



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN EL
TALLO DE 25 LÍNEAS RCSLs DE CEBADA Y SU RELACIÓN CON LA
CAPACIDAD DE PRODUCIR GRANOS EN CONDICIONES DE ESTRÉS
HÍDRICO.**

MEMORIA DE TÍTULO

ANA MARÍA MENDEZ ESPINOZA

TALCA-CHILE

2006



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMIA**

**“Determinación de la concentración de carbohidratos en el tallo de 25 líneas RCLS de
cebada y su relación con la capacidad de producir granos en condiciones de estrés
hídrico”**

por

Ana María Méndez Espinoza

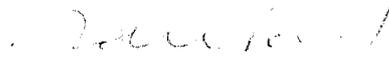
MEMORIA DE TITULO

Presentada a la
Universidad de Talca como
parte de los requisitos para optar al título de

INGENIERO AGRONOMO

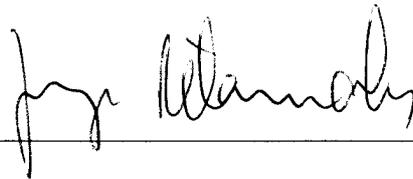
Talca - Chile
2008

APROBACIÓN:



Profesor Guía:

Lic. Biol., M. Sc., Ph. D. Alejandro del Pozo Lira
Profesor Escuela de Agronomía
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad de Talca.



Profesor Informante:

Ing. Agr., M. Sc., Ph. D. Jorge Retamales Aranda
Profesor Escuela de Agronomía
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad de Talca.

Fecha de presentación Defensa de Memoria: 14 de Agosto de 2008

*“Hay en el mundo un lenguaje que todos comprenden:
es el lenguaje del entusiasmo, de las cosas hechas con
amor y con voluntad, en busca de aquello que se desea
o en lo que se cree”*

Paulo Coelho

*Gracias a mis padres por enseñarme a no temer a los
sueños y que nuestras capacidades son limitadas solo por el
miedo a lo desconocido. También a todas las personas que
han estado presentes en este camino.*

A. Méndez-Espinoza

RESUMEN

El contenido de carbohidratos (CHO) en el tallo de 24 Líneas Recombinantes por Sustitución Cromosómica (RCSLs) de cebada (*Hordeum vulgare* L.) fueron evaluadas en dos ambientes, Cauquenes (con y sin riego, precipitación anual 260 mm), 35°58' lat. Sur; 72°17' long. Oeste; 177 m.s.n.m) y Santa Rosa, Chillán (con riego, 36°32' lat. Sur; 71°55' long. Oeste; 220 m.s.n.m), durante la temporada 2006-2007. Las RCSLs derivan del cruce entre *H. vulgare* subsp. *spontaneum* (Caeserea 26-24 de origen israelí), como padre donante, y *H. vulgare* subsp. *vulgare* cv. Harrington (de origen norteamericano de alta calidad maltera) como padre recurrente. El cv. Harrington fue usado como referencia en ambos ambientes. La siembra fue realizada el 1 de julio y 24 agosto 2007 en Cauquenes y Santa Rosa respectivamente, en tanto que la cosecha de grano se realizó el 5 diciembre 2007 y 14 enero 2008 en ambos ambientes correspondientemente. El diseño experimental correspondió a un α -látice con cuatro repeticiones y cinco bloques incompletos por cada repetición. La concentración de carbohidratos fue determinada usando el método de la Antrona y medición espectrofotométrica a 620 nm, en dos estados de desarrollo de la planta: antesis y madurez fisiológica. Además se midió durante la misma temporada: rendimiento, peso de mil granos, N° granos por espiga e índice de cosecha. El ANDEVA indicó que el ambiente tuvo una influencia altamente significativa sobre la expresión de todas las variables, indicando que la concentración de carbohidratos fue mayor en el ambiente seco (Cauquenes), las variables rendimiento, peso de mil granos e índice de cosecha fueron mayores en el ambiente favorable (Santa Rosa). El efecto del genotipo fue significativo para todas las variables. El análisis de correlaciones no mostró relaciones significativas entre carbohidratos y rendimiento, índice de cosecha y componentes del rendimiento en la localidad de Cauquenes, pero presentó una correlación positiva y significativa entre carbohidratos en antesis y peso de los 1000 granos ($r=0,44$; $p<0,05$) en Santa Rosa. Del mismo modo en Santa Rosa se presentaron correlaciones negativas entre carbohidratos y rendimiento, así como índice de cosecha y número de granos por espiga.

ABSTRACT

The stem carbohydrate (CHO) concentration of 24 recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) of barley (*Hordeum vulgare* L.) were evaluated in two environments, Cauquenes (without irrigation, annual rainfall 260 mm, 35°58' South; 72°17' West; 177 m.a.s.l) and Santa Rosa, Chillán (with irrigation, 36°32' South; 71°55' West; 220 m.a.s.l), during the 2007/2008 growing season. The RCSLs were derived from crossing an accession of *H. vulgare* subsp. *spontaneum* (Caeserea 26-24 from Israel), as a donor, and *H. vulgare* subsp. *vulgare* cv. Harrington (the North American malting quality standard) as the recurrent parent. The cv. Harrington was used as reference in all environments. Sowing dates were 27 May and 30 August 2004 in Cauquenes and Santa Rosa, respectively and yield maturity were 5 December 2007 and 14 January 2008 in both environments correspondingly.. The experimental design was an α -lattice with four replicates and five incomplete blocks for each replicate. CHO was determined using the Anthrone method and spectrophotometry at 620 nm, at ear emergence and at physiological maturity. In addition: grain yield, harvest index and yield components were measured at the end of the growing season. The ANOVAs showed a strong and significant effect of the environment in all variables, indicating that CHO were higher in the driest environment (Cauquenes), but grain yield, 1000 kernel weight and harvest index were higher in the more favourable environment (Santa Rosa). Also, the genotypic effect was significant for all variables. The correlation matrix showed no significant correlations between CHO and grain yield, harvest index or yield components in Cauquenes, but a positive and significant correlation between CHO at ear emergence and 1000 kernel weight ($r = 0.44$; $P < 0.05$) in Santa Rosa. However, the correlation between CHO and grain yield, harvest index and number of kernels per spike were negative in Santa Rosa.

INDICE

1. INTRODUCCION	11
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	
2.1 Descripción de la especie	13
2.1.1 Importancia económica del cultivo en Chile y en la VII Región	13
2.2 Material genético	13
2.3 Tolerancia a estrés en plantas	14
2.3.1 Tallos de cereales, fuente de reserva de carbohidratos	16
2.3.2 Fructanos, principales carbohidratos de reserva	17
3. MATERIALES Y METODOLOGIA	
3.1 Características del sitio experimental	18
3.2 Material vegetal y manejo el cultivo	18
3.2.1 Diseño experimental	19
3.3 Colecta de muestras para carbohidratos	19
3.4 Determinación de la concentración de carbohidratos	19
3.4.1 Análisis de la concentración de carbohidratos	20
3.5 Rendimiento de grano y sus componentes	20
3.6 Análisis estadístico	20
4. RESULTADOS	
4.1 Acumulación y concentración final de carbohidratos en el tallo	21
4.2 Rendimiento de granos y sus componentes	23
4.3 Relación entre CHO, rendimiento de grano y sus componentes	26

5. DISCUSIONES	
5.1 Carbohidratos en antesis	28
5.2 Carbohidratos a madurez fisiológica	29
5.3 Rendimiento y sus componentes	30
5.4 Carbohidratos y rendimiento	31
6. CONCLUSIONES	33
7. REFERENCIAS	34
8. ANEXOS	38

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tab. 4.1. Análisis de varianza, parámetros del ambiente, genotipo y genotipo/ambiente para 6 variables relacionadas con la productividad.	21
Tab. 4.2. Medias (\pm DE) de concentración de carbohidratos (CHO) en el tallo en dos estados de desarrollo, de 24 RCSLs clasificadas según respuesta a estrés hídrico y el padre recurrente Harrington (HA) en dos ambientes: Cauquenes-secano y Santa Rosa.	23
Tab. 4.3. Medias (\pm DE) de rendimiento e índice de cosecha de 24 RCSLs clasificadas según respuesta a estrés hídrico y el padre recurrente Harrington (HA) en dos ambientes: Cauquenes-secano y Santa Rosa.	25
Tab. 4.4. Medias (\pm DE) de número de granos por espiga y peso de los 1000 granos de 24 RCSLs clasificadas según respuesta a estrés hídrico y el padre recurrente Harrington (HA) en dos ambientes: Cauquenes-secano y Santa Rosa.	25
Tab. 4.5. Correlaciones de carbohidratos (CHO) a espigadura, madurez fisiológica, rendimiento de granos (rdto), índice de cosecha (IC), número de granos/espiga y peso de los 1000 granos. a) Cauquenes-riego, b) Cauquenes-secano, c) Santa Rosa. Se indican con negrita los valores significativos ($p < 0,05$).	27
Fig. 4.1. Concentración de carbohidratos de las 24 RCSLs y del cv. Harrington (HA), en los ambientes Cauquenes-secano (a,c), Santa Rosa (b,d), en el estado de espigadura (a,b) y en madurez fisiológica (c,d). Se indica las medias de las 24 RCSLs (M) y del cv. Harrington (HA).	22
Fig. 4.2. Rendimiento de granos (a,b), peso de 1000 granos (c,d), número de granos por espiga (e,f) e índice de cosecha (g,h) de 24 RCSLs de cebada y del cv. Harrington, en Cauquenes-secano (a,c,e,g) y Santa Rosa (b,d,f,h). Medias de 24 RCSLs (M) para las variables y cv. Harrington (HA).	24

INDICE ANEXOS

Anexo 1	Clasificación de las 25 líneas RCSL según respuesta a estrés hídrico, por Inostroza <i>et al.</i> (2007).	38
Anexo 2	Protocolo para determinar concentración de carbohidratos según método antrona.	39
Anexo 3	Protocolo curva de calibración y recta de calibrado con glucosa.	41
Anexo 4	Protocolo de preparación del reactivo antrona.	43
Anexo 5	Protocolo de preparación de extractos etanólicos procedentes de tallos de cebada, para la valoración de la concentración de carbohidratos solubles por el método de la antrona.	44
Anexo 6	Medias de 24 RCSLs para CHO-espigadura, CHO-madurez, rendimiento, índice de cosecha, número de granos por espiga y peso de los 1000 granos, indicando con (*) los que obtuvieron diferencias significativas con el padre recurrente Harrington (HA). Se incluye media de las 24 RCSLs por ambiente: a) Cauquenes-secano, b) Santa Rosa.	45

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la agricultura se ve enfrentada a nuevos desafíos, principalmente por los cambios que se han producido en el ambiente, tales como incremento en temperatura y periodos de sequía, sumado a un aumento de la población mundial, para lo cual se requiere de cultivos más eficientes y más adaptados a los nuevos escenarios (Ellis *et al.*, 2000). El estrés hídrico es uno de los factores ambientales de mayor importancia que afectan la productividad agrícola a nivel mundial, lo cual es un serio problema principalmente en ambientes áridos y semiáridos del planeta, por la gran variabilidad de precipitaciones que se producen año tras año. En consecuencia, es de gran interés científico y agronómico evaluar la tolerancia que pueden tener las diferentes especies o genotipos a este estrés abiótico y avanzar en el desarrollo de cultivares que sean más tolerantes a esta condición (Taiz y Zeiger, 2006).

