

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



Evaluación de la tolerancia a estrés por sequía en cuatro genotipos naturalizados de vid (*Vitis vinifera*) provenientes del norte de Chile.

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

CLAUDIA LORETO BAVESTRELLO RIQUELME

PROFESOR GUÍA: DR. ANDRÉS ZURITA SILVA

TEMUCO- CHILE

2013

Agradecimientos

A quienes primero quiero agradecer, es a mi familia. Sin su apoyo, cariño y fuerza desde mi lindo sur, no lo hubiera logrado. Gracias madre mía por los consejos y tu sabiduría; gracias Monito por las llamadas nocturnas para darme ánimo y la confianza de que podía y mil gracias hermanito, eres único e inigualable, sin las largas y reídas conversaciones telefónicas, todo hubiera sido más difícil aún.

Las cosas no han sido fáciles, pero nadie dijo que la vida lo era. Este ha sido un proceso largo, complicado, pero debo destacar que de gran crecimiento y maduración personal. Lo cual me hace sentirme orgullosa de mí por haberlo logrado.

Esta tesis es el resultado de mucho trabajo, ganas y esfuerzo, además de la colaboración de mucha gente linda que me recibió y me ofreció apoyo y amistad. No podría mencionar uno por uno a todos los que aportaron con su granito de arena en esta tesis, porque es probable que fuesen más hojas en agradecimientos que en contenido, pero si quiero destacar a algunos que tuvieron que soportarme de sobremanera, gracias a: Euge, Barbarita, Jota, Negro, Tere, Ro y por su puesto a Andrés Zurita que fue tutor, guía y amigo en este proceso, gracias por las peleas, las risas, las conversaciones y los consejos. Muchas gracias a todos por aguantarme... sé que no fue fácil.

Toda esta labor no se hubiera podido realizar sin un grupo de trabajo... Así es que muchas gracias Male, Marisol, Andre, Rasmé, Lore, Leo y Rodri. Las risas, las conversaciones y la compañía, por largas horas de trabajo en el lab, se agradecen. Gracias al CEAZA que me permitió conocer mucha gente y hacer agradable el trabajo.

Y por último, pero jamás menos importante, gracias a mis amigos. Que, desde lejos, jamás me dejaron e hicieron todo para poder vernos cuando se dieron las oportunidades. Muchas gracias a mis amigos de la "U" por jamás dejarme con una duda en el chat y ayudarme en tantas cosas..., son secos como biotecnólogos y les deseo lo mejor. A mis amigos de la vida que, en ya 20 años juntos, son mis hermanos y a mi familia, que espero seguir manteniendo por siempre: Ustedes son los mejores, así es que sigan igual de exitosos y bellos.

Gracias a todos por el apoyo, el cariño y la confianza... se viene otra tesis, así es que espero el mismo y más apoyo, otra vez, en unos años.

Abrazos

Clau.

Evaluación de la tolerancia a estrés por sequía en cuatro genotipos naturalizados de vid (*Vitis vinifera*) provenientes del norte de Chile

Evaluation of drought stress tolerance in four naturalized grapevine genotypes (Vitis vinifera) from northern Chile

Claudia Bavestrello-Riquelme^{1,5}, Loreto Cavieres¹, Jorge Gallardo¹, Antonio Ibacache^{1,2}, Nicolás Franck^{3,4}, Andrés Zurita-Silva^{1,*}

RESUMEN

El cultivo de la vid (*Vitis vinifera*) se caracteriza por sufrir sequías estacionales en la mayoría de las regiones productoras, situación que se incrementa en ambientes áridos y semiáridos de Chile, los cuales han sufrido disminuciones de precipitaciones y prolongados periodos de sequía, siendo una de las principales problemáticas que afectan la productividad de las vides en el norte del país. El objetivo planteado fue analizar las respuestas morfo-fisiológicas en genotipos naturalizados de vides expuestas a estrés hídrico y determinar su nivel de tolerancia. Se evaluaron parámetros fisiológicos y arquitecturales en cuatro genotipos de vides (10, 93, 134, 148), provenientes de un gradiente latitudinal en zonas áridas y semiáridas del norte de Chile (18°S a 32°S). Mediante el uso de un sistema de mini-rizotronos, material clonal de los cuatro genotipos fue sometido a tratamientos de estrés hídrico leve y severo (60% y 40% de capacidad de campo, respectivamente), durante tres meses, bajo un diseño completamente aleatorio. Se obtuvieron diferencias significativas a nivel de tratamientos para la sobrevivencia y longitud de tallo, distancia entrenudos y todos los parámetros de desempeño fisiológico evaluados. Asimismo, se obtuvieron diferencias significativas entre los genotipos en caracteres de longitud de raíz, distancia entrenudos, fotosíntesis y potencial hídrico. Ello permitió identificar genotipos anisohídricos como 134 y 148, de genotipos isohídricos, como 10 y 93 en relación al comportamiento de respuesta al estrés. La determinación de efectos tempranos de la sequía en desarrollo, sobrevivencia, y desempeño fisiológico, permitió diferenciar al genotipo 134 como el más tolerante de los evaluados. La metodología utilizada permitirá seleccionar nuevos genotipos para uso potencial como portainjertos o injertos en zonas áridas y semiáridas, subrayando el rol fundamental de explorar la variabilidad genética de vides y su uso como cultivo modelo.

Palabras clave: estrés hídrico, desarrollo radical, respuestas fisiológicas, *Vitis vinifera*.

ABSTRACT

The grapevine (*Vitis vinifera*) is grown and characterized by seasonal drought suffered in most of the world's producing regions, a situation that increases in arid and semiarid regions of Chile, which have experienced declines in rainfall and prolonged dry periods, one of the main problems that affect the productivity of the vines in these regions. The research aim was to analyze the morpho-physiological responses of naturalized grapevine genotypes exposed to water stress and determine their level of tolerance. Physiological and architectural parameters were evaluated in four grapevine genotypes (10, 93, 134, 148), collected from a latitudinal gradient in arid and semi-arid northern Chile (18° SL to 32° SL). By using a system of mini-rhizotrons, clonal material of the four genotypes was subjected to mild and severe (60% and 40% field capacity, respectively), water stress treatments during three months under a fully randomized design. Significant differences were obtained at treatment's level for survival and stem length, internode distance and all physiological performance parameters evaluated. Furthermore, there were significant differences between genotypes in traits such as root length, internode distance, photosynthesis and water potential. This allowed identifying anisohydric genotypes such as 134 and 148, from near isohydric genotypes, such as 10 and 93 in relation to the stress response behaviour. Determination of early drought effects in development, survival, and physiological performance, allowed differentiating genotype 134 as the most tolerant of those assessed. This methodology will enable to select new genotypes for potential use as rootstocks or grafts for arid and semi-arid regions, emphasizing the fundamental role of exploring the grapevine genetic variability and its use as a crop model.

