses to Drought and Salinity Stress*. Academic Press, pp. 1–32.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- Myers, S.S., Smith, M.R., Guth, S., Golden, C.D., Vaitla, B., Mueller, N.D., Dangour, A.D., Huybers, P. 2017. Climate Change and Global Food Systems: Potential Impacts on Food Security and Undernutrition. *Annu. Rev. Public Health* 38: 259–277.
- Naik, D., Dhanaraj, A., Arora, R., Rowland, L. 2007. Identification of genes associated with cold acclimation in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) using a subtractive hybridization approach. *Plant Sci.* 173: 213-222.
- Naik, G., Kumar, R., Karajol, K., 2011. Effect of polyethylene glycol induced water stress on physiological and biochemical responses in Pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.). *Recent Res. Sci. Tech.* 3(1): 148-152.
- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2014. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Front. Plant Sci.* 5:170. doi: 10.3389/fpls.

2014.00170

- Neumann, P.M. 2008. Coping mechanisms for crop plants in drought-prone environments. *Ann. Bot.* 101: 901–907.
- Nobel, P. S. 2005. *Physicochemical and environmental plant physiology*. 3rd ed. Elsevier Academic press. 567 pp.
- O’Leary, M.H. 1988. Carbon Isotopes in Photosynthesis Fractionation techniques may reveal new aspects of carbon dynamics in plants. *Bioscience* 38: 328–336.
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), 2013. Informe Final: “Cambio Climático Impacto en la Agricultura Heladas y Sequía”. Disponible en: [www.odepa.gob.cl](http://www.odepa.gob.cl).
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA, 2012). Mercado de arándanos, sin nubarrones en el horizonte. Disponible en: [www.odepa.gob.cl](http://www.odepa.gob.cl).
- Olvera-Carrillo, Y., Luis Reyes, J., Covarrubias, A. 2011. Late embryogenesis abundant proteins. *Plant Signal. Behav.* 6: 586–589.
- Orellana, S., Yáñez, M., Espinoza, A., Verdugo, I., González, E., Ruiz-Lara, S., Casaretto, J.A. 2010. The transcription factor SIAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. *Plant, Cell Environ.* 33: 2191–2208.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., Tran, L.S.P. 2014. Response of plants to water stress. *Front. Plant Sci.* 5:86. doi: 10.3389/fpls.2014.00086.
- Osório, J., Osório, M.L., Correia, P.J., de Varennes, A., Pestana, M. 2014. Chlorophyll fluorescence imaging as a tool to understand the impact of iron deficiency and resupply on photosynthetic performance of strawberry plants. *Sci. Hortic.* 165: 148–155.
- Ow, L.F., Yeo, T.Y., Sim, E.K. 2011. Identification of drought-tolerant plants for roadside greening- An evaluation of chlorophyll fluorescence as an indicator to screen for drought tolerance. *Urban For. Urban Green.* 10: 177–184.

- Panta, G.R., Rieger, M.W., Rowland, L.J. 2001. Effect of cold and drought stress on blueberry dehydrin accumulation. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 76: 549–556.
- Parmentier-Line, C., Panta, G., Rowland, L. 2002. Changes in dehydrin expression associated with cold, ABA and PEG treatments in blueberry cell cultures. *Plant Sci.* 162: 273-282.
- Pedrosa, A.M., Martins, C.D.P.S., Gonçalves, L.P., Costa, M.G.C. 2015. Late Embryogenesis Abundant (LEA) Constitutes a Large and Diverse Family of Proteins Involved in Development and Abiotic Stress Responses in Sweet Orange (*Citrus sinensis* L.). *PLoS One* 10, e0145785.
- Percival, D., Murray, A., Stevens, D. 2003. Drought stress dynamics of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Aiton). *Acta Hort*, pp. 353–362.
- Percival, D.C., Sharpe, S., Maqbool, R., Zaman, Q. 2012. Narrow band reflectance measurements can be used to estimate leaf area index, flower number, fruit set and berry yield of the wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). *Acta Hort.* pp. 363–369.
- Perrier, C., Mingeau, M., Améglio, T., 2000. Effects of water stress on transpiration, radial growth and yield in highbush blueberry. *Acta Hort.* 537: 923–928.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9): e45.
- Pritts, M., Hancock, J.F. (eds.) 1992. *Highbush Blueberry Production Guide*. NRAES-55, Ithaca. New York, USA.
- Reddy, A., Chaitanya, K., Vivekanandan, M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* 161: 1189-1202.
- Retamales, J.B., Hancock, J.F. 2012. *Blueberries*. *Crop Production Science in Horticulture Series no. 21*. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Retamales, J.B., Palma, M.J., Morales, Y.A., Lobos, G.A., Moggia, C.E., Mena, C.A. 2014.