Las plantas presentan mecanismos que les permiten tolerar en cierto grado todo tipo de estrés. Entre estos se encuentran: abscisión de hojas, extensión de raíces en profundidad, crecimiento vigoroso temprano, acumulación de reservas durante el periodo vegetativo, control de la apertura y cierre de estomas (Taiz y Zeiger, 2006). Otras formas de otorgar resistencia se logran mediante modificaciones genéticas, donde el traspaso de genes que concedan características de resistencia son evaluados en numerosas especies (De-Long *et al.*, 2007).

El mejoramiento genético de plantas se ha enfocado hacia la búsqueda y colección de germoplasma, puesto que se le considera un reservorio de alelos ausentes en especies cultivadas (St. Martín *et al.*, 1996). Frecuentemente estos alelos se encuentran presentes en especies silvestres que no poseen características agronómicas deseables (Sorrells y Wilson, 1997), pero contribuyen a aumentar la diversidad alélica (Reynolds *et al.*, 2006).

Matus *et al.* (2003), en búsqueda de variabilidad genética en cebada (*Hordeum vulgare* L., Poaceae), desarrollaron una población de líneas recombinantes con sustitución de cromosomas (Recombinant Chromosome Substitution Lines: RCSLs). Las RCSLs representan una rica fuente de diversidad genética posible de ser usada como modelo para estudios fisiológicos y genéticos.

La cebada es una especie que a nivel mundial se cultiva preferentemente en zonas de secano. En comparación con otros cereales, esta posee un eficiente sistema de utilización de agua, por unidad de materia seca producida; sin embargo, la falta de este recurso es un importante factor de estrés abiótico ya que se cultiva en ambientes mediterráneos donde la disponibilidad de agua es baja, especialmente en el periodo de llenado de granos (Australian Government, 2008). La falta de agua entre los días 1 y 14 después de anthesis afecta el proceso de división celular, y en consecuencia el crecimiento del grano (Gooding *et al.*, 2003).

El ancestro de la cebada es *Hordeum vulgare ssp spontaneum*, que como padre donante posee gran potencial genómico para rasgos de adaptación a condiciones ambientales extremas, debido a que es originario de zonas áridas de Asia occidental (Turpeinen *et al.*, 1999; Grando *et al.*, 2005). Además esta especie posee gran compatibilidad para el cruce con la cebada cultivada, incluidos los híbridos obtenidos de cruces artificiales (Hori *et al.*, 2005)

Una de las características que influyen en la tolerancia al estrés hídrico en cereales es la acumulación de carbohidratos en el tallo (Reynolds *et al.*, 2006). Los cereales acumulan reservas en el tallo hasta dos ó tres semanas después de antesis, luego de lo cual estas disminuyen (Bonnet *et al.*, 1993). Numerosos ensayos señalan la importancia de la acumulación de carbohidratos solubles totales (WSC) y su posterior contribución al llenado de granos (Kiniry, 1993; Reynolds *et al.*, 2006; Bingham *et al.*, 2007; Ruuska *et al.*, 2008).

En este trabajo se plantea **la hipótesis** que la concentración de carbohidratos en el tallo depende del ambiente donde crece el genotipo, y que el ancestro *H. spontaneum* le confiere a las RCSLs mayores contenidos de carbohidratos y capacidad de traslocar asimilados al llenado de granos.

El **objetivo general** es evaluar la concentración de carbohidratos en el tallo de RCSLs de cebada, su relación con el rendimiento de grano y la tolerancia que puede otorgar al estrés hídrico en ambientes mediterráneos. Como **objetivos específicos se encuentran**:

- Evaluar la concentración de carbohidratos en el tallo de 24 RCSLs de cebada y del padre recurrente cv. Harrington, en tres ambientes contrastantes en términos de disponibilidad de agua, Cauquenes (con y sin riego), y en Santa Rosa (Chillán), que corresponde a un ambiente óptimo sin restricción hídrica.
- Relacionar la concentración de carbohidratos de las diferentes líneas con la productividad de las mismas.
- Determinar la influencia en la concentración de carbohidratos de la interacción genotipo - ambiente

Este estudio se enmarca dentro del proyecto “Detección de caracteres fenotípicos (morfo-fisiológica y agronómicos) relacionados con la tolerancia al estrés hídrico en líneas recombinantes con substitución de cromosomas (RCSLs) de cebada y estudios de asociación con marcadores moleculares” (FONDECYT- 1060546).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Descripción de la especie

La cebada (*Hordeum vulgare* L) fue uno de los primeros cereales domesticados, su origen corresponde al centro de Mesopotamia. Con el tiempo fue gradualmente desplazada por el trigo, siendo hoy en día, el cuarto cereal cultivado en el mundo después de arroz, trigo y maíz. Este cereal corresponde a una de las 31 especies de *Hordeum*. Es clasificada como monocotiledónea anual, perteneciente a la tribu Triticaceae, familia Poaceae (gramíneas). Es una especie diploide de ciclo de vida anual con $2n=14$ cromosomas (Bengtsson, 1992).

En cuanto a morfología, los tallos de la cebada, dependiendo del cultivar, presentan entre seis a nueve internudos, pudiendo alcanzar una altura que fluctúa entre 0,6 y 1,5 m. Estos son poco vigorosos y huecos provocando que la cebada sea una especie muy susceptible a tnedadura (Faiguenbaum, 2003)

2.1.1. Importancia económica del cultivo en Chile y en la VII Región

La superficie de este cultivo en Chile ha evolucionado desde la temporada 1999-2000 donde existía una superficie de 17.208 há hasta 21.840 há en la última temporada (2007-2008) (ODEPA, 2008). Las regiones con mayor superficie sembrada se presentan desde la región del Maule hasta la región de los Lagos, aunque la superficie ha variado en las diferentes regiones. Por ejemplo, en la temporada 2001-2002 la región del Maule presentaba 1.030 há, la temporada siguiente esta cifra cayó a menos de la mitad y durante la temporada 2006/07 alcanzó una superficie de 980 há (ODEPA, 2008).

El rendimiento promedio de este cultivo está en $48,3 \text{ q ha}^{-1}$ y una producción nacional de 100.122 ton (ODEPA 2008). De la producción total de cebada 81 % se destina a producción de malta, 14 % a alimentación animal (grano y ensilaje), 1% a alimentación humana y un 4% a semilla (Beratto-Medina, 2001).

2.2. Material genético

El material vegetal utilizado en el presente ensayo corresponde a 24 RCSLs de cebada, seleccionadas de una población de 80 (RCSLs) según su tolerancia a estrés hídrico. Estas líneas derivan del cruzamiento entre *H. spontaneum* (Caesarea 26-24) de origen israelí, que corresponde al padre donante, y *H. vulgare* cv. Harrington, de origen norteamericano y

aptitud maltera, utilizado como padre recurrente. Las 80 líneas son el resultado de la realización de dos retrocruzas con el padre recurrente, seguidas de seis generaciones de autofecundación (Matus *et al.*, 2003).

El padre donante, Caesarea 26-24, se colectó en una zona de suelos áridos y salinos localizados en Israel, lo cual sugiere que la incorporación de genoma de éste al cv. Harrington podría conferirle a la progenie características de adaptabilidad a estrés abiótico y principalmente a sequía (Inostroza *et al.*, 2007). El grupo de líneas RCSLs representa una rica fuente de diversidad genética, la cual puede ser usada como modelo para mediciones fisiológicas y genéticas o el descubrimiento de nuevos genes (Matus *et al.*, 2003).

Las 24 RCSLs (Anexo 1) se seleccionaron en relación a su respuesta al estrés hídrico (Inostroza *et al.*, 2007). Para ello se utilizó el Índice de Sensibilidad a Sequía (ISS) propuesto por Fischer y Maurer (1978) y el índice de adaptabilidad (b) propuesto por Finlay y Wilkinson (1963). Se identificaron líneas **susceptibles** a sequía, las que presentaron un alto valor de ISS (>1) y rendimiento menor o igual al padre recurrente en el ambiente bajo estrés hídrico; líneas **tolerantes**, con un bajo valor ISS y alto rendimiento en ambiente con estrés hídrico; y línea de **alto rendimiento en condiciones de estrés**, independiente del valor de ISS.

2.3. Tolerancia a estrés en plantas

La adaptación a estrés es un proceso celular y molecular en respuesta a un déficit de agua, al cual la planta no estaba acostumbrada (Blum, 1998). Las plantas poseen diversos mecanismos de adaptación al estrés hídrico, los cuales según Reynolds *et al.* (2005), pueden ser clasificados en 4 grupos:

a) Grupo 1: rasgos relacionados con el desarrollo en pre-antesis. El estrés hídrico se intensifica al acercarse la cosecha, razón por la cual durante la etapa de pre-antesis las plantas tienen la mayor oportunidad para la asimilación de carbohidratos. Para el buen cumplimiento de lo anterior son importantes el tamaño del grano, biomasa en pre-antesis y la distribución de los asimilados presentes como reservas en el tallo. El tamaño de la semilla y del embrión pueden ayudar a obtener vigor temprano, como así también el largo del coleóptilo que es importante en aquellos ambientes donde la humedad del suelo es una limitante. Frente a un escenario de sequía durante el llenado de grano las plantas poseen teóricamente dos alternativas que pueden utilizar: i) los asimilados pueden ser repartidos para mejorar el sistema radicular, con ello cubrir el suelo y aprovechar mejor la humedad de éste durante el periodo de estrés; ii) los carbohidratos pueden ser almacenados en el tallo, para luego ser removilizados hacia el llenado de grano.

b) Grupo 2: rasgos relacionados con acceso al agua. El sistema radical extrae el agua desde el perfil del suelo, sin embargo, realizar una medición directa es difícil. La profundidad del sistema radical se puede reflejar en el estado hídrico de la planta a través de la habilidad de explorar y extraer agua desde el suelo. Los rasgos que se relacionan con el estado hídrico en la planta, son: i) **Conductancia estomática**, que es una medición instantánea de la apertura de los estomas, lo que se afecta directamente con el contenido de agua en las hojas. ii) **Ajuste osmótico**, definido como la concentración de solutos en las células, que está íntimamente relacionada con el estado hídrico de la planta; esta puede ser medida por el potencial hídrico: $\psi(\text{hídrico}) = \psi_{\text{sólido}} + \psi_{\text{turgor}}$. Estos métodos indirectos pueden indicar un modelo de la extracción de agua desde el perfil de suelo.

c) Grupo 3: rasgos relacionados con el eficiente uso del agua. En un cultivo es difícil medir directamente la eficiencia de uso del agua, ya que son procesos de flujos entre el suelo y la atmósfera ocurridos por la transpiración de las hojas y la evaporación del suelo. Los rasgos que se relacionan con la eficiencia de uso del agua son: i) **Discriminación isotópica del carbono ($\Delta^{13}\text{C}$)**, que puede ser usado de forma indirecta como criterio de selección en rendimiento en ambientes bajo sequía. $\Delta^{13}\text{C}$ es un buen indicador intrínseco de la eficiencia de uso de agua en ambientes no expuestos a estrés hídrico. ii) **Capacidad de fotosíntesis de la espiga**, la que puede jugar rol importante en el llenado de grano bajo estrés hídrico severo. En ambientes secos, genotipos de espiga relativamente larga, disminuye la senescencia prematura de ésta, con lo cual pueden aumentar el área de intercepción de luz durante el llenado de grano llegando a aportar hasta un 40% de la fijación de carbono bajo ambientes controlados. iii) **Índice de cosecha**, que depende de la disponibilidad de agua durante el llenado de granos y otros factores como la partición de CHO en pre-antesis, entre los que se destinan a CHO-estructural y CHO-solubles. También está definido como el uso del agua en función de la demanda evaporativa y el área de hojas.

d) Grupo 4: rasgos relacionados con la foto-protección. Las plantas poseen adaptaciones anatómicas y bioquímicas para protegerse del daño por exceso de radiación, entre las que se encuentran: i) **Antioxidantes**, tales como superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa, que disminuyen la foto inhibición, los que podrían tener un incremento en condiciones de estrés por sequía. ii) **Anatomía de las hojas**, en relación al contenido de clorofila de las hojas, número de éstas, su enrollamiento, pubescencia, postura erecta y cera cuticular, pueden reducir potencialmente la radiación incidente y con ello la cantidad de asimilados.