Key words: water stress, root development, physiological performance, *Vitis vinifera*.

- ¹ Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA), Universidad de La Serena, Av. Raúl Bitrán s/n, La Serena, Chile.
- ² Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro de Investigación Intihuasi, Colina San Joaquín s/n, La Serena, Chile.
- ³ Centro de Estudios de Zonas Áridas, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Casilla 129, Coquimbo, Chile.
- ⁴ Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chile.
- ⁵ Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera, Av. Francisco Salazar 1145, Temuco, Chile.
- * Corresponding author. Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA), Universidad de La Serena, Av. Raúl Bitrán s/n, PO Box 554, La Serena, Chile. E-mail address: andres.zurita@ceaza.cl. Tel +5651204378; fax +5651334741.

Fecha de Recepción: 12 Julio, 2012.

Fecha de Aceptación: 4 Octubre, 2012.

Introducción

En Chile, la producción de vides se realiza entre las regiones de Arica-Parinacota y Los Lagos, siendo el principal frutal de exportación de Chile al mundo, con un 16,9% del total de las exportaciones frutícolas (ODEPA, 2012). Existen factores ambientales desfavorables a los cuales se ven enfrentadas las vides cultivadas en ambientes áridos y semiáridos, como son la sequía y la salinidad de los suelos. El agua es uno de los factores más importantes para el desarrollo de las plantas y su carencia constituye una de las principales fuentes de estrés (Chaves *et al.*, 2009). Especies como la vid han desarrollado diversas respuestas adaptativas que les permiten tolerar diferentes niveles de restricción hídrica, permitiéndoles completar su desarrollo (Rogiers *et al.*, 2012).

Las vides se caracterizan por sufrir sequías estacionales en la mayoría de las regiones productoras (Grimplet *et al.*, 2008; Chaves *et al.*, 2010), y su diversidad genotípica en la tolerancia a la sequía convierte a este cultivo perenne en un modelo de estudio ideal, dada la existencia de respuestas al déficit hídrico que son genotipo-dependiente, gracias a la gran variabilidad genética existente en las numerosas variedades comerciales disponibles y materiales naturalizados en las zonas de origen y cultivo (Bota *et al.*, 2001; Gaudillère *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2010; Rogiers *et al.*, 2012). Respuestas comunes al estrés incluyen cambios tanto en el metabolismo de hormonas, como en procesos de fotosíntesis, crecimiento, transcripción y señalización entre otros, los cuales han sido confirmados mediante análisis fisiológicos y moleculares (revisados por Cramer, 2010). En particular, el ácido abscísico (ABA) afecta las rutas de señalización que disparan actividades regulatorias claves del metabolismo y transcripción, y también regulan importantes respuestas fisiológicas tales como la conductancia estomática, fotoprotección y desarrollo (Chaves *et al.*, 2010; Cramer, 2010). Otro de los mecanismos de tolerancia a sequía es el incremento en sistemas radiculares ramificados y profundos, capaces de obtener suministros de agua para su desarrollo y así sobrevivir a períodos de déficit hídrico (Chaves *et al.*, 2010; Lovisolo *et al.*, 2010; Rogiers *et al.*, 2012). Además, la vid presenta mecanismos para evitar el déficit hídrico, los cuales incluyen el incrementar al máximo la eficiencia en el uso del agua a través de la regulación estomática, incluso con leves cambios en el potencial hídrico

foliar (Flexas *et al.*, 1998; Lovisolo *et al.*, 2010). Otro mecanismo es el ajuste osmótico mediante la acumulación activa de azúcares solubles, ácidos orgánicos y prolina (Castellarin *et al.*, 2007; Deluc *et al.*, 2009). Esto permite mantener la turgencia celular a bajos potenciales hídricos (Morgan, 1984), facilitando el crecimiento celular, la apertura estomática y la fotosíntesis, favoreciendo tanto la supervivencia como las adaptaciones radiculares para explorar un mayor volumen de agua del suelo (Turner y Jones, 1980; Blum *et al.*, 1989; Schultz, 2003). Basado en el comportamiento del potencial hídrico en respuesta al déficit hídrico, los cultivares de vid han sido clasificados como isohídricos o anisohídricos (Schultz, 2003; Vandeleur *et al.*, 2009). Cultivares isohídricos son aquellos que mantienen su potencial hídrico foliar sobre un determinado umbral, a pesar de la disponibilidad hídrica de suelo o la demanda hídrica atmosférica. En tanto, cultivares anisohídricos son aquellos en los cuales el potencial hídrico foliar cae con la disminución en la disponibilidad hídrica de suelo o con incrementos en la demanda hídrica atmosférica (revisados por Lovisolo *et al.*, 2010). En vides isohídricas, el potencial hídrico foliar raramente cae bajo $-1,5$ MPa, lo cual es cercano al umbral de cavitación severa en esta especie (Lovisolo *et al.*, 2010).

El objetivo del presente estudio fue analizar las respuestas morfo-fisiológicas en genotipos naturalizados de vides expuestas a estrés hídrico. Específicamente, se determinaron los cambios que sufren estas plantas para adaptarse al estrés por sequía mediante la evaluación de parámetros fisiológicos y arquitecturales en cuatro genotipos de vides, provenientes de zonas áridas y semiáridas del norte de Chile, mediante el uso de un sistema controlado de minirizotrones.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se analizaron cuatro genotipos de vides colectados en la zona norte de Chile, los cuales fueron seleccionados por el mayor crecimiento al ser sometidos a condiciones de cultivo *in vitro*: genotipos 148 y 134, colectados en la Región de Tarapacá; genotipo 10, colectado en la Región de Atacama; y genotipo 93, colectado en la Región de Coquimbo.