- Blueberry production in Chile: current status and future developments. *Rev. Bras. Frutic.* 36: 58–67.
- Rho, H., Yu, D.J., Kim, S.J., Lee, H.J., 2012. Limitation factors for photosynthesis in “Bluecrop” highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) leaves in response to moderate water stress. *J. Plant Biol.* 55: 450–457.
- Routray, W., Orsat, V. 2011. Blueberries and Their Anthocyanins: Factors Affecting Biosynthesis and Properties. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 10: 303–320.
- Rowland, L., Hancock, J., Bassil, N. 2011. “Blueberry”, in *Genetics, genomics and breeding of berries*, ed. K.M. Folta & C. Kole, Science Publishers, USA. 1-32.
- Rowland, L.J., Alkharouf, N., Darwish, O., Ogden, E.L., Polashock, J.J., Bassil, N. V, Main, D. 2012. Generation and analysis of blueberry transcriptome sequences from leaves, developing fruit, and flower buds from cold acclimation through deacclimation. *BMC Plant Biol.* 12, 46.
- Rowland, L.J., Mehra, S., Dhanaraj, A.L., Ogden, E.L., Slovin, J.P., Ehlenfeldt, M.K. 2003. Development of EST-PCR markers for DNA fingerprinting and genetic relationship studies in blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128: 682–690.
- Rowland, L.J., Panta, G.R., Mehra, S., Parmentier-Line, C. 2004. Molecular genetic and physiological analysis of the cold-responsive dehydrins of blueberry. *J. Crop Improv.* 10: 53–76.
- Sakhanokho, H.F., Rinehart, T.A., Stringer, S.J., Islam-Faridi, M.N., Pounders, C.T. 2018. Variation in nuclear DNA content and chromosome numbers in blueberry. *Sci. Hortic.* 233: 108–113.
- Santibáñez, F., Santibáñez, P. 2007. Cambio climatico y degradacion de tierras en Latinoamerica y Chile. *Rev. Ambient. y Desarrollo* 23: 54–63.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J. 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 31(3): 279-292.

- Shinozaki, K., Urano, K., Maruyama, K., Takahashi, F. 2017. Drought Stress. Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Second Edition. Volumen 1. Pages 8-15.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58: 221–227.
- Silva, M., Jifon, J.L., Santos, C.M., Jadoski, C.J., Silva, J.A. 2013. Photosynthetic capacity and water use efficiency in sugar cane genotypes subject to water deficit during early growth phase. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56(5): 735-748.
- Squeo, F., Ehleringer, J.R. 2004. Isótopos estables: una herramienta común para la ecofisiología vegetal y animal. En *Fisiol. Ecológica en Plantas Mec. y Respuestas a Estrés en los Ecosistemas*. Ed. H. Marino Cabrera. Pp. 59–80.
- Strack, D., Wray, V. 1989. Anthocyanins, in: *Methods in plant biology*. Vol. 1 Plant Phenolics. Ed. J.B. Harbone. Academic Press/Harcourt Brace Jovanovich, London, pp. 325-356.
- Strik, B. 2005. Blueberry: an expanding world berry crop. *Chron. Horticult.* 45: 7-12.
- Szabados, L., Savouré, A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15(2): 89-97.
- Taulavuori, E., Tahkokorpi, M., Laine, K., Taulavuori, K. 2010. Drought tolerance of juvenile and mature leaves of a deciduous dwarf shrub *Vaccinium myrtillus* L. in a boreal environment. *Protoplasma* 241: 19–27.
- Undurraga, P., Vargas, S. 2013. Manual de Arándano. Bol. INIA N263. 120 pp.
- Valliyodan, B., Nguyen, H.T. 2006. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 189–195.
- Vashisth, T., Johnson, L.K., Malladi, A. 2011. An efficient RNA isolation procedure and identification of reference genes for normalization of gene expression in blueberry. *Plant Cell Rep.* 30: 2167–76.
- Verbruggen, N., Hermans, C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids.* 35: 753-759.

- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Zhu, J. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status, Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, *Plant J.* 45: 523-539.
- Verslues, P.E., Sharma, S. 2010. Proline Metabolism and Its Implications for Plant Environment Interaction. *Arab. B.* 8, e0140.
- Walworth, A.E., Rowland, L.J., Polashock, J.J., Hancock, J.F., Song, G. 2012. Overexpression of a blueberry-derived CBF gene enhances cold tolerance in a southern highbush blueberry cultivar. *Mol. Breed.* 30: 1313–1323.
- Wang, J., Bughrara, S. 2007. Monitoring of gene expression profiles and identification of candidate genes involved in drought responses in *Festuca mairei*. *Mol. Genet. Genomics* 277: 571-587.
- Wheeler, T., von Braun, J. 2013. Climate Change Impacts on Global Food Security. *Science* 341(6145): 508–513.
- Wu, L., Ma, L., Li, L., Li, Y. 2016. Studies on morphological and physiological response of eight blueberry cultivars under water stress. *Acta Hortic.* 1117: 251–257.
- Yendrek, C.R., Tomaz, T., Montes, C.M., Cao, Y., Morse, A.M., Brown, P.J., McIntyre, L.M., Leakkey, A.D., Ainsworth, E.A. 2017. High-Throughput Phenotyping of Maize Leaf Physiological and Biochemical Traits Using Hyperspectral Reflectance. *Plant Physiol.* 173: 614–626.
- Zargar, S.M., Gupta, N., Nazir, M., Mahajan, R., Malik, F.A., Sofi, N.R., Shikari, A.B., Salgotra, R.K. 2017. Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective. *Plant Gene* 89.
- Zhang, J., Nguyen, H., Blum, A. 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J. Exp. Bot.* 50(332): 291-302.
- Zifkin, M., Jin, A., Ozga, J.A., Zaharia, L.I., Scherthaner, J.P., Gesell, A., Abrams, S.R., Kennedy, J.A., Constabel, C.P. 2012. Gene Expression and Metabolite Profiling of

Developing Highbush Blueberry Fruit Indicates Transcriptional Regulation of Flavonoid Metabolism and Activation of Abscisic Acid Metabolism. *Plant Physiol.* 158: 200–224.

Zushi, K., Matsuzoe, N. 2017. Using of chlorophyll a fluorescence OJIP transients for sensing salt stress in the leaves and fruits of tomato. *Sci. Hortic.* 219: 216–221.

## Material suplementario

**Tabla S.1.** Resultados del ANOVA evaluando los efectos del riego diferenciado (300 ml y 150 ml de agua) y el tiempo (0, 2, 4 y 6 semanas) sobre el contenido relativo de agua (RWC), en distintos cultivares de arándano. Los valores p significativos ( $p < 0,05$ ) se destacan en negrita.

Fuente de variación	g.l	CM	F	P
<b>Elliott</b>				
Riego	1	189,9	25,30	<b>0,000000</b>
Tiempo	3	5,6	0,76	0,527068
Riego*Tiempo	3	29,4	3,94	<b>0,016878</b>
Error	32	7,5		
<b>Bluegold</b>				
Riego	1	341,6	19,75	<b>0,000068</b>
Tiempo	3	74,4	4,30	<b>0,010122</b>
Riego*Tiempo	3	132,6	7,67	<b>0,000366</b>
Error	40	17,3		
<b>Brigitta</b>				
Riego	1	1758,1	98,15	<b>0,000000</b>
Tiempo	3	480,2	26,81	<b>0,000000</b>
Riego*Tiempo	3	525,7	29,35	<b>0,000000</b>
Error	40	17,9		
<b>Biloxi</b>				
Riego	1	252,8	10,61	<b>0,002170</b>
Tiempo	3	170,1	7,03	<b>0,000582</b>
Riego*Tiempo	3	155,9	6,44	<b>0,001034</b>
Error	44	24,2		
<b>Sharpblue</b>				
Riego	1	139,9	9,78	<b>0,003281</b>
Tiempo	3	32,8	2,29	0,092508
Riego*Tiempo	3	60,3	4,21	<b>0,011094</b>
Error	40	14,3		
<b>Oneal</b>				
Riego	1	347,1	32,58	<b>0,000002</b>
Tiempo	3	31,9	3,00	<b>0,043235</b>
Riego*Tiempo	3	51,2	4,80	<b>0,006490</b>
Error	36	10,7		

**Tabla S.2.** Resultados del ANOVA evaluando los efectos del riego diferenciado (300 ml y 150 ml de agua) y el tiempo (0, 2, 4 y 6 semanas) sobre Fv/Fm, en distintos cultivares de arándano. Los valores p significativos ( $p < 0,05$ ) se destacan en negrita.