2.3.1. Tallos de cereales, fuente de reserva de carbohidratos

Los tallos de los cereales son una fuente de acumulación de carbohidratos en forma de glucosa, fructosa, sacarosa, almidón, siendo principalmente almacenados como fructanos. El total de reservas de carbohidratos en raíces u hojas es relativamente pequeño comparado con el tallo (incluidas la envoltura de hojas). Estas reservas son comúnmente analizadas como total de carbohidratos estructurales o carbohidratos solubles en agua (WSC) y están disponibles para la traslocación durante el llenado de grano (Blum, 1998).

En cereales, parte importante de los carbohidratos que se utilizan durante el llenado de granos son producidos gracias a la luz interceptada por las estructuras verdes de las plantas previa antesis, acumulándose en forma de reservas en el tallo (Blum, 1998). Aquellas reservas de asimilados almacenadas en partes vegetativas de las plantas antes de antesis son significativamente importantes en el periodo de llenado de grano, principalmente cuando se presentan condiciones desfavorables, y no es posible llevar a cabo un proceso fotosintético adecuado (Schnyder, 1993; Gebbing y Schnyder, 1999; Álvaro *et al.*, 2008).

Esta acumulación de reservas antes de antesis contribuye al rendimiento de grano en una proporción variable dependiendo de la especie y el medio en que se encuentren las plantas. En cebada esta contribución puede representar desde un 20 a 30% en condiciones favorables, sin embargo, al encontrarse bajo condiciones de estrés, esto es, cuando la actividad fotosintética es detenida por sequía o calor antes que se produzca antesis, el llenado de granos se vuelve más dependiente de la movilización que pueden hacer desde los tallos, llegando a representar entre un 22 a 60% del total de masa acumulada en los granos (Ehdaie *et al.*, 2006a, b). También, la contribución potencial de los WSC al llenado de granos difiere significativamente entre lugares y años; en cebada Bingham *et al.* (2007) obtuvieron un rango de 11% y un 45% como contribución al rendimiento. Una proporción de estos WSC son utilizados en otros procesos, tales como respiración (Schnyder, 1993). Reynolds *et al.* (2006) evaluando diferentes líneas de trigo obtuvieron valores entre 4,9 y 26,1% en antesis y luego una clara movilización al medir en tallo maduro, donde los valores fueron de 1,6 a 4,1% en las diferentes líneas, esto bajo diferentes condiciones medioambientales.

La demanda desde el grano (sumidero) es el factor primario de la movilización de las reservas del tallo. Kiniry (1993), estudió en trigo, el comportamiento que poseen los carbohidratos de reserva en tallos, como afecta la demanda en espigas normales y otras con menor cantidad de granos, obteniendo como resultado una menor demanda por parte de las espigas con menos granos. Consecuencia de lo anterior, estas últimas presentaron una mayor concentración de carbohidratos en el tallo. La interacción entre tamaño de espiga y la demanda de los carbohidratos almacenados en el tallo depende, entre otros factores, de las condiciones medioambientales en que se encuentren las plantas, antes o durante el llenado de granos

(Blum, 1998). El incremento del potencial de almacenamiento del tallo también puede ser considerado un sumidero, el cual es definido tanto por el largo, como por el diámetro de los tallos, características de alto control genético (Blum, 1998).

2.3.2. Fructanos, principales carbohidratos de reserva

Los fructanos constituyen un importante porcentaje de los carbohidratos de reserva en cereales, hierbas y muchas otras plantas. Estos corresponden a polímeros de fructosa, sintetizados a partir de una concentración umbral de sacarosa, la cual induce la expresión de genes involucrados en las vías metabólicas de la producción de estos carbohidratos (Kerepesi *et al.*, 2002; Xue *et al.*, 2008). La acumulación de fructanos bajo condiciones de estrés tales como sequía, altas temperaturas y deficiencias de nitrógeno, aumenta, ya que se induce la actividad de sacarosa-sacarosa fructosyltransferase o sacarosa:fructano 6-fructosyltransferase (Morcuende *et al.*, 2005; Nagaraj *et al.*, 2004). Ruuska *et al.* (2008), analizaron la composición de carbohidratos solubles bajo diferentes aportes de nitrógeno en plantas durante antesis, dando como resultado que las plantas que recibieron un bajo aporte de nitrógeno presentaron la mayor acumulación medida, que correspondió a fructanos. Esta medición fue realizada en dos partes del tallo presentando un 25% en la parte inferior y un 16% en el penúltimo entrenudo en relación a peso seco (DW), en contraste con las plantas que recibieron un alto aporte de N que presentaron aproximadamente un 1% (DW).

La acumulación de fructanos en el tallo ocurre durante la extensión de los entrenudos, alcanzando un máximo luego de su extensión total. La acumulación de reserva y capacidad de almacenamiento en los tallos depende fuertemente de las condiciones de crecimiento previo a antesis. Cuando la asimilación de carbono durante la elongación de los tallos es reducida por estrés, el almacenamiento de carbohidratos en el tallo es también reducido (Blum, 1998).

3. MATERIALES Y METODOLOGIA

3.1. Características del sitio experimental

La zona central de Chile presenta un clima tipo mediterráneo con estaciones muy marcadas. Datos de la Dirección Meteorológica de Chile (2008), señalan que el 80% de las precipitaciones se concentran entre los meses de marzo a agosto por lo cual se generan periodos de sequía en etapas importantes del desarrollo de los cultivos, como por ejemplo durante el llenado de los granos, por lo cual muchas veces éstos no alcanzan su máximo potencial de rendimiento. El presente estudio se realizó en dos ambientes de clima mediterráneo pero contrastantes en términos de suelo y disponibilidad de agua para los cultivos: Cauquenes (35°58' lat. Sur; 72°17' long. Oeste; 177 m.s.n.m), con un promedio anual de 260 mm, suelo franco arcillo limoso (Entisol) y definido como condición de estrés hídrico para los cultivos, y Santa Rosa (36°32' lat. Sur; 71°55' long. Oeste; 220 m.s.n.m), con un promedio anual de precipitación de 1200 mm, suelo franco arcilloso (Andisol), y condiciones óptimas para el desarrollo de este cereal, indicándose como inicio del periodo de estrés luego de espigadura (Inostroza *et al.*, 2007).

3.2. Material vegetal y manejo del cultivo

Se utilizaron tallos de 25 RCSLs de cebada incluido el padre recurrente Harrington. Estas líneas fueron establecidas en dos localidades, Cauquenes (VII Región, 35°58' lat. Sur; 72°17' long. Oeste; 177 m.s.n.m), bajo condiciones de secano y con riego, y en Santa Rosa, Chillán (VIII Región, 36°32' lat. Sur; 71°55' long. Oeste; 220 m.s.n.m), ambiente con condiciones óptimas de disponibilidad de agua. La siembra se realizó el 01 de junio y 24 de agosto 2007, en Cauquenes y Santa Rosa, respectivamente. Las semillas de cada genotipo fueron sembradas en seis surcos de 2 m de longitud separadas a 0,2 m. La dosis de semilla utilizada en ambas localidades fue de 120 kg ha⁻¹. Se aplicó una fertilización base de 260 kg ha⁻¹ de fosfato diamónico (46% P₂O₅ y 18% de N²), 90 kg ha⁻¹ de cloruro de potasio (60% de K₂O), 200 kg ha⁻¹ de Sulpomag (22% K₂O, 18% MgO y 22% de S), 10 kg ha⁻¹ de boronatrocalcita (11% de B) y 3 kg ha⁻¹ de sulfato de zinc. Durante el estado de macolla se aplicaron al suelo 80 unidades de nitrógeno ha⁻¹. Para el control de malezas se aplicó una solución de MCPA 750 g i.a. ha⁻¹ + metasulfuron-metil 8 g i.a. ha⁻¹.

3.2.1. Diseño experimental

El diseño correspondió a un α -látice con cuatro repeticiones y cinco bloques incompletos por cada repetición, cada bloque conteniendo cinco líneas. En cada repetición se dispusieron 25 genotipos (24 RCSLs, y el cv. Harrington).

3.3. Colecta de muestras para carbohidratos

Tanto en Cauquenes como en Santa Rosa, se colectaron 5 tallos principales de cada parcela, en dos etapas de desarrollo del cultivo. La primera correspondiente a finales de etapa de antesis, mientras que la segunda se realizó con grano en madurez fisiológica (grano pastoso más o menos seco). En Cauquenes la toma de muestras se realizaron el 27 de septiembre (antesis) y el 8 de noviembre (madurez fisiológica), en tanto que en Santa Rosa estas fueron realizadas el 12 de noviembre (antesis) y el 19 de diciembre (madurez fisiológica). Una vez colectadas, las muestras fueron puestas en bolsas plásticas, con el respectivo número de parcela, puestas en un cooler con hielo (para el traslado desde el campo al Laboratorio), y posteriormente congeladas a -80°C , con el fin de evitar pérdidas de constituyentes por oxidación u otros procesos degenerativos. En total fueron colectadas 600 muestras.

3.4. Determinación de la concentración de carbohidratos

Para la determinación de la concentración de carbohidratos se usó el método de la antrona, protocolo elaborado por la Dr. Rosa Morcuende científica titular del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología Salamanca- España, durante octubre de 2007 en la Universidad de Talca.

Las muestras congeladas a -80°C fueron molidas en un molino de bolas mezclador MIXER MILL Retsch MM 300/301 serie 12630014D, luego la mezcla fue almacenada nuevamente a -80°C hasta el momento de las extracciones etanólicas según protocolo (anexo 2).

Se realizó una curva de calibración con glucosa Sigma Ultra 99,5% código G7528-250g, PM 180,18 (Anexo 3), utilizada para transformar la absorbancia obtenida de acuerdo a la ecuación de la recta obtenida en esta curva.

3.4.1. Análisis de la concentración de carbohidratos

Para la determinación del total de carbohidratos solubles se usaron entre 100 y 150 mg de material fresco que se encontraba almacenado a -80°C , luego se realizaron extracciones con etanol al 80%, 50% y agua tamponada, usando para todos los reactivos HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ pm 238,3 y pH 7,5), como agente buffer. La última extracción se hizo con agua para extraer los carbohidratos de mayor peso molecular, según protocolo (anexo 2). Estas muestras fueron almacenadas a -20°C . Para aplicar el método de la Antrona (anexo 4), los extractos etanólicos se diluyeron 30 veces (anexo 5) ya que presentaron alta concentración de carbohidratos, luego su absorbancia fue medida en un espectrofotómetro Genesys /10 uv a 620 nm. A partir de la curva de calibración elaborada con glucosa, se calculó la concentración de carbohidratos solubles totales expresados en $\mu\text{mol/g}$ peso fresco (PF).

3.5. Rendimiento de grano y sus componentes

Los datos obtenidos de rendimientos y sus componentes fueron proporcionados por Dalma Castillo, Doctorante de la Universidad de Concepción.

La cosecha total de parcelas se realizó el 5 de diciembre de 2007 en Cauquenes y el 14 de enero de 2008 en Santa Rosa. Para los componentes del rendimiento se tomaron 10 espigas al azar, se trillaron y limpiaron, se desecharon los granos partidos y los que no fueron correctamente llenados. Con los restantes se obtuvo la cantidad de granos por espiga. También con esta muestra se evaluó el peso de los 1000 granos.

La materia seca en madurez se evaluó el 30 de noviembre y 17 de diciembre, en Cauquenes y Santa Rosa, respectivamente, para lo cual se cortó en la cuarta fila 50 cm. de izquierda a derecha (cada parcela contenía 5 líneas).

3.6. Análisis estadístico

Los datos se analizarán mediante ANDEVA y se utilizó el modelo PROC GLM, en tanto que para hacer la comparación de cv. Harrington con las 24 RCLSs, con las medias obtenidas con el modelo anterior, se usó el modelo PROC MIXED en SAS (SAS Institute, 1999), donde las RCLSs se consideraron como efecto fijo, mientras que los bloques y bloques incompletos dentro de cada repetición como efectos aleatorios. Las medias mínimas cuadráticas (Least Square Means) se calcularon para las RCLSs y la significancia de la diferencia con el padre recurrente (Harrington) se obtuvo con el comando diff en SAS. Para el análisis de correlación entre las distintas variables se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson de Microsoft Excel.

4. RESULTADOS

El ANDEVA realizado para las variables CHO-espigadura, CHO-madurez, índice cosecha, N° granos/espiga y peso de 1000 granos (Tabla 4.1), permitió determinar que tanto el ambiente (Cauquenes-secano, Cauquenes-riego y Santa Rosa) como el genotipo (24 RCSLs y el cv. Harrington) tuvieron efecto en todas las variables ($P < 0,05$), en tanto que la interacción genotipo/ambiente solo resultó significativa para N° granos/espiga y rendimiento.

En la localidad de Cauquenes no se registró una diferencia estadísticamente significativa entre las condiciones con riego y seco, debido a la compactación del suelo que impidió que se haya obtenido respuesta al riego. Por este motivo se utilizarán para el análisis los dos ambientes más contrastantes, Cauquenes-secano y Santa Rosa, sin embargo, se incluye a Cauquenes-riego en algunas observaciones.

Tabla 4.1. Análisis de varianza, parámetros del ambiente, genotipo y genotipo/ambiente para 6 variables relacionadas con la productividad.

Variabes	Ambiente	Genotipo	Genotipo/Ambiente
CHO-espigadura	327,03***	1,94**	0,92
CHO-madurez	548,68***	2,71***	0,73
Rendimiento	2472,39***	7,34***	2,38***
Índice cosecha	185,19***	1,78**	1,26
N° granos /espiga	21,46***	4,09***	1,43*
Peso 1000 granos	80,95***	1,82**	1,19

Valores obtenidos de las medias de cuatro repeticiones y cinco bloques de una población de 24 RCSLs, más el cv. Harrington. Valores de significancia: *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01-0,05$; * $p < 0,05$

4.1. Acumulación y concentración final de carbohidratos en el tallo

La acumulación de CHO mostró importantes diferencias entre los ambientes. En la localidad de Cauquenes-secano, que corresponde a un ambiente de estrés para el desarrollo de este cultivo, la concentración de carbohidratos tanto en el estado de espigadura como madurez fueron superiores a los observados en Santa Rosa (Figuras 4.1). En Cauquenes-secano, la concentración media de CHO de las 24 RCSLs (12,96%) en estado de espigadura fue superior a la alcanzada por el cv. Harrington (HA; 9,88%) (Fig. 4.1a). Esta tendencia se mantuvo en el estado de madurez fisiológica, puesto que las RCSLs presentaron un porcentaje de

acumulación de carbohidratos (12,63%), superior al alcanzado por cv. HA (11,68%) (Figura 4.1c).

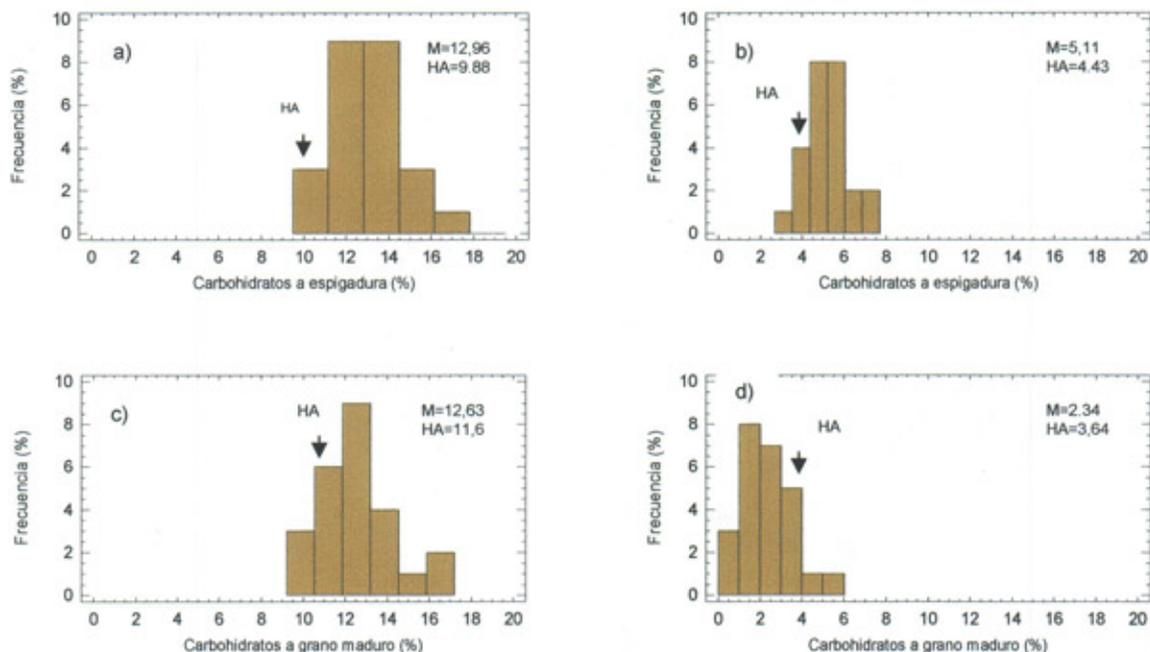


Figura 4.1. Concentración de carbohidratos de las 24 RCLS y del cv. Harrington (HA), en los ambientes Cauquenes-secano (a,c), Santa Rosa (b,d), en el estado de espigadura (a,b) y en madurez fisiológica (c,d). Se indica las medias de las 24 RCLS (M) y del cv. Harrington (HA).

En Santa Rosa, que corresponde a un ambiente óptimo para el desarrollo de la cebada, el promedio de CHO en el tallo en estado de espigadura de las 24 RCLS fue de 5,11% y el del padre HA 4,43%. Pero, en estado de madurez fisiológica, HA presentó 3,68% de CHO y HA solo 2,34%.

Nueve RCLS presentaron diferencias estadísticamente significativas con el cv. HA en ambos ambientes, en las dos mediciones (Anexo 6). En Cauquenes-secano la RCSL-124 es la que presentó mayores diferencias con HA en espigadura (17,17% y 9,88%, respectivamente), clasificada como una línea "no tolerante", en tanto que en Santa Rosa la RCSL-10 presentó diferencias significativas con HA en el mismo estado (6,69 y 4,43%, respectivamente), corresponde a una RCSL "línea de alto rendimiento".

El análisis de estos ambientes altamente contrastantes, permite apreciar una clara diferencia tanto en el porcentaje de CHO en el tallo en estado de espigadura, como en la movilización y traslocación de éstos hacia el llenado de grano, indicados por los valores de porcentaje de acumulación en el estado de madurez fisiológica. En la localidad de Santa Rosa

se observó que las RCSLs movilizaron un mayor porcentaje de lo acumulado a espigadura, comparada con Cauquenes-secano donde se observaron mayores porcentajes de CHO, pero no una clara diferencia entre las dos mediciones (Figura 4.1 c.d).

Los valores medios de CHO por grupos de RCSLs según respuesta a estrés hídrico (Tabla 4.2), muestra que los grupos de líneas tolerantes, susceptibles y de alto rendimiento presentaron en ambas localidades niveles de CHO similares en espigadura, pero distintos en madurez. En espigadura, los tres grupos presentaron concentraciones de CHO superiores al cv. HA. Se destaca de este análisis que el grupo clasificado como "susceptibles" obtuvo las mayores concentraciones medidas en ambos estados de desarrollo de la planta.

Tabla 4.2. Medias (\pm DE) de concentración de carbohidratos (% CHO) en el tallo en dos estados de desarrollo, de 24 RCSLs clasificadas según respuesta a estrés hídrico y el padre recurrente Harrington (HA), en dos ambientes: Cauquenes-secano y Santa Rosa.

	Cauquenes Secano		Santa Rosa	
	CHO Espigadura	CHO Madurez	CHO Espigadura	CHO Madurez
Harrington	9,88	11,68	4,43	3,63
Tolerante (N=8)	13,22 \pm 1,45	12,39 \pm 1,65	5,16 \pm 1,98	1,95 \pm 0,70
Susceptibles (N=5)	13,67 \pm 2,10	14,43 \pm 1,69	5,19 \pm 0,54	2,95 \pm 1,00
Alto rendimiento (N=11)	12,45 \pm 1,30	11,91 \pm 1,41	5,05 \pm 1,17	2,32 \pm 1,29

4.2. Rendimiento de granos y sus componentes

Además de la concentración de CHO en espigadura y madurez, y con el fin de analizar la relación entre esta medición y rendimiento final de las RCSLs en cada ambiente, se consideraron las variables rendimiento de grano, peso de 1000 granos, número de granos por espiga e índice de cosecha (Fig. 4.2). En la localidad de Santa Rosa prácticamente todas las variables presentaron valores superiores a la condición bajo estrés (Cauquenes), excepto número de granos por espiga, los que fueron mayores en Cauquenes-secano (Fig. 4.2e y 4.2f).

Al evaluar el valor promedio presentado por el cv. Harrington, se observó que este superó la media de todas las variables analizadas en los dos ambientes, excepto en peso de 1000 granos donde HA obtuvo una media inferior a la obtenida por las RCSLs tanto en Cauquenes-secano como Santa Rosa (Figura 4.2c y 4.2d), sin embargo estadísticamente presentó diferencias significativas con pocas RCSLs.

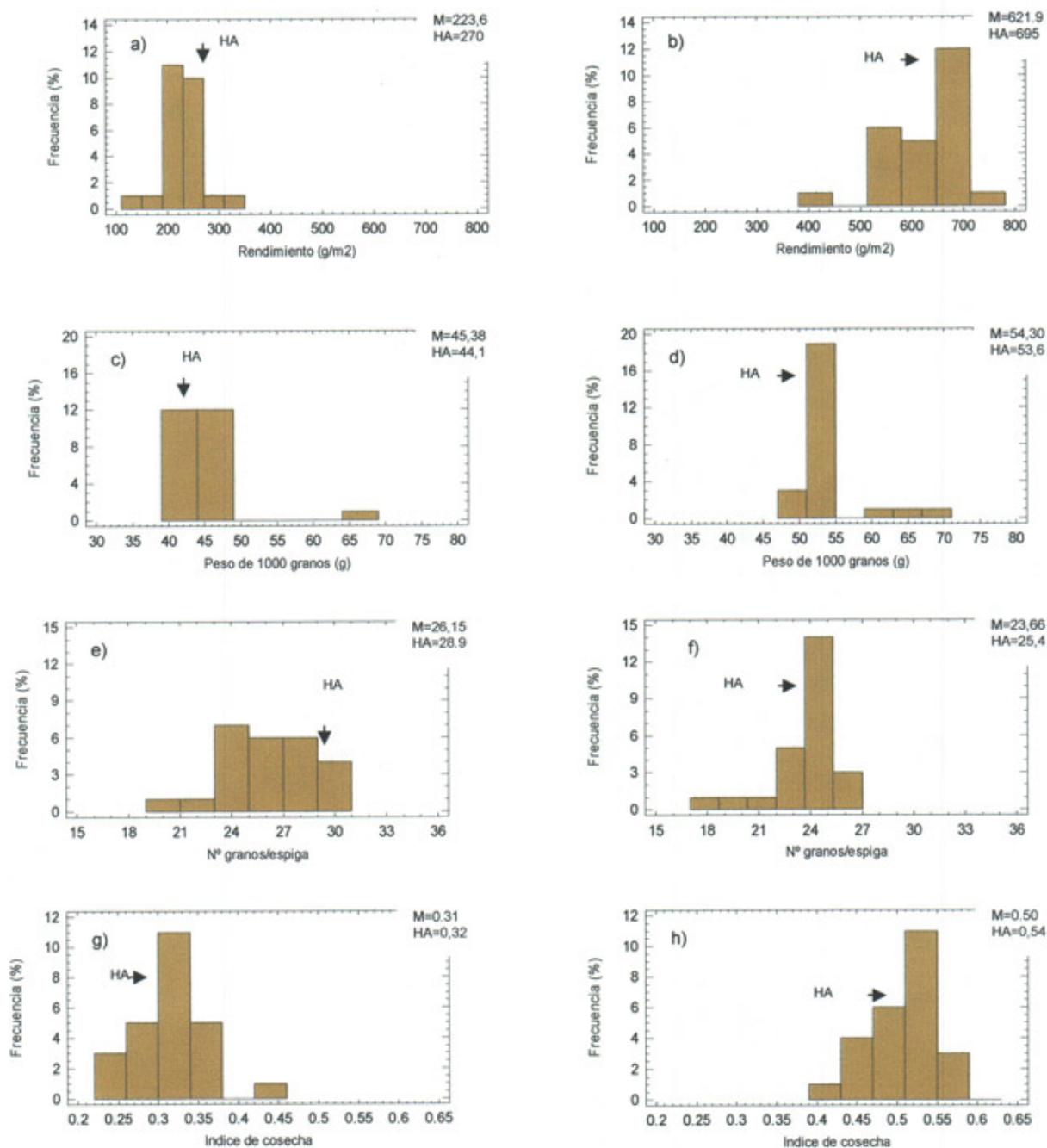


Figura 4.2. Rendimiento de granos (a,b), peso de 1000 granos (c,d), número de granos por espiga (e,f) e índice de cosecha (g,h) de 24 RCLS de cebada y del cv. Harrington, en Cauquenes-secano (a,c,e,g) y Santa Rosa (b,d,f,h). Medias de 24 RCLS (M) para las variables y cv. Harrington (HA)

En Santa Rosa, el rendimiento de granos fue la variable que presentó mayores diferencias estadísticamente significativas entre las RCLS y el cv. HA, siendo las RCSL-89 y RCSL-124 las menos productivas (401,05 y 534,75 g m⁻², respectivamente (Anexo 6)).

Los valores medios de rendimiento y sus componentes por grupos de RCSLs según respuesta a estrés hídrico (Tabla 4.3 y 4.4) indica que el cv. Harrington se ubicó por sobre las RCSLs en rendimiento y N° de granos por espiga, en ambos ambientes.

El número de granos por espiga y el peso de los 1000 granos fue similar en los tres grupos de líneas, en ambos ambientes (Tabla 4.4).

Tabla 4.3. Medias (\pm DE) de rendimiento e índice de cosecha de 24 RCSLs clasificadas según respuesta a estrés hídrico y el padre recurrente Harrington (HA), en dos ambientes: Cauquenes-secano y Santa Rosa.

	Cauquenes		Santa Rosa	
	Rendimiento (g/m ²)	Índice de Cosecha	Rendimiento (g/m ²)	Índice de Cosecha
Harrington	270,75	0,32	695,83	0,54
Tolerante (N=8)	223,43 \pm 29,23	0,30 \pm 0,04	629,42 \pm 61,81	0,50 \pm 0,04
Susceptibles (N=5)	211,50 \pm 56,86	0,30 \pm 0,04	591,46 \pm 126,97	0,48 \pm 0,05
Alto rendimiento (N=11)	229,39 \pm 38,45	0,33 \pm 0,04	630,39 \pm 54,61	0,51 \pm 0,04

Tabla 4.4. Medias (\pm DE) de número de granos por espiga y peso de los 1000 granos de 24 RCSLs clasificadas según respuesta a estrés hídrico y el padre recurrente Harrington (HA), en dos ambientes: Cauquenes-secano y Santa Rosa.

	Cauquenes		Santa Rosa	
	N° granos/espiga	Peso de 1000 granos	N° granos/espiga	peso de 1000 granos
Harrington	28,95	44,17	25,45	53,65
Tolerante (N=8)	25,60 \pm 1,61	47,04 \pm 7,26	24,10 \pm 1,37	52,47 \pm 1,93
Susceptibles (N=5)	27,05 \pm 2,91	43,63 \pm 3,06	23,78 \pm 0,54	55,34 \pm 5,42
Alto rendimiento (N=11)	26,14 \pm 3,24	44,97 \pm 2,54	23,29 \pm 2,34	55,16 \pm 5,01

4.3. Relación entre CHO, rendimiento de grano y sus componentes

El análisis de correlación entre las variables CHO-espigadura, CHO-madurez, rendimiento, índice de cosecha, N° granos por espiga y peso de los 1000 granos, indica que dichas variables presentan un comportamiento totalmente diferente según los ambientes en que se desarrolló el cultivo (Tabla 4.5).

CHO-espigadura presentó una correlación significativa ($p < 0,05$) con CHO-madurez en Cauquenes-riego ($r = 0,43$) y Cauquenes-secano ($r = 0,57$). En tanto en Santa Rosa esta variable se correlacionó negativamente con rendimiento ($r = -0,48$), índice de cosecha ($r = -0,42$) y N° granos por espiga ($r = -0,47$), y positivamente con peso de los 1000 granos ($r = 0,44$). En tanto que CHO-madurez obtuvo una correlación negativa con rendimiento ($r = -0,40$), en Cauquenes-riego.

Rendimiento de granos se correlacionó con índice de cosecha en Cauquenes-secano y Santa Rosa ($r = 0,42$ y $r = 0,67$, respectivamente). En Cauquenes-riego y Cauquenes-secano esta variable se correlacionó positivamente con peso de los 1000 granos ($r = 0,58$ y $r = 0,41$, respectivamente).

El N° granos por espiga presentó una correlación negativa con peso de 1000 granos ($r = -0,58$), en la localidad de Santa Rosa, no presentando significancia en las otras localidades.

Tabla 4.5. Correlaciones de carbohidratos (CHO) a espigadura, madurez fisiológica, rendimiento de granos (rdto), índice de cosecha (IC), número de granos/espiga y peso de los 1000 granos. a) Cauquenes-riego, b) Cauquenes-secano, c) Santa Rosa. Se indican con negrita los valores significativos ($p < 0,05$).

a) Cauquenes-riego

	CHO Espigadura	CHO Madurez	Rdto	I. C.	Nº granos/espiga	Peso 1000 granos
CHO Espigadura	1					
CHO Madurez	0,43	1				
Rdto	0,18	-0,40	1			
IC	0,27	0,28	0,16	1		
Nº granos/espiga	-0,14	-0,29	0,37	-0,20	1	
Peso 1000 granos	0,10	-0,34	0,58	0,09	-0,21	1

b) Cauquenes-secano

	CHO Espigadura	CHO Madurez	Rdto	I. C.	Nº granos/espiga	Peso 1000 granos
CHO Espigadura	1					
CHO Madurez	0,57	1				
Rdto	-0,20	-0,17	1			
IC	-0,15	-0,35	0,42	1		
Nº granos/espiga	-0,06	0,15	-0,06	-0,02	1	
Peso 1000 granos	0,06	-0,06	0,41	0,06	-0,33	1

c) Santa Rosa

	CHO Espigadura	CHO Madurez	Rdto	I. C.	Nº granos/espiga	Peso 1000 granos
CHO Espigadura	1					
CHO Madurez	0,02	1				
Rdto	-0,48	-0,39	1			
IC	-0,42	-0,02	0,67	1		
Nº granos/espiga	-0,47	0,30	0,05	-0,11	1	
Peso 1000 granos	0,44	-0,12	-0,03	0,003	-0,58	1

5. DISCUSION

5.1. Carbohidratos en antesis

Numerosos estudios han confirmado que la acumulación de carbohidratos en el tallo de cereales previo a la etapa de antesis es determinante para el llenado de granos y que esta acumulación de reservas depende tanto del ambiente como del genotipo (Schnyder, 1993; Kiniry, 1993; González *et al.* 1999; Kerepesi *et al.*, 2002; Ehdai *et al.*, 2006b; Bingham *et al.*, 2007).

Las medias obtenidas por las RCSLs (incluido el cv. Harrington) en el presente estudio, en cada una de las localidades analizadas durante el periodo de antesis, fueron significativamente diferentes: 12,84% en Cauquenes-secano y 5,08% en Santa Rosa. Evaluaciones en trigo realizadas por Reynolds *et al.* (2006), indican valores de acumulación de carbohidratos en esta etapa de desarrollo, en diferentes ambientes, que fluctuaron entre 4,9 y 26,1% en antesis.

En Cauquenes-secano, la RCSL que obtuvo la mayor concentración corresponde a la RCSL-124 (17,17%), en tanto que en Santa Rosa fue la RCSL-5 (6,99%), clasificadas como "no tolerante" y "tolerante" según respuesta a estrés hídrico. Esta marcada diferencia se explica porque en un ambiente adverso las plantas sufren una serie de modificaciones que les permiten ser más eficientes en sus procesos y adaptarse al nuevo escenario (Reynolds *et al.*, 2005). Por lo tanto, estas RCSLs, bajo condiciones de estrés hídrico, expresan su potencial genético, heredado del padre (*H. spontaneum*), de donde provendría la habilidad para acumular carbohidratos y que les permitiría sobrevivir en dichas condiciones (Grando *et al.*, 2005). Schnyder (1993), indica que la acumulación de carbohidratos es importante principalmente en localidades donde la disponibilidad de agua en los periodos de antesis y llenado de granos es limitante e indica que, rendimiento final estaría determinado en gran parte por lo que logran reservar en sus tallos.

El padre recurrente cv. Harrington presentó porcentajes de CHO en el tallo mas bajos que la mayoría de las RCSLs; sin embargo, se detectaron diferencias estadísticamente significativas solo en Cauquenes-secano, lo cual permite sugerir que en el ambiente con déficit hídrico las RCSLs son más eficientes en la acumulación de carbohidratos.

Al analizar la respuesta de las RCSLs en cada uno de los ambientes, la gran diferencia presentada en los porcentajes de acumulación, tiene cierta relación con el tamaño de los tallos (dato no medido) ya que estos son más pequeños y delgados bajo un ambiente limitante. Ehdai *et al.* (2006a), indica en estudios realizados en trigo bajo condiciones de estrés y normales, que el tallo reduce en promedio un 9% su largo y un 23% su peso bajo condición de

estrés. Estudios previos muestran que las RCSLs de cebada en Cauquenes-secano presentan ≈20% de reducción en la altura de planta, y en consecuencia un menor largo del tallo, en relación a Santa Rosa (Inostroza *et al.*, datos no publicados).

Por otro lado Kerepesi *et al.* (2002), destaca el hecho que aquellos genotipos que logran una máxima acumulación de carbohidratos, específicamente fructanos, durante el periodo de antesis poseen una mayor adaptación a sequía. Este tipo de reservas también son definidas como una capacidad buffer para la producción de granos cuando se presentan condiciones adversas para la fotosíntesis durante el llenado de granos (Schnyder, 1993; Álvaro *et al.*, 2008).

5.2. Carbohidratos a madurez fisiológica

La diferencia presentada en la concentración de carbohidratos medida en antesis y luego en madurez fisiológica, da cuenta de la capacidad de la planta para traslocar estas reservas desde el tallo hacia los granos durante el proceso de llenado, lo cual es determinado principalmente por el genotipo y el ambiente (Blum, 1998). Siendo el genotipo mucho más importante en post-antesis que en antesis (Ehdaie *et al.*, 2006b).

En Cauquenes-secano se encontró una correlación positiva entre la acumulación de CHO en antesis y en madurez fisiológica ($r=0,57$; $p<0,05$) indicando la significancia que posee la acumulación que logran las plantas en este ambiente. Por otro lado, la media obtenida por las 25 RCSL incluido el cv. Harrington en la localidad de Cauquenes-secano fue de 12,59% y para Santa Rosa 2,39%. Reynolds *et al.* (2006), analizaron la concentración de carbohidratos en tallos maduros de diferentes líneas de trigo obteniendo valores de 1,6 a 4,1%, datos que son similares a los obtenidos en este estudio en la localidad de Santa Rosa. En este ambiente, la RCSL-5 clasificada como "tolerante" al estrés, presentó el porcentaje más bajo a madurez (0,84%), en tanto que en Cauquenes-secano el porcentaje más bajo fue de 9,61%, alcanzado por las RCSL-90 y RCSL-78 ambas clasificadas como "línea de alto rendimiento en condiciones de estrés".

La localidad de Santa Rosa presenta la mayor diferencia entre lo acumulado en antesis y madurez fisiológica; sin embargo, esto no indica necesariamente que las plantas en condiciones normales sean más eficientes en la traslocación de reservas. Ehdaie *et al.* (2006b), basado en trabajos realizados en trigo, señalan que existen dos componentes relacionados con la contribución de carbohidratos solubles al llenado de granos a saber: la capacidad de las plantas de acumular asimilados en el tallo y luego la eficiencia con que son movilizados y traslocados al grano, indicando en este mismo estudio que la eficiencia de movilización aumenta bajo sequía. Bingham *et al.* (2007), realizan un estudio con cebada en diferentes años

y sitios de Gran Bretaña, en el cual evaluaron la contribución potencial de carbohidratos solubles totales al llenado de grano, observando diferencias significativas, en las medias obtenidas por los genotipos, en un rango de 11 a 45%.

La contribución de los carbohidratos desde el tallo hacia el llenado de granos, se presenta principalmente en la última etapa de este periodo como una forma de suplir la disminución de la tasa fotosintética que realiza la planta, ya que bajo condiciones de sequía la tasa de asimilados disminuye significativamente, no así en condiciones de riego donde esta producción continúa durante todo el periodo de llenado de grano (Bingham *et al.*, 2007). El rol de la hoja bandera es determinante, ya que es ella la responsable de gran parte de los asimilados que van al grano, en tanto bajo condiciones de estrés esta no cumple su función (Verma *et al.*, 2004).

El análisis de la respuesta del testigo, cv. Harrington, mostró en la localidad de Santa Rosa, diferencias significativas entre este genotipo y algunas RCSLs, la mayoría clasificadas como "susceptibles". Igualmente este grupo fue el que obtuvo los mayores valores en acumulación de carbohidratos en ambos estados y ambientes, indicando que si bien fueron más eficientes en la acumulación de reservas antes de anéxsis, luego la posterior entrega al llenado de granos fue mínima. En tanto las RCSLs correspondientes al grupo de "tolerantes", fueron las que mostraron una mayor diferencia entre las mediciones, lo que sugiere una mayor eficiencia en la movilización.

5.3. Rendimiento y sus componentes

La eficacia de las plantas en los diversos procesos que realizan y que les permiten sobrevivir en condiciones adversas se mide a través del rendimiento final. Los ambientes considerados en este estudio presentaron claras diferencias en la variable rendimiento cuyas medias en la zona de Cauquenes-secano y Santa Rosa fueron de 225,56 y 624,91 gm⁻², respectivamente.

El periodo de llenado de granos es determinante en el rendimiento (Shakhatreh *et al.*, 2001); si las plantas son expuestas a estrés hídrico durante esta etapa, la interacción genotipo/ambiente adquiere gran significancia (Sinebo, 2005). En tanto que la disminución del rendimiento bajo condiciones de estrés hídrico obedece a una serie de factores que disminuyen el potencial de acumulación de materia seca y limitan con ello el rendimiento potencial (Vazifedoust *et al.*, 2008)

Por otra parte el índice de cosecha, factor que está directamente relacionado con el rendimiento, presentó una correlación significativa en Cauquenes-secano $r=0,41$ y Santa Rosa $r=0,67$ ($p<0,05$). Richards *et al.* (2002), indican que en condiciones de sequía el índice de

cosecha depende en gran medida de la disponibilidad de agua durante el llenado de grano y de otros factores como la partición de carbohidratos en pre-antesis (estructurales y solubles); En lugares con baja disponibilidad de agua, el índice de cosecha depende del uso de este recurso por las plantas en el periodo de post- antesis.

Al comparar la agrupación de RCSLs según su respuesta a estrés hídrico con el cv. HA en la variable rendimiento, en Santa Rosa fue donde se presentaron las mayores diferencias estadísticas, lo que concuerda por lo descrito por Inostroza *et al.* (2007), coincidiendo en las RCSLs n° 103-116-124-140 clasificadas como “no tolerante” (sensibles). En este mismo estudio se observaron diferencias entre las temporadas 2004-2005 y 2006-2007 en la misma variable rendimiento, lo que coincide con lo reportado por Bingham *et al.* (2007), en el sentido que no solo la localidad y genotipo son importantes sino también la temporada (año). En tanto en la localidad de Cauquenes-secano ningún grupo superó al cv. Harrington, coincidiendo en parte por lo descrito por Inostroza *et al.* (2007), donde las RCSLs no obtuvieron valores de rendimiento superiores al cv. Harrington.

5.4. Carbohidratos y rendimiento

Varios autores han realizado una estimación del aporte que significan las reservas de carbohidratos en el tallo de cereales y su posterior movilización al llenado de granos. Entre ellos, Richards *et al.* (2002), realizaron ensayos con cereales en ambientes con déficit de agua. Luego, para establecer la relación entre movilización de reservas desde tallo y hojas hacia el grano durante el periodo de llenado, pesaron el tallo en las etapas de antesis y madurez fisiológica, lo cual le permitió obtener correlaciones de hasta $r^2 = 0,65$ ($p < 0,01$). En tanto en el presente estudio no se obtuvo una correlación significativa entre movilización de carbohidratos, presentada como CHO-madurez, y rendimiento en los ambientes contrastantes; Cauquenes-secano y Santa Rosa.

Por otro lado Richards *et al.* (2002), estimaron que los carbohidratos son traslocados en forma de sucrosa y que pueden llegar a representar hasta un 50% del rendimiento final.

La RCSL-5 destacó en Santa Rosa por presentar el porcentaje de acumulación de carbohidratos más alto en etapa de espigadura (6,99%), sin embargo, esto no se reflejó en el rendimiento final donde alcanzó $549,97 \text{ g m}^{-2}$, ubicándose bajo la media de las RCSLs ($621,95 \text{ gm}^{-2}$); dicha línea se encuentra dentro del grupo de las “tolerantes” como “muy tolerante” a condición de estrés. En Cauquenes-secano, esta misma línea tuvo 14,51% en espigadura y 12,98% en madurez, alcanzando un rendimiento de $251,25 \text{ gm}^{-2}$ (ubicándose sobre la media de las RCSLs ($223,67 \text{ gm}^{-2}$). Esta situación permitiría sugerir que tanto el genotipo como el ambiente cumplen un rol determinante en todas las variables analizadas.

La RCSL-90 se destacó en Cauquenes-secano con 14,55% de CHO en espigadura y por presentar un alto nivel de traslocación (9,61% en madurez). Esta línea está clasificada como de "alto rendimiento en condiciones de estrés", alcanzando un rendimiento de 209,5 gm⁻². También en Santa Rosa, esta línea presentó un alto nivel de traslocación con 4,1% de CHO en espigadura y 1,7% en madurez; el rendimiento fue de 652,07 gm⁻², bajo las condiciones de esta temporada esta línea no obtuvo mayor respuesta a la condición de estrés.

6. CONCLUSIONES

La concentración de carbohidratos en el tallo representada por las plantas sometidas a estrés hídrico, fue significativamente mayor que la encontrada en plantas desarrolladas bajo condiciones de alta disponibilidad hídrica. Por ello el genotipo como el ambiente influyen en el comportamiento de cada individuo; sin embargo, no fue posible definir bajo cual ambiente la traslocación de estas reservas fue más eficiente.

Tanto el cv. Harrington como las líneas RCLS expresan su máximo potencial productivo en la localidad de Santa Rosa, por lo anterior, es en esta localidad donde se observaron las mayores diferencias significativas en rendimiento. Por otro lado, en el ambiente con déficit hídrico, Cauquenes-secano, se favoreció la expresión de características relacionadas con tolerancia a estrés hídrico, aunque los rendimientos obtenidos son muy inferiores a los observados en Santa Rosa.

Las reservas de carbohidratos acumuladas por las plantas en el periodo previo a la anthesis son determinantes durante la etapa de llenado de granos, lo cual se refleja en el rendimiento final. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación corresponden a una temporada, lo cual no permite establecer una relación directa entre dicha traslocación y rendimiento; para ello sería recomendable repetir estas evaluaciones al menos una temporada más.

La interacción genotipo x ambiente no tuvo una influencia significativa sobre la expresión de las variables consideradas en este estudio, sin embargo tanto genotipo como ambiente de manera independiente, son altamente determinantes en la expresión de las características relacionadas con tolerancia que permiten a estas líneas expresar al máximo su potencial productivo.

Los componentes del rendimiento, destaca número de granos por espiga, que fue mayor en Cauquenes-secano, indicando que plantas sometidas a estrés necesitan asegurar la supervivencia de la especie.

7. REFERENCIAS

Álvaro F.; Isidro J.; Villegas D.; García del Moral L. and Royo C., 2008. Breeding effects on grain filling, biomass partitioning, and remobilization in mediterranean durum wheat. *Agronomy Journal*. 100:361–370.

Australian Government, 2008. *The Biology of Hordeum Vulgare L. (Barley)*. Department of Health and Ageing, Office of the Gene Technology Regulation, 44 p.

Bengtsson B., 1992. Barley genetics. *Trends in Genetics* 8: 3–5.

Beratto-Medina E., 2001. Cebada y Avena pp 577-584. En: *Agenda del Salitre*. Sociedad Química y Minera de Chile S.A., undécima Edición, Santiago-Chile.

Bingham I. J.; Blake J.; Foulkes M. J. and Spink J., 2007. Is barley yield in the UK sink limited? Post-anthesis radiation interception, radiation-use efficiency and source–sink balance. *Field Crops Research* 101: 198–211.

Blum A., 1998. Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilisation. *Euphytica* 100: 77–83.

Bonnett G.D. and Incoll L.D., 1993. Effects on the stem of winter barley of manipulating the source and sink during grain- filling. II. Changes in the composition of water-soluble carbohydrates of internodes. *Journal of Experimental Botany* 44: 83 – 91.

De-Long Y.; Rui-Lian, J.; Xiao –Ping C. and Wei L., 2007. Identification of quantitative trait loci and environmental interactions for accumulation and remobilization of water-soluble carbohydrates in wheat (*Triticum aestivum* L.) stems. *Genetics Society of America* 176: 571–584.

Dirección general de aeronautica civil dirección meteorologica de Chile (DGAC), 2008, Climas de Chile, (En línea), disponible en Internet: www.meteochile.cl/climas/climas_septima_region.html. Citado Agosto 4, 2008.

Ehdaie B.; Alloush G. A.; Madore M. A. and Waines J. G., 2006a. Genotypic variation for stem reserves and mobilization in wheat: I. Postanthesis changes in internode dry matter. *Crop Science*. 46:735–746.

Ehdaie B.; Alloush G. A.; Madore M. A. and Waines J. G., 2006b. Genotypic variation for stem reserves and mobilization in wheat: II. postanthesis changes in internode water-soluble carbohydrates. *Crop Science* 46: 2093–2103.

Ellis R.P.; Foster B.P.; Robinson D.; Handley L.L.; Gordon D.C.; Russell J.R. and Powell W., 2000. Wild barley: a source of genes for crop improvement in the 21st century, *Journal of Experimental Botany*. 51: 9 – 17.

Faiguenbaum H., 2003. Cebada: pp.107-133. En: *Labranza, Siembra y Producción de los Principales Cultivos de Chile*. Ograma S.A. Santiago-Chile.

Finlay K. and Wilkinson G., 1963. The analysis of adaptation in a plant-breeding program. *Australian Journal of Agricultural Research* 14, 342-354.

Fischer R. and Maurer R., 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. *Australian Journal of Agricultural Research* 29: 897-905.

Gebbing T. and Schnyder H., 1999. Pre-Anthesis Reserve Utilization for Protein and Carbohydrate Synthesis in Grains of Wheat. *Plant Physiology* 121: 871–878.

González A.; Martín I. and Eyerbe L., 1999. Barley yield in water-stress conditions. The influence of precocity, osmotic adjustment and stomatal conductance. *Field Crops Research* 62: 23-34.

Gooding M.; Ellis R.; Shewry P. and Schofield J., 2003. Effects of restricted water availability and temperature on the grain filling, drying and quality of winter wheat. *Journal of Cereal Science* 37:295-309.

Grando S.; Baum M.; Ceccarelli S.; Goodchild A.; Jaby F.; Jahoor A. and Backes G., 2005. QTLs for straw quality characteristics identified in recombinant inbred lines of a *Hordeum vulgare* x *H. spontaneum* cross in a Mediterranean environment. *Theor. Appl. Genet.* 110: 688–695.

Hori K.; Sato K.; Nankaku N. and Takeda K., 2005. QTL analysis in recombinant chromosome substitution lines and doubled haploid lines derived from a cross between *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* and *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*. *Molecular Breeding* 16: 295–311.

Inostroza L; del Pozo A.; Matus I. and Hayes P., 2007. Drought tolerance in recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) derived from the cross *Hordeum vulgare* Subsp. *spontaneum* (Caesarea 26-24) x *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* cv. Harrington. *Agricultura Técnica*. 67(3):253-261.

Kerepesi II.; Bányai-Stefanovits É. and Galiba G., 2002. Fructans in wheat under stress conditions. *Acta Biologica Szegediensis Hungary* 46(3-4):101-102.

Kiniry J.R., 1993. Nonstructural carbohydrate utilization by wheat shaded during grain growth. *Agronomy Journal* 85: 844-849.

Matus I.; Corey A.; Filichkin T.; Hayes P.M.; Vales M.I.; Kling J.; Riera-Lizarazu O.; Sato K.; Powell W. and Waugh R., 2003. Development and characterization of recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) using *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* as a source of donor alleles in a *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* background. *Genome* 46: 1010–1023.

Morcuende R.; Kostadinova S.; Pérez P. and Martínez-Carrasco R., 2005. Fructan synthesis is inhibited by phosphate in warm grown, but not in cold-treated, excised barley leaves. *New Phytologist* 168: 567–574.

Nagaraj V., Altenbach D., Galati V., Lüscher M., Meyer A., Boller T. and Wiemken A., 2004. Distinct regulation of sucrose: sucrose-1-fructosyl transferase (1-SST) and sucrose: fructan-6-fructosyltransferase (6-SFT), the key enzymes of fructan synthesis in barley leaves: 1-SST as the pacemaker. *New Phytologist* 161: 735–748.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), 2008. Superficie regional sembrada de cultivos anuales (IV a X región) (hectáreas) (en línea). Disponible en Internet: www.odepa.cl, citado Julio 10, 2008.

Reynolds M.; Mujeeb-kazi A. and Sawkins M., 2005. Prospects for utilising plant-adaptive mechanisms to improve wheat and other crops in drought- and salinity – prone environments. *Annals of Applied Biology* 146: 239-259.

Reynolds M.; Dreccer F. and Trethowan R., 2006. Drought-adaptive traits derived from wheat wild relatives and landraces. *Journal of Experimental Botany*, 21: 1-10.

Richards R. A.; Rebetzke G. J.; Condon A. G. and van Herwaarden A. F. 2002. Breeding opportunities for increasing the efficiency of water use and crop yield in temperate cereals. *Crop Science*. 42:111–121.

Ruuska S.; Lewis D.; Kennedy G.; Furbank R.; Jenkins C. and Tabe L. 2008. Large scale transcriptome analysis of the effects of nitrogen nutrition on accumulation of stem carbohydrate reserves in reproductive stage wheat. *Plant Molecular Biology* 66: 15- 32.

SAS. 1999. The SAS system for windows V802. SAS Institute. Inc., Cary, North Carolina, USA.

Schnyder H., 1993. The role of carbohydrate storage and redistribution in the source-sink relations of wheat and barley during grain filling- a review. *New phytologist* 123: 233-145.

Shakhathreh Y.; Kafawin O.; Ceccarelli S. and Saoub H. 2001. Selection of barley lines for drought tolerance in low-rainfall areas. *J. Agronomy & Crop Science* 186: 119-127.

Sinebo W. 2005. Trade off between yield increase and yield stability in three decades of barley breeding in a tropical highland environment. *Field Crops Research* 92: 35–52.

Sorrells M.E. and Wilson W.A. 1997. Direct classification and selection of superior alleles for crop improvement. *Crop Science* 37: 691–697.

St. Martin S.K.; Lewers K.S.; Pamer R.G. and Hedges B.R., 1996. A testcross procedures for selecting exotic strains to improve pure-line cultivars in predominantly self-fertilizing species. *Theor. Appl. Genet.* 92: 78–82.

Taiz L. and Zeiger E., 2006. *Stress Physiology, Water deficit and drought tolerance* pp 672-680. En: *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Third Edition. Sunderland, Massachusetts.

Turpeinen T.; Kulmala J. and Nevo E., 1999. Genome size variation in *Hordeum spontaneum* populations. *Genome* 42: 1094–1099.

Vazifedoust M.; van Dam J.C.; Feddes R.A. and Feizi M., 2008. Increasing water productivity of irrigated crops under limited water supply at field scale. *Agricultural Water Management* 95: 89 – 102.

Verma V.; Foulkes M.J.; Worland A.J.; Sylvester-Bradley R.; Caligari P.D.S. and Snape J.W., 2004. Mapping quantitative trait loci for flag leaf senescence as a yield determinant in winter wheat under optimal and drought-stressed environments. *Euphytica* 135: 255–263.

Xue G.; McIntyre C.; Jenkins C.; Glassop D.; van Herwaarden A. and Shorter R., 2008. Molecular dissection of variation in carbohydrate metabolism related to water-soluble carbohydrate accumulation in stems of wheat. *Plant Physiology* 146: 441–454.

8. ANEXOS

Anexo 1

Clasificación de las 25 líneas RCSL según respuesta a estrés hídrico, por Inostroza *et al.* (2007)

Nº	LÍNEA RCSLs	CLASIFICACIÓN
1	Harrington	Padre cultivado
2	5-RCSL	Muy tolerante
3	130-RCSL	Tolerante
4	8-RCSL	Tolerante
5	95-RCSL	Tolerante
6	102-RCSL	Tolerante
7	45-RCSL	Tolerante
8	41-RCSL	Tolerante
9	42-RCSL	Tolerante
10	140-RCSL	No tolerante
11	116-RCSL	No tolerante
12	103-RCSL	No tolerante
13	124-RCSL	No tolerante
14	89-RCSL	No tolerante
15	117 RCSL	Línea de alto rendimiento en condición de estrés
16	82 RCSL	Línea de alto rendimiento en condición de estrés
17	4 RCSL	Línea de alto rendimiento en condición de estrés
18	90 RCSL	Línea de alto rendimiento en condición de estrés
19	115 RCSL	Línea de alto rendimiento en condición de estrés
20	81 RCSL	Línea de alto rendimiento en condición de estrés
21	78 RCSL	Línea de alto rendimiento en condición de estrés
22	76 RCSL	Línea de alto rendimiento en condición de estrés
23	53 RCSL	Línea de alto rendimiento en condición de estrés
24	2 RCSL	Línea de alto rendimiento en condición de estrés
25	10 RCSL	Línea de alto rendimiento en condición de estrés

POTOCOLO PARA DETERMINAR CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS SEGUN METODO ANTRONA.

1. Congelar eppendorf en nitrógeno líquido indicando el número de muestra en tapa y pared.
2. Pesar y tarar. Volver a ponerlo en nitrógeno y agregar los mg de muestra (entre 100-150 mg de material vegetal macerado). Pesar el eppendorf con la muestra (anotando el peso exacto en el cuaderno de laboratorio). Luego agregar 1 ml de **etanol 80% + 10 mM Hepes-KOH PH=7,5** lentamente, homogenizar con vortex y poner en hielo. De este modo se podrán ir procesando todas las muestras y se colocarán todas simultáneamente en el bloque térmico.
3. Incubar en bloque térmico 80°C/20 min. **Importante:** sobre los tubos poner algo pesado porque pueden abrirse.
4. Una vez incubados, centrifugar 10 min/1300 rpm. Retirar el sobrenadante y acumularlo en un falcon de 15 ml. **Importante:** evitar arrastrar residuos.
5. Añadir 1 ml de **etanol 80% + 10 mM Hepes-KOH PH=7,5 a cada uno de los eppendorfs**, homogenizar en vórtex e incubar nuevamente 80°C/20 min y centrifugar 10min/1300 rpm.
6. Retirar sobrenadante, agregarlo al falcon de 15 ml. **Importante:** evitar arrastrar residuos
7. Agregar a los eppendorf 1 ml de **etanol 50% + 10 mM Hepes-KOH PH=7,5**, homogenizar en vórtex e incubar 80°C/20 min en bloque térmico. Centrifugar 10min/1300 rpm, retirar sobrenadante y transferirlo al falcon 15 ml con los anteriores extractos. **Importante:** evitar arrastrar residuos
8. Finalmente, añadir a cada uno de los eppendorfs 1 ml de agua tamponada con Hepes, en concreto la solución denominada 10 mM Hepes-KOH pH=7,5, homogenizar en vórtex e incubar 20 min/80°C. Tras centrifugar durante 10 minutos recuperar el sobrenadante en falcon de 15 ml. **Importante:** la última extracción se hace con agua para arrastrar los carbohidratos de elevado peso molecular que hayan quedado retenidos en el material vegetal, en el caso concreto de la cebada, particularmente fructanos.

9. Al final del proceso de extracción etanólica tendremos del orden de 4 ml de extracto etanólico en el que se podrán valorar los carbohidratos solubles.

Los **extractos etanólicos** para determinación de carbohidratos se podrán almacenar a **-20°C**, previa homogenización con el vortex tras las extracciones sucesivas a partir del material vegetal y transferencia a eppendorfs que permitirán una mejor ordenación de muestras durante el almacenaje a -20 °C.

PROTOCOLO DE CURVA DE CALIBRACIÓN Y RECTA DE CALIBRADO CON GLUCOSA

Glucosa 100mM:

Preparación del estándar de Glucosa para la recta de calibrado con la antrona:

Dilución glucosa 100 mM:

5ml [100 mM] de HEPES

32,5 ml etanol

Agua destilada

Volumen total = 50ml

Etanol 65%, 10mM HEPES [100 mM]

Se preparará una solución Stock de glucosa de concentración 100 mM 180,16 mg en 10 ml (peso molecular de la glucosa 180,16, la glucosa empleada ha sido la D-(+) glucosa, sigma ultra 99,5% identificada con el nombre de A. Moya, código: G7528-250g).

Como los extractos etanólicos procedentes de los tallos de cebada han sido extraídos dos veces con etanol al 80%, 1 vez con etanol al 50% y la última extracción se ha realizado con 10 mM hepes, significa que la concentración final de etanol en los extractos es del 65 %. Por este motivo para que el estándar de glucosa se encuentre en las mismas condiciones que las muestras, la glucosa en vez de disolverse en agua se disolverá en etanol al 65% (el modo de preparar el etanol al 65% se detalla arriba y el resto de los etanoles bien al 80 o al 50% se prepararán de modo similar aunque las cantidades de etanol y agua variarán en cada uno de ellos).

Glucosa 10mM: 100µl (glucosa 100mM)+900 µl etanol 65%

Glucosa 5mM: 250 µl etanol + 250 µl glucosa 10 mM

1. Se numerarán los eppendorfs con las concentraciones deseadas en tapa y pared y se añadirán las siguientes cantidades de glucosa (pipeteadas con pipeta P20) y de etanol al 65% (pipeteado con una P100). De este modo el volumen final será 100 μ l y luego la antrona se añadirá en una cantidad 10 veces superior.

CONCENTRACIÓN	GLUCOSA	ETANOL 65%
0		100 μ l
0,25	5 μ l (5mM)	95 μ l
0,5	10 μ l (5mM)	90 μ l
0,75	15 μ l (5mM)	85 μ l
1	10 μ l (10mM)	90 μ l
1,5	15 μ l (10mM)	85 μ l
2	20 μ l (10mM)	80 μ l

2. Una vez dispuestas las cantidades de etanol y glucosa adecuadas en los eppendorfs se agregará 1ml (1000 μ l) de antrona a cada uno de ellos.
3. Incubar 80°C/20 min en bloque térmico
4. Poner 15 min en hielo
5. Atemperar el extracto durante 10 min a T° ambiente
6. Medir las absorbancias en espectrofotómetro a 620 nm, empleando cubetas de vidrio, tanto en la referencia como en la celda de medida de muestra. En la celda de referencia, se colocará el blanco con el que se medirán las muestras. En este caso será 1 ml de etanol 65%. A continuación se realizará un autocero del aparato. Los estándares se medirán de menor a mayor concentración en la celda número 2 del espectrofotómetro, anotándose la absorbancia obtenida para realizar la recta de calibración. Tener precaución de manipular la antrona con cuidado para no quemarse ni dañar el equipo de trabajo. Colocar gran cantidad de papeles para recoger los restos de antrona entre medidas por capilaridad.

PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DEL REACTIVO ANTRONA

Mezclar 750 mg de antrona, 430 ml de ácido sulfúrico concentrado y 100 ml de agua.

Se pesa la antrona y se mide en probeta la cantidad de sulfúrico necesaria bajo la vitrina extractora, midiéndose también la cantidad de agua según receta. A continuación se prepara la mezcla sulfúrico-agua en un vaso precipitado vertiendo paulatinamente el ácido sobre el agua, al tratarse de una reacción muy exotérmica se realizará en un baño de hielo sobre agitador magnético. En la preparación del reactivo es necesario tener precaución de que la mezcla sulfúrico/agua esté bien fría pues de lo contrario al añadir la antrona puede ocurrir un cambio del color amarillo. Para ello es aconsejable poner un baño de hielo sobre un agitador magnético en cuyo interior se colocará el erlenmeyer con el H_2SO_4 y H_2O . Se mantendrá en agitación y se renovó el hielo tantas veces como sean necesarias hasta asegurar que la mezcla esté bien fría (mantener varias horas en hielo). Será entonces cuando se añadirá la antrona, agitándose hasta su completa disolución. La cantidad del reactivo se observará por su color amarillo transparente. Es necesario considerar que el reactivo envejece con el tiempo, no siendo aconsejable utilizarlo después de dos semanas desde su preparación (el mejor método de almacenamiento será cubrir el erlenmeyer con un parafilm, colocarlo en una caja y mantenerlo en un armario alejado de la luz).

PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS PROCEDENTES DE TALLOS DE CEBADA, PARA LA VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES POR EL MÉTODO DE LA ANTRONA.

1. De cada muestra tenemos 4 ml de extracto etanólico almacenado a -20 °C hasta el momento de la valoración de los carbohidratos. Este extracto tras su homogenización ha sido fraccionado en eppendorfs.
 2. Se tomará un eppendorf por muestra y se colocará en hielo. Al sacarse de -20 °C se puede apreciar que el extracto muestra un aspecto turbio con pigmentos y materiales floculados en su interior. Deberá de homogeneizarse la muestra con el vortex y tras la homogenización, se centrifugará durante 2 minutos a máxima velocidad. El extracto perfectamente clarificado se empleará en la valoración de carbohidratos.
 3. Hemos hecho pruebas con la antrona en los extractos de cebada y debido a la intensa coloración verde obtenida con la antrona, hemos tenido que realizar diluciones de las muestras. Habiéndose comprobado que la dilución de 30 veces nos genera una coloración perfectamente ajustada a la coloración obtenida en la recta de calibración.
 4. Para diluir las muestras 30 veces el modo de proceder será el siguiente: Tomar 40 µl del extracto etanólico original y añadirlo a un eppendorf con 1160 µl de etanol al 65% (adicionar dos veces 580 µl de etanol al 65%), de este modo la cantidad final de extracto será 1200 µl.
 5. Del extracto diluido y homogenizado con el vortex se tomará una alícuota de 100 µl para la valoración de los carbohidratos con la antrona.
 6. A los 100 µl de extracto diluido se añadirá 1 ml de antrona.
 7. Se incubará la muestra a 80 °C durante 20 minutos.
 8. Dejar enfriar en hielo durante 15 minutos.
 9. Atemperar la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente para proceder con posterioridad a medir la absorbancia a 620 nm frente al blanco de etanol al 65 % del mismo modo al descrito en la curva de calibración.
- Anotar la absorbancia obtenida para cada una de las muestras. Los datos de absorbancia obtenidos nos permitirán obtener la concentración de carbohidratos según la recta de calibrado.

Anexo 6

Medias de 24 RCSLs para CHO-espigadura, CHO-madurez, rendimiento, índice de cosecha, número de granos por espiga y peso de los 1000 granos, indicando con (*) los que obtuvieron diferencias significativas con el padre recurrente Harrington (HA). Se incluye media de las 24 RCSLs por ambiente a) Cauquenes-secano, b) Santa Rosa.

a)

RCSLs	%CHO Espigadura	%CHO Madurez	Rendimiento (g/m ²)	IC	Nº granos/espiga	Peso 1000 granos (g)
HA	9,88	11,68	270,75	0,32	28,95	44,17
Media	12,96	12,63	223,67	0,31	26,15	45,38
10	12,46	11,33	210,50	0,31	25,53	46,16
102	11,82	10,11	241,75	0,29	26,85*	42,48
103	13,41	12,09	200,00	0,36	29,83	41,04
115	12,79	14,20	246,75	0,29	26,63	42,63
116	13,04	15,93	256,50	0,31	28,13	43,96
117	12,15	10,74	195,75	0,28	28,98	43,91
124	17,18**	16,25*	215,75	0,31	23,18	45,00
130	13,52	11,56	209,50	0,30	24,80**	43,51
140	13,28	14,14	263,50	0,31	29,33**	47,88
2	12,37	12,39	211,75*	0,33	29,43	46,18
4	13,67	13,81	194,75	0,30	30,35	42,88
41	11,17	10,61	220,00	0,37	23,90	47,78
42	15,58*	15,42	207,50*	0,25	26,90	44,69
45	12,19	12,72	166,75	0,26	23,50	43,01
5	14,51*	12,99	251,25	0,33	26,53	45,36
53	11,93	12,53	190,75	0,33	27,78	42,59
76	13,04	11,35	239,50	0,37	19,75	47,81
78	10,16	9,62	320,75	0,32	23,13*	48,41
8	13,18	12,78	256,25	0,31	24,55	64,57
81	10,43	12,10	260,50	0,43	27,20	41,94
82	13,42	12,67	242,75	0,33	22,40	48,69
89	11,47	13,78	121,75	0,24	24,83	40,33
90	14,56*	9,62	209,50	0,37	26,48	43,49
95	13,85	12,94	234,50	0,35	27,85	44,96

b)

HA	4,43	3,64	695,83	0,54	25,45	53,65
Media	5,11	2,34	621,95	0,50	23,66	54,30
10	6,97*	2,14	568,75**	0,52	20,00**	69,00**
102	4,75	2,21	667,70	0,48	24,35	54,60
103	4,50	1,78	680,20	0,53	23,75	54,28
115	5,34	3,86	664,58	0,55	23,00	52,98
116	4,72	2,40	725,00	0,54	24,43	52,53
117	5,41	1,52	602,08**	0,43*	26,33	53,38
124	5,57	4,33	543,75***	0,49	24,13	54,58
130	5,27	2,03	663,53	0,53	24,80	53,30
140	5,61	2,66	607,30**	0,48	23,00	64,65*
2	4,84	1,97	542,70**	0,47	23,13	54,25
4	5,36	2,96	669,80	0,49	25,33	52,63
41	6,03	1,00*	592,73**	0,48	21,05*	52,40
42	6,22	3,13	540,65**	0,51	24,65	51,93
45	3,99	1,48	690,63	0,56	23,70	48,83
5	7,00	1,98	549,98**	0,45*	23,85	53,50
53	4,67	5,05	561,45**	0,54	24,65	51,90
76	6,86	0,84*	689,58	0,53	18,23***	59,53
78	2,93	1,50	705,20	0,52	22,98	54,03
8	4,46	2,57	631,23*	0,46	25,60	50,85
81	4,93	0,94*	652,08	0,52	24,88	52,73
82	4,07	3,06	626,05	0,58	23,70	53,75
89	5,58	3,58	401,05***	0,40**	23,60	50,70
90	4,12	1,75	652,08	0,54	24,00	52,68
95	2,93	1,26*	698,95	0,55	24,85	54,40

***p<.0001; ** p<.009-.0001; * p<.05 Diferencias estadísticamente significativas con el padre recurrente Harrington (HA)