Se utilizó material clonal de cinco meses, proveniente de cultivo *in vitro*. El proceso de

micropropagación consistió en tres etapas de un mes cada una: establecimiento, crecimiento y enraizamiento, utilizando medio MS modificado (Murashige and Skoog, 1962). Las plántulas de tres meses permanecieron en un cuarto de crecimiento en condiciones controladas y constantes (16 horas de luz, temperatura promedio de 24° C y humedad relativa 70%). Una vez que las plantas presentaron raíces *in vitro*, se procedió a su trasplante y aclimatación por un mes adicional en un sustrato de turba: perlita (1:1), regadas con una solución nutritiva de MS al 0,5X. Durante la fase de aclimatación las plantas fueron trasplantadas a un contenedor cerrado, el cual se fue adaptando gradualmente a condiciones *ex vitro*, durante cuatro semanas en cuarto de crecimiento. El proceso de aclimatación en invernadero fue de cuatro semanas adicionales, donde fueron regadas con una solución nutritiva MS al 0,1X semanalmente. Finalmente, las plantas de cinco meses fueron instaladas en minirizotrones, conformados por dos vidrios de 37 x 30 cm con sustrato de turba: perlita (1:1), cubierto por ambos lados con una lámina oscura para evitar la exposición a la luz del sistema radicular. Se instalaron dos plantas del mismo genotipo, separadas por una banda de hule para evitar que sus raíces se entrelazaran. Tres minirizotrones se instalaron en contenedores plásticos cerrados, separados por una distancia de 4 cm entre ellos. Las plantas crecieron durante una semana antes de comenzar con la aplicación de los diferentes tratamientos de riego.

Tratamiento de estrés por sequía

Para determinar la cantidad de riego a utilizar se realizó, previamente, un ensayo para registrar el contenido relativo de agua del sustrato en los minirizotrones durante 35 días, el cual consistió en dos tratamientos de riego, un control con riego semanal a capacidad de campo y un tratamiento de sequía absoluta, monitoreados por sondas ECH2O (EC-20, USA). Esto permitió determinar que la cantidad de agua suficiente para mantener el rizotrófon a capacidad de campo (CC) fue de 55 ml por semana. El ensayo se realizó mediante dos tratamientos de riego deficitario: estrés hídrico leve (60% de CC) y estrés hídrico severo (40% de CC), y su control respectivo (CC), con un diseño completamente aleatorizado. Por cada genotipo se analizaron 18 plantas, divididas en tres tratamientos con seis repeticiones por tratamiento.

Parámetros evaluados

El experimento finalizó cumplidos tres meses, y se midieron la supervivencia de las plantas y longitud de raíz final (cm) en los tratamientos de estrés hídrico y el control. La evaluación morfológica se realizó cada 15 días, midiendo la distancia entre nudos (cm) y longitud de tallo (cm). Las mediciones de desempeño fisiológico como tasa de fotosíntesis se realizaron cada 15 días sobre tres hojas visualmente sanas y totalmente expuestas al sol, mediante un equipo de intercambio gaseoso IRGA (Licor-6400, USA). El potencial hídrico foliar (Ψ_h) se evaluó cada 15 días mediante un psicrómetro y una termocupla, lo que permitió determinar la evapotranspiración de la hoja mediante el principio de Peltier (Busso, 2008). La tasa de crecimiento relativo se calculó tomando el crecimiento final versus el inicial en relación al número de mediciones. Todas las mediciones fueron realizadas a las 12:00 hrs. Considerando que no hubo diferencias entre mediciones en los datos temporales (datos no mostrados), se presentan solamente los datos del final del experimento.

Los parámetros morfológicos así como capacidad fotosintética, potencial hídrico y tasa de crecimiento relativo fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) factorial. Previamente se evaluaron la normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza de acuerdo al test Shapiro-Wilks y Bartlett, respectivamente, y las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas mediante la prueba *a posteriori* de Tukey. La variable de sobrevivencia fue analizada con un modelo lineal generalizado debido a que los datos no cumplían los principales supuestos de normalidad y homocedasticidad, y la regresión aplicada para este análisis fue Poisson (Sokal y Rohlf, 1995).

Resultados

Sobrevivencia de plantas

La sobrevivencia de plantas disminuyó de manera significativa por efecto del tratamiento de estrés hídrico, siendo el tratamiento de estrés hídrico severo el que disminuyó la sobrevivencia de los genotipos hasta un 20%, a excepción del genotipo 134, en donde cerca de un 50% de las plantas sobrevivieron a este nivel de estrés (Tabla 1; Figura 1). No existió efecto significativo entre los genotipos ni en la interacción entre genotipo y tratamiento (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros estadísticos para la fuente de variación (tratamiento, genotipo, interacción tratamiento * genotipo), medida en sobrevivencia y parámetros morfométricos de cuatro genotipos diferentes de vid bajo tratamientos de estrés hídrico.

Fuente de variación	Sobrevivencia			Longitud de tallo			Longitud de raíz			Distancia entrenudos		
	gl	Wald	p	gl	F	p	gl	F	p	gl	F	p
Tratamiento (T)	2	8,220885	0,016401	2	29,2184	0,000000	2	2,502	0,090454	2	6,411	0,002996
Genotipo (G)	3	0,605265	0,895226	3	1,5507	0,210755	3	4,615	0,005696	3	17,718	0,000000
T*G	6	0,821608	0,991482	6	7,8563	0,000003	6	3,804	0,002811	6	1,749	0,125284

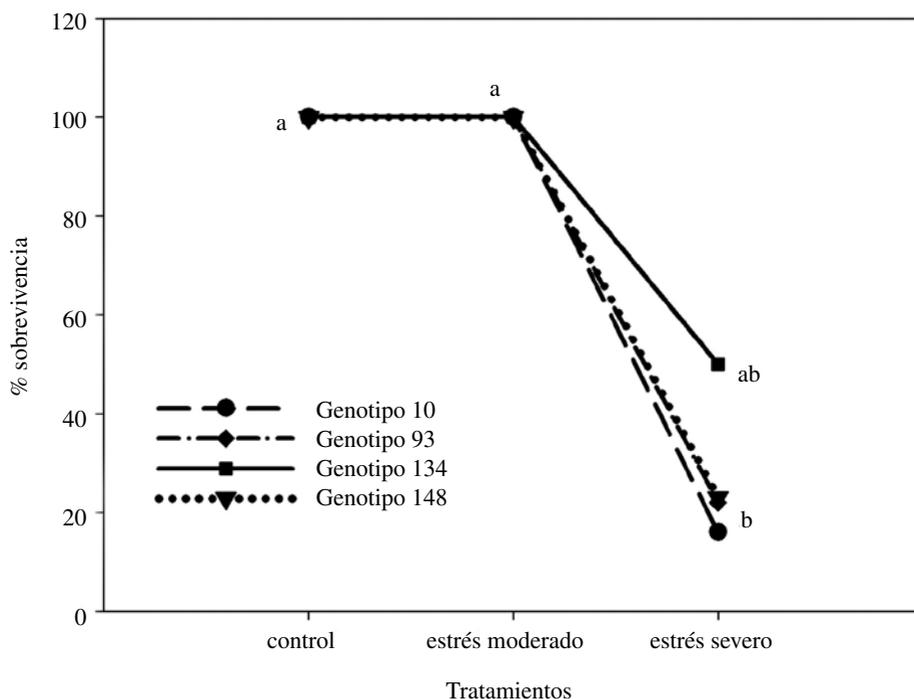


Figura 1. Sobrevivencia promedio (%) de cuatro genotipos naturalizados de *Vitis vinifera* expuestos a tratamiento control, estrés hídrico moderado y severo durante tres meses (Letras diferentes corresponden a diferencias significativas; $p = 0,05$).

Survival (%) in four naturalized genotypes of Vitis vinifera exposed to control, moderate and severe drought stress treatments during three months (different letters indicate significant differences; $p = 0.05$).

Parámetros morfométricos

Las evaluaciones de longitud de tallo presentaron una disminución significativa entre los tratamientos aplicados, sin observarse diferencias significativas entre los genotipos (Tabla 1). El análisis evidenció un efecto significativo en el factor de interacción tratamiento por genotipo (Tabla 1). Las mayores diferencias se registraron entre tratamiento control y estrés severo, en donde los genotipos ajustaron su crecimiento a una longitud similar (Figura 2A). De

hecho, las mayores diferencias en longitud entre los genotipos se presentaron sólo en tratamiento control entre los genotipos 148 (40 cm) y 10 (10 cm).

En relación a la longitud final de las raíces en los genotipos evaluados, este parámetro mostró una disminución significativa dependiente del genotipo y en la interacción genotipo por tratamiento, no así por el efecto del tratamiento (Tabla 1). Las diferencias entre los genotipos y los tratamientos se presentan en la Figura 2B, en donde los genotipos 10 y 134 presentaron las menores disminuciones de longitud

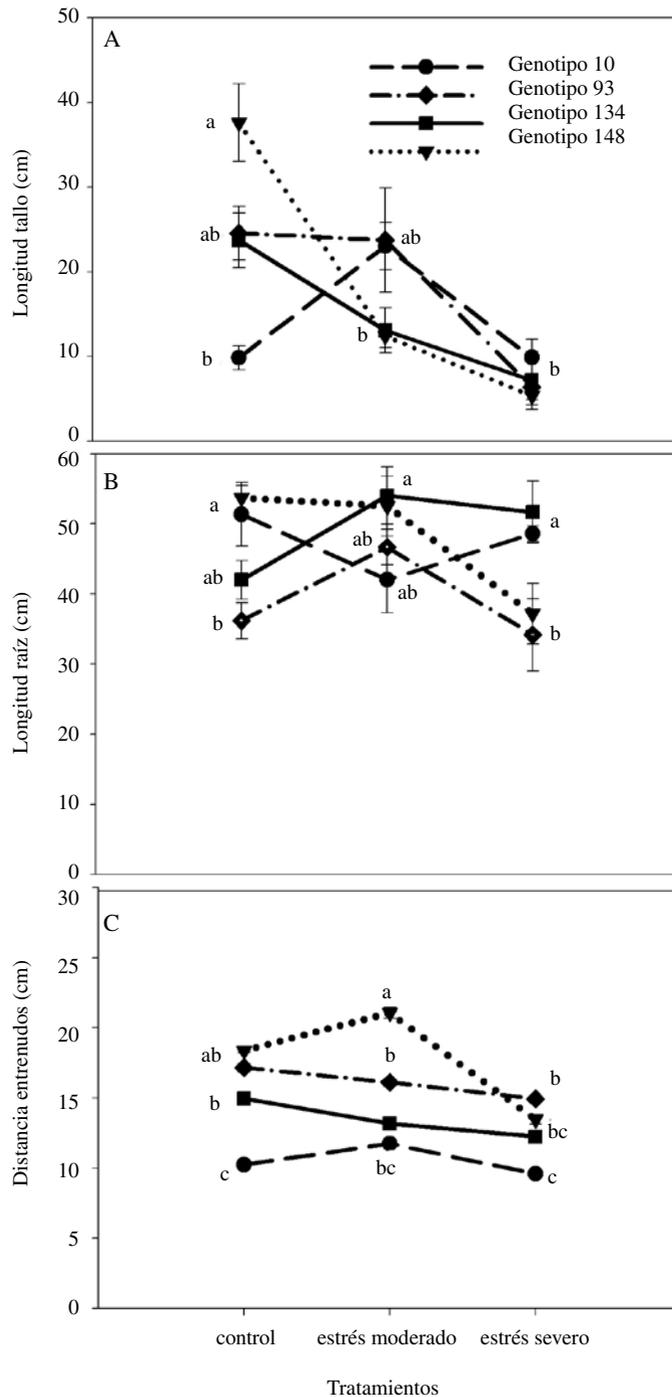


Figura 2. Longitud tallo (A), longitud de raíz (B) y distancia entrenudos (C), medidas en centímetros, evaluada en 4 genotipos diferentes de *Vitis vinifera*, en condiciones control, estrés hídrico moderado y severo durante tres meses. Se indican los valores promedio (± 2 SE). Letras diferentes corresponden a diferencias significativas; test de Tukey, $\alpha < 0,05$.

Shoot length (A), root length (B) and internode distance (C), measured in centimeters, assessed in 4 different genotypes of *Vitis vinifera*, in control conditions, moderate and severe drought stress during three months. Mean values (± 2 SE) are shown. Different letters indicate significant differences; Tukey test, $\alpha < 0.05$.

Tabla 2. Parámetros estadísticos para la fuente de variación (tratamiento, genotipo, interacción tratamiento * genotipo), medida en atributos de desempeño fisiológico de cuatro genotipos diferentes de vid bajo tratamientos de estrés hídrico.

Fuente de variación	Fotosíntesis			Potencial hídrico foliar			Tasa crecimiento relativo		
	gl	F	p	gl	F	p	gl	F	p
Tratamiento (T)	2	20,1723	0,000007	2	378,7325	0,000000	2	29,2184	0,000000
Genotipo (G)	3	4,2443	0,015338	3	43,3690	0,000000	3	1,5507	0,210755
T*G	6	1,2521	0,315857	6	43,3690	0,000000	6	7,8563	0,000003

radical en respuesta al estrés severo, y los genotipos 93 y 148 presentaron la mayor disminución. La mayor longitud radical se observó en el genotipo 148 en el tratamiento control, pero, a medida que el nivel de estrés aumentó, dicho genotipo presentó la menor longitud radical. En cambio, el genotipo 134 incrementó su longitud radical tanto en estrés moderado como severo (Figura 2B).

La distancia entrenudos disminuyó de manera significativa entre los tratamientos, así como se presentaron diferencias significativas entre genotipos (Tabla 1). La mayor diferencia se registró entre los tratamientos moderado y severo, disminuyendo la distancia entrenudos. Entre los genotipos, la mayor distancia entrenudos se observó en los genotipos 93 y 148 y la menor distancia en el genotipo 10 en todos los tratamientos; entre los genotipos 134 y 148 no existieron diferencias significativas en el tratamiento de estrés severo (Figura 2C).

Desempeño fisiológico

La tasa fotosintética medida a radiación saturante de 750 μmol (A_{max}) fue significativamente mayor en condiciones control en comparación con estrés severo (Tabla 2). Adicionalmente, se observó una disminución significativa en la tasa fotosintética en los genotipos 134 y 148 por efecto del tratamiento de estrés severo. No obstante, el factor de interacción genotipo x tratamiento no fue significativo (Tabla 2; Figura 3A).

El potencial hídrico foliar fue significativamente más negativo bajo la condición de estrés severo en relación al control y al estrés moderado. Entre estos dos últimos tratamientos no existieron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 2; Figura 3B). Dicha respuesta fue dependiente tanto del factor genotipo como por la interacción entre genotipo y tratamiento (Tabla 2). Un comportamiento diferente se registró en el genotipo 10, que mostró diferencias significativas en comparación

con todos los genotipos en estudio, ya que mantuvo su potencial hídrico independiente del tratamiento de estrés hídrico aplicado y no disminuyó en respuesta al estrés severo, como se observó en los otros genotipos (Figura 3B).

El análisis de la tasa de crecimiento relativo mostró disminuciones significativas entre los tratamientos de restricción de riego y la interacción tratamiento x genotipo (Tabla 2). De manera contraria, no hubo efecto dependiente del genotipo (Tabla 2). La mayor diferencia se observó entre el control y el estrés severo. Los genotipos 134 y 148 mostraron una tendencia de disminución gradual en la tasa de crecimiento relativa a medida que el tratamiento de estrés fue más severo. El genotipo 93 no mostró diferencias entre control y estrés moderado, pero ante un estrés severo disminuyó dicha tasa de la misma manera que el resto de los genotipos. El genotipo 10 presentó un aumento en la tasa de crecimiento en el tratamiento de estrés leve, pero sin presentar diferencias entre control y estrés severo (Figura 3C).

Discusión

Mediante la evaluación de parámetros funcionales y de crecimiento, se determinó el nivel de respuesta y desempeño diferencial en cuatro genotipos de vides frente a tratamientos de estrés hídrico. Los genotipos enfrentados a tratamientos de riego deficitario presentaron variaciones contrastantes en los parámetros evaluados. El genotipo 134 fue el que obtuvo un mejor desempeño en términos de sobrevivencia y parámetros de crecimiento tales como longitud de raíz y distancia entrenudos del brote, lo que fue acompañado de una mayor disminución en el intercambio gaseoso y en su potencial hídrico foliar. Esto indicaría una estrategia de tipo anisohídrica, dada tanto por una mayor supervivencia como por promover adaptaciones radiculares, que indicarían un potencial de explorar un mayor

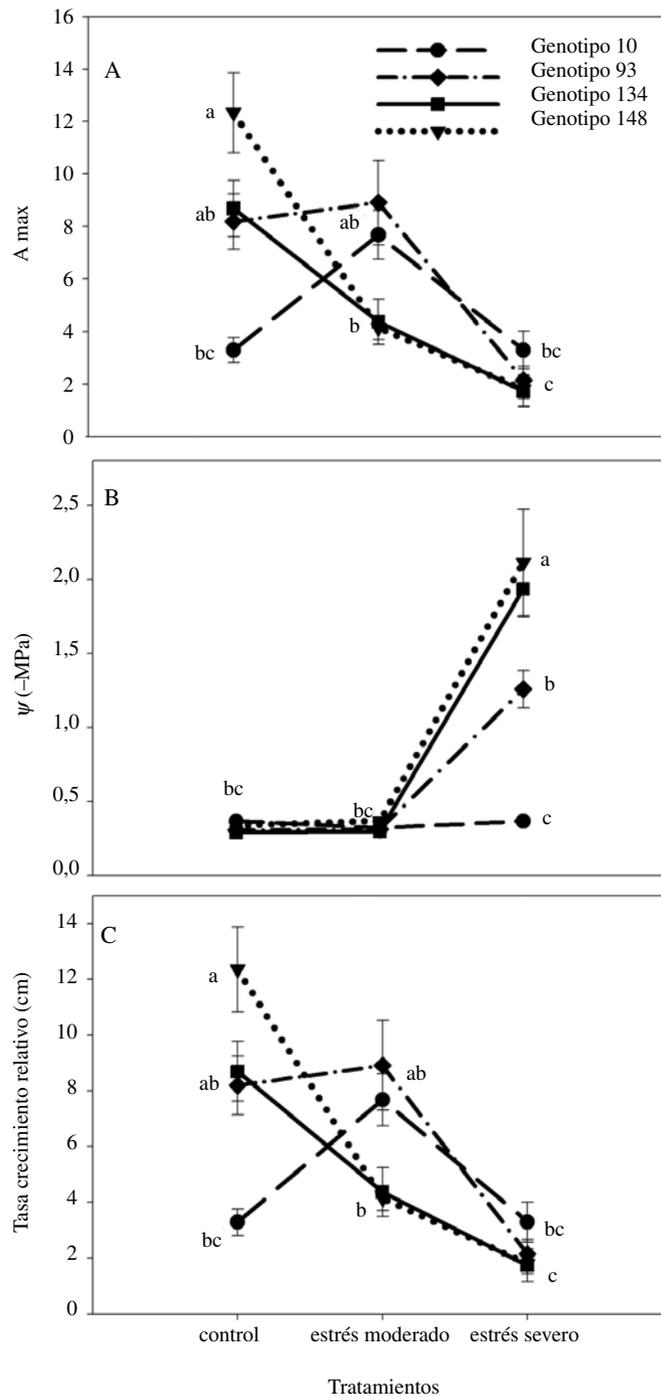


Figura 3. Tasa de fotosíntesis neta ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (A), potencial hídrico foliar (Ψ -MPa) (B) y tasa de crecimiento relativo (cm) (C), medidas en cuatro genotipos diferentes de *Vitis vinifera*, en condiciones control, estrés hídrico moderado y severo durante tres meses. Se indican los valores promedio ($\pm 2 \text{ SE}$). Letras diferentes corresponden a diferencias significativas; test de Tukey, $\alpha = 0,05$.

*Net photosynthetic rate ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (A), leaf water potential (Ψ -MPa) (B) and relative growth rate (cm) (C), assessed in 4 different genotypes of *Vitis vinifera*, in control, moderate and severe drought stress conditions during three months. Mean values ($\pm 2 \text{ SE}$) are shown. Different letters indicate significant differences; Tukey test, $\alpha < 0.05$.*

volumen de sustrato, pero adaptando su desempeño fotosintético a la disponibilidad hídrica de suelo (Turner y Jones, 1980; Blum *et al.*, 1989; Schultz, 2003). En un ambiente semiárido, en el cual se conjugan simultáneamente factores ambientales promotores de estrés, como baja disponibilidad hídrica de suelo e incrementos en la demanda hídrica atmosférica, la asimilación de CO₂ debe establecer un compromiso entre el gasto hídrico, la fijación de materia y energía y la disipación de la energía excesiva, aplicando los ajustes necesarios para poder mantener la productividad de la vid (Chaves *et al.*, 2010; Cramer, 2010; Lovisolo *et al.*, 2010). Paralelamente, el genotipo 148 fue el que exhibió un comportamiento más dependiente de la disponibilidad de agua suministrada. En la mayoría de los parámetros morfométricos y de desempeño fisiológico presentó un comportamiento similar a las especies sensibles a la sequía (Liakopoulos *et al.*, 2006; Cramer *et al.*, 2007). En contraste, la vid también podría recurrir a un mecanismo de abscisión foliar para poder mantener niveles similares de fotosíntesis en diferentes escenarios de disponibilidad hídrica, con el objetivo de reducir su área de interacción con el ambiente, lo cual de hecho se registró en el genotipo 10 (datos no mostrados).

Aunque se ha sugerido que las diferencias entre cultivares iso- y anisohídricos pueden incluir diferentes respuestas estomáticas y uso de agua (Schultz, 2003), en general ellos presentan disminuciones similares en parámetros como la conductancia estomática (g_s) y la fotosíntesis máxima en respuesta al estrés hídrico (Lovisolo *et al.*, 2010), lo cual coincide con lo mostrado por los genotipos analizados, en donde se ajustó este carácter fisiológico para ambas estrategias. En efecto, la fotosíntesis máxima varió entre 12 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en el genotipo 148 y 4 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en el genotipo 10 en condiciones control, lo cual es un rango muy amplio entre genotipos de vides a pesar de provenir desde regiones áridas y semiáridas, y cayó bajo 4 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en todos los genotipos por efectos del estrés hídrico severo. Tales variaciones entre genotipos son similares a la alta variabilidad encontrada en caracteres fotosintéticos bajo riego entre diferentes cultivares de vid de las islas Baleares, España, a pesar de que estos cultivares comparten un origen común (Bota *et al.* 2001).

Similarmente, el potencial hídrico fue una respuesta claramente dependiente de los genotipos analizados, en donde el genotipo 10 conservó el

potencial hídrico y no disminuyó en respuesta al estrés hídrico severo, a diferencia de los otros genotipos analizados, en donde este potencial se hizo más negativo a medida que aumentó el estrés hídrico. Asimismo, el genotipo 93 presentó un potencial hídrico sobre el umbral $-1,5 \text{ Mpa}$ en estrés hídrico severo, lo cual indicaría una estrategia isohídrica similar al genotipo 10 (Lovisolo *et al.*, 2010). Este resultado se complementa con una mayor tasa de crecimiento relativo presentado por ambos genotipos en la condición de estrés hídrico moderado, y en particular del genotipo 10 en estrés hídrico severo (Bota *et al.* 2001; Rogiers *et al.*, 2012). En situaciones de estrés hídrico se requiere una rápida absorción de agua desde el suelo por las raíces, en especial cuando la transpiración es particularmente alta, lo que también puede generar un enorme gradiente de presión hidrostática (Nobel, 2004). Por ello es necesario mantener un potencial hídrico foliar en niveles que permitan mantener un adecuado funcionamiento, sin alterar el desempeño fisiológico.

El estrés hídrico severo inhibió la extensión entrenudos, la expansión foliar y el alargamiento de zarcillos, por lo tanto limita la transpiración, siendo usado como indicador sensible del estado hídrico de la vid (Schultz, 2003; Chaves *et al.*, 2010). Además, disminuciones en el diámetro promedio de los vasos xilemáticos disminuyen la conductividad hidráulica del xilema y pueden prevenir el embolismo, ya que vasos más pequeños son menos susceptibles a la cavitación (Vandeleur *et al.*, 2009; Lovisolo *et al.*, 2010). La respuesta en los genotipos 134 y 148 refleja dicha sensibilidad y adaptación al tratamiento de estrés hídrico moderado, ya que adaptaron la longitud del tallo sin alterar de manera importante la distancia entrenudos, pero con la diferencia de que el genotipo 134 indujo un crecimiento mayor del sistema radical. Esta adaptación del crecimiento y alocación de recursos tallo/raíz permitiría evitar de manera más eficiente los efectos de la cavitación.

Conclusiones

El sistema experimental de minirizotrones permitió determinar diferencias significativas entre genotipos de vides colectados desde zonas áridas y semiáridas del norte de Chile sometidos a tratamientos de estrés hídrico. Los caracteres morfométricos y atributos de desempeño fisiológico analizados permitieron caracterizar estrategias de respuesta al déficit hídrico, diferenciando entre genotipos anisohídricos

como 134 y 148, de genotipos isohídricos como 10 y 93. El conocimiento de los efectos tempranos de la sequía en el desarrollo a nivel de raíces y tallo, adaptaciones de la maquinaria fotosintética y potencial hídrico nos permitió diferenciar los genotipos más tolerantes para su uso potencial como portainjertos o injertos en zonas áridas y semiáridas y/o bajo futuros escenarios de cambios en las condiciones climáticas de la zona norte del país, subrayando el rol fundamental de explotar la variabilidad genética de vides como cultivo modelo.

Agradecimientos

A.Z.-S. agradece a la carrera de Biotecnología de la Universidad de La Frontera por las facilidades otorgadas para el desarrollo de tesis en nuestro laboratorio. Este artículo contó con el financiamiento y forma parte de las actividades de investigación del proyecto InnovaChile 05CR11PAT-19 a A.Z.-S. Los autores agradecen los valiosos comentarios de los revisores anónimos, quienes permitieron enriquecer el trabajo presentado.

Literatura citada

- Blum, A.; Mayer, J.; Golan, G.
1989 Agronomic and physiological assessments of genotypic variation for drought resistance in sorghum. *Australian Journal of Agricultural Research* 40: 49-61.
- Bota, J.; Flexas, J.; Medrano, H.
2001 Genetic variability of photosynthesis and water use in Balearic grapevine cultivars. *Ann Applied Biology* 138 (3): 353-361.
- Busso, C.
2008 Uso de la cámara de presión y los psicrómetros a termocupla en la determinación de las relaciones hídricas en tejidos vegetales. *Phyton* (Buenos Aires) 77: 327-350.
- Castellarin, S.D.; Pfeiffer, A.; Sivilotti, P.; Degan, M.; Peterlunger, E.; Di Gasparo, G.
2007 Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant, Cell & Environment* 30: 1381-1399.
- Cramer, G.R.; Ergül, A.; Grimplet, J.; Tillett, R.; Tattersall, E.; Bohlman, M.; Vincent, D.; Sonderegger, J.; Evans, J.; Osborne, C.; Quilici, D.; Schlauch, K.; Schooley, D.; Cushman, J.
2007 Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Functional & Integrative Genomics* 7: 111-134.
- Cramer, G.R.
2010 Abiotic stress and plant responses from the whole vine to the genes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16: 86-93.
- Chaves, M.M.; Flexas, J.; Pinheiro, C.
2009 Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103: 551-560.
- Chaves, M.M.; Zarrouk, O.; Francisco, R.; Costa, J.M.; Santos, T.; Regalado, A.P.; Rodrigues, M.L.; Lopes, C.M.
2010 Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Annals of Botany* 105 (5): 661-76.
- Deluc, L.G.; Quilici, D.R.; Decendit, A.; Grimplet, J.; Wheatley, M.D.; Schlauch, K.A.; Mérillon, J.M.; Cushman, J.C.; Cramer, G.R.
2009 Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC genomics* 10: 212.
- Flexas, J.; Escalona, J.M.; Medrano, H.
1998 Down-regulation of photosynthesis by drought under field conditions in grapevine leaves. *Functional Plant Biology* 25: 893-900.
- Gaudillère, J.P.; Van Leeuwen, C.; Ollat, N.
2002 Carbon isotope composition of sugars in grapevine, an integrated indicator of vineyard water status. *Journal of Experimental Botany* 53: 757-763.
- Grimplet, J.; Deluc, L.G.; Cramer, G.R.; Cushman, J.C.
2008 Integrating functional genomics with abiotic stress responses in wine grape-*Vitis vinifera*. in: M. A. Jenks, et al. (eds.), *In Advances in Molecular Breeding towards Salinity and Drought Tolerance*. Springer Verlag, Holanda, pp. 643-668.
- Liakopoulos, G.; Nikolopoulos, D.; Klouvatou, A.; Vekkos, K.-A.; Manetas, Y.; Karabourniotis, G.
2006 The Photoprotective Role of Epidermal Anthocyanins and Surface Pubescence in Young Leaves of Grapevine (*Vitis vinifera*). *Annals of Botany* 98: 257-265.
- Lovisollo, C.; Perrone, I.; Carra, A.; Ferrandino, A.; Flexas, J.; Medrano, H.; Schubert, A.
2010 Drought-induced changes in development and function of grapevine (*Vitis* spp.) organs and in their hydraulic and non-hydraulic interactions at the whole-plant level: a physiological and molecular update. *Functional Plant Biology* 37: 98-116.
- Morgan, J.M.
1984 Osmoregulation and Water Stress in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 299-319.
- Murashige, T.; Skoog, F.
1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.
- Nobel, P.S.
2004 *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. Third edition. Academic Press, Inc., San Diego.
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA)
2012 Estadísticas de frutales. <http://www.odepa.gob.cl/> (consulta en línea).
- Rogiers, S.Y.; Greer, D.H.; Hatfield, J.M.; Hutton, R.J.; Clarke, S.J.; Hutchinson, P.A.; Somers, A.
2012 Stomatal response of an anisohydric grapevine cultivar to evaporative demand, available soil moisture and abscisic acid. *Tree Physiol.* 32 (3): 249-61.

- Schultz, H.R.
2003 Differences in hydraulic architecture account for near isohydric and anisohydric behaviours of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. *Plant, Cell & Environment* 26, 1393-1405.
- Sokal, R.; Rohlf, F.J.
1995 Biometry: the principles and practice of statistics in biological research Freeman Company, Nueva York.
- Tattersall, E.; Grimplet, J.; DeLuc, L.; Wheatley, M.; Vincent, D.; Osborne, C.; Ergül, A.; Lomen, E.; Blank, R.; Schlauch, K.; Cushman, J.; Cramer, G.
2007 Transcript abundance profiles reveal larger and more complex responses of grapevine to chilling compared to osmotic and salinity stress. *Functional & Integrative Genomics* 7: 317-333.
- Turner, N.C.; Jones, M.M.
1980 Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation, in: N. C. Turner and P. J. Kramer (eds.), *Adaptation of plants to water and high temperature stress*, Wiley Inter Science, Nueva York. pp. 84-104.
- Vandeleur, R.K.; Mayo, G.; Shelden, M.C.; Gilliam, M.; Kaiser, B.N.; Tyerman, S.D.
2009 The role of PIP aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiology* 149:445-460.

1 **Evaluación de la tolerancia a estrés por sequía en cuatro genotipos naturalizados de**
2 **vid (*Vitis vinífera*) provenientes del norte de Chile.**

3 Claudia Bavestrello-Riquelme^{1, 5}, Loreto Cavieres¹, Jorge Gallardo¹, Antonio Ibacache^{1, 2},
4 Nicolás Franck^{3, 4}, y Andrés Zurita-Silva^{1, *}

5 ¹ Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA), Universidad de La Serena, Av.
6 Raúl Bitrán s/n, La Serena, Chile.

7 ² Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro de Investigación Intihuasi,
8 Colina San Joaquín s/n, La Serena, Chile.

9 ³ Centro de Estudios de Zonas Áridas, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de
10 Chile, Casilla 129, Coquimbo, Chile.

11 ⁴ Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad
12 de Chile. Casilla 1004, Santiago, Chile.

13 ⁵ Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera. Av.
14 Francisco Salazar 1145, Temuco, Chile.

15

16 *Corresponding author. Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA),
17 Universidad de La Serena, Av. Raúl Bitrán s/n, PO Box 554, La Serena, Chile. E-mail
18 address: andres.zurita@ceaza.cl. Tel +5651204378; fax +5651334741.

19

20

21

22

23 **Abstract**

24 **C. Bavestrello-Riquelme, L. Cavieres, J. Gallardo, A. Ibacache, N. Franck, and A.**
25 **Zurita-Silva. Evaluation of drought stress tolerance in four naturalized grapevine**
26 **genotypes (*Vitis vinifera*) from northern Chile.**

27 One of the main problems that have affected the productivity of grapevine (*Vitis vinifera*) in
28 the north of Chile is the gradual decrease of rainfall and the prolonged periods of drought.
29 The present work aims to determine the responses to drought stress in grapevine. In order
30 to assess this stress, four naturalized genotypes of *Vitis vinifera* from an arid and semi-arid
31 latitudinal gradient of Chile (18°S a 32°S, 72°W a 70°W) were studied through the use of
32 mini-rhizotrons. The plant responses were evaluated during three months by means of (1)
33 morphometric parameters including biomass, growth and both shoot and root ; (2)
34 physiological parameters such as water potential and net photosynthesis. Clonal *in-vitro*
35 material from each genotype was subjected to three levels of deficit irrigation (control,
36 moderate and severe water stress) in order to evaluate the physiological response of each
37 genotype compared to control, under a completely randomized design. The responses of
38 root length, internode length, photosynthesis and water potential to water stress differed
39 between genotypes, demonstrating that the genotype 134 has performed a better adaptation
40 to water deficit, as opposed to genotype 93 that turned out to be the least tolerant, since it
41 comes from a semiarid zone. None of the analyzed genotypes from arid and semi-arid areas
42 seem to have developed a physiological mechanism of tolerance to severe water stress.

43 **Key words:** Drought stress, root development, physiological responses, *Vitis vinifera*

44

45

46

47 **Introducción**

48 En Chile la producción de vides se realiza entre las Regiones de Arica-Parinacota y Los
49 Lagos (S 18° a S 44°, W 72° a W 70°) , desde donde se obtienen diversos productos como
50 vinos con denominación de origen, pisco, uva de mesa y mostos. Las uvas de mesa son el
51 principal frutal de exportación de Chile al mundo, con 16.9% del total de las exportaciones
52 frutícolas (ODEPA, 2012). No obstante, existen factores ambientales desfavorables a los
53 cuales se ven enfrentadas las vides cultivadas en ambientes áridos y semiáridos, como son
54 la sequía y la salinidad de los suelos, problemas comunes en estas zonas de producción. El
55 agua es uno de los factores más importantes para el desarrollo de las plantas y su carencia
56 constituye una de las principales fuentes de estrés (Chaves et al., 2009). Algunas especies
57 de plantas han desarrollado diversas respuestas adaptativas que les posibilita tolerar
58 diferentes niveles de restricción hídrica lo cual completa su ontogenia.

59 Las respuestas de las plantas frente a factores de estrés abiótico involucran la activación de
60 una secuencia de eventos, que incluyen la percepción del estímulo por la planta, el
61 procesamiento y transducción de la señal, la amplificación e integración en la ruta o rutas
62 de transmisión de la información y posteriormente tiene lugar la regulación de la expresión
63 génica y finalmente las respuestas adaptativas que incluyen mecanismos bioquímicos,
64 metabólicos y moleculares, como la inducción de genes de síntesis de ácido abscísico
65 (ABA), y otros relacionados a las respuestas al estrés (Kramer and Boyer., 1995; Pareek et
66 al., 2010). Dichas respuestas dependerán de la interacción entre el genotipo y el estado de
67 desarrollo al momento del estrés, de la duración y severidad del mismo, y de los factores
68 ambientales que lo provoquen. Una vez activadas estas respuestas, el crecimiento se verá
69 modulado, a su vez por el estado nutricional de la planta (Gillaspy et al., 1993).

70 Las vides se destacan por crecer en ambientes áridos y semiáridos. Es una especie que
71 posee un nivel de tolerancia moderadamente alto a la sequía (Grimplet et al., 2008;
72 McKersie y Leshem., 1994), siendo la variabilidad genética un factor importante en esta
73 adaptación (Gaudillère et al., 2002). Uno de los mecanismos de tolerancia a sequía es el
74 incremento en los sistemas radicales ramificados y profundos, capaces de obtener
75 suministros de agua para su desarrollo y así sobrevivir a períodos de déficits hídrico. Sin
76 embargo, procesos de calentamiento global están provocando cambios climáticos
77 significativos, como son el aumento de temperaturas junto con fenómenos de
78 precipitaciones cambiantes. Lo que demanda aumentar el estudio de mecanismos de
79 adaptación que otorguen tolerancia a condiciones de estrés abiótico (Howden et al., 2007),
80 Esta especie presenta diversos mecanismos para evitar el déficit hídrico, los cuales incluyen
81 el incrementar al máximo la captación de agua y reducir al mínimo sus pérdidas (Levitt.,
82 1980), a través del cierre estomático como respuesta temprana al estrés hídrico y que se
83 produce incluso antes de que sean detectables los cambios en el potencial hídrico foliar
84 (Flexas et al., 1998). Otro mecanismo es el ajuste osmótico mediante la acumulación activa
85 de azúcares solubles, ácidos orgánicos y prolina (Castellarin et al., 2007; Deluc et al.,
86 2009). Esto permite mantener la turgencia celular a bajos potenciales hídricos (Morgan.,
87 1984), facilitando el crecimiento celular, la apertura estomática y la fotosíntesis, y
88 favorecer tanto la supervivencia a la deshidratación, como las adaptaciones radicales para
89 absorber un mayor volumen de agua desde el suelo (Blum et al., 1989; Schonfeld et al.,
90 1988; Turner y Jones., 1980).

91 El sistema radical de las plantas también sufre adaptaciones al estrés hídrico y dependiendo
92 del tipo de respuesta, existen dos tipos de estrategias en vides: en plantas isohídricas la
93 reducción de pérdidas involucra la modificación del sistema radical, con una reducción de

94 la superficie radical, y una disminución de la permeabilidad para evitar pérdidas en suelos
95 muy secos y un incremento de la resistencia hidráulica para disminuir el flujo hídrico hasta
96 la copa (Levitt., 1980; Schultz., 2003; Vandeleur et al., 2009). En cambio, la opuesta es
97 plantas anisohídricas donde los efectos de la sequía se reducen al incrementar la absorción
98 de agua, manteniendo una mayor tasa de transpiración y continuando con el proceso de la
99 fotosíntesis. Así, en condiciones de sequía las plantas anisohídricas tienen tasas
100 fotosintéticas y de crecimiento mayores que plantas isohídricas. Para mantener estas tasas,
101 es necesario conservar tanto la turgencia como un elevado contenido relativo de agua,
102 absorbiendo tanta agua como se transpira. Estas plantas tienen resistencias hidráulicas
103 mucho menores que plantas isohídricas, y la absorción se mantiene incrementando la
104 superficie radical pero no la biomasa aérea (Levitt., 1980; Schultz., 2003; Vandeleur et al.,
105 2009).

106 Se analizaron las diferentes respuestas fisiológicas de individuos de nuestra colección de
107 germoplasma de vides naturalizadas del Norte de Chile, para determinar