<b>Fuente de variación</b>	<b>g.l.</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Elliott</b>				
Riego	1	0,03838	5,615	<b>0,022483</b>
Tiempo	3	0,13258	19,395	<b>0,000000</b>
Riego*Tiempo	3	0,02799	4,095	<b>0,012274</b>
Error	42	0,00684		
<b>Bluegold</b>				
Riego	1	0,15077	55,93	<b>0,000000</b>
Tiempo	3	0,19870	73,71	<b>0,000000</b>
Riego*Tiempo	3	0,10674	39,59	<b>0,000000</b>
Error	49	0,00270		
<b>Brigitta</b>				
Riego	1	0,37180	203,38	<b>0,00</b>
Tiempo	3	0,55064	301,22	<b>0,00</b>
Riego*Tiempo	3	0,23872	130,58	<b>0,00</b>
Error	46	0,00183		
<b>Biloxi</b>				
Riego	1	0,00000	0,00	0,985454
Tiempo	3	0,05177	24,85	<b>0,000000</b>
Riego*Tiempo	3	0,00038	0,18	0,907571
Error	76	0,00208		
<b>Sharpblue</b>				
Riego	1	0,03996	13,32	<b>0,000578</b>
Tiempo	3	0,04963	16,55	<b>0,000000</b>
Riego*Tiempo	3	0,04145	13,82	<b>0,000001</b>
Error	56	0,00300		
<b>Oneal</b>				
Riego	1	0,06217	18,888	<b>0,000096</b>
Tiempo	3	0,06438	19,560	<b>0,000000</b>
Riego*Tiempo	3	0,03921	11,914	<b>0,000011</b>
Error	39	0,00329		

**Tabla S.3.** Resultados del ANOVA evaluando los efectos del riego diferenciado (300 ml y 150 ml de agua), a la sexta semana de estrés por déficit hídrico, sobre las variables respuestas medidas: Contenido de prolina y Composición isotópica del  $^{13}\text{C}$ , en distintos cultivares de arándano. Los valores  $p$  significativos ( $p < 0,05$ ) se destacan en negrita.

<b>Fuente de variación</b>	<b>g.l</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Contenido de prolina</b>				
Cultivar	5	1726505	10,5195	<b>0,000001</b>
Riego	1	76087947	463,6017	<b>0,000000</b>
Cultivar*Riego	5	1340468	8,1674	<b>0,000012</b>
Error	48	164124		
<b>Composición isotópica del <math>^{13}\text{C}</math></b>				
Cultivar	5	14,85	70,9	<b>0,000000</b>
Riego	1	64,67	308,6	<b>0,000000</b>
Cultivar*Riego	5	0,38	1,8	0,130264
Error	46	0,21		

**Tabla S.4.** Resultados del ANOVA evaluando los efectos del riego diferenciado sobre la expresión relativa de genes candidatos pertenecientes a la familia LEA, medidos a la sexta semana de estrés por déficit hídrico (normalizando con *ACT7*), en cultivares de arándano. Los valores *p* significativos ( $p < 0,05$ ) se destacan en negrita.

Fuente de variación	g.l	CM	F	<i>P</i>
<i>Dehidrina 1</i>				
Cultivar	5	815,846	43,1040	<b>0,000000</b>
Riego	1	1415,852	74,8045	<b>0,000000</b>
Cultivar*Riego	5	814,214	43,0178	<b>0,000000</b>
Error	68	18,927		
<i>Dehidrina 2</i>				
Cultivar	5	18,2801	2,76101	<b>0,023759</b>
Riego	1	34,5245	5,21453	<b>0,025086</b>
Cultivar*Riego	5	18,8455	2,84640	<b>0,020483</b>
Error	79	6,6208		
<i>Dehidrina 3</i>				
Cultivar	5	1166,894	137,9216	<b>0,00</b>
Riego	1	1550,346	183,2438	<b>0,00</b>
Cultivar*Riego	5	1155,570	136,5831	<b>0,00</b>
Error	69	8,461		
<i>Lea 1</i>				
Cultivar	5	7,0443	2,8731	<b>0,019240</b>
Riego	1	52,2802	21,3234	<b>0,000014</b>
Cultivar*Riego	5	6,5206	2,6596	<b>0,027950</b>
Error	83	2,4518		
<i>Lea 2</i>				
Cultivar	5	3,8766	5,2142	<b>0,000438</b>
Riego	1	7,4925	10,0779	<b>0,002294</b>
Cultivar*Riego	5	2,7617	3,7147	<b>0,005099</b>
Error	65	0,7435		
<i>Lea 3</i>				
Cultivar	5	0,4448	1,6833	0,148833
Riego	1	7,6417	28,9190	<b>0,000001</b>
Cultivar*Riego	5	0,5100	1,9300	0,099107
Error	76	0,2642		
<i>RD22</i>				
Cultivar	5	8,3003	11,1114	<b>0,000000</b>
Riego	1	18,7656	25,1208	<b>0,000005</b>
Cultivar*Riego	5	7,7061	10,3159	<b>0,000000</b>
Error	64	0,7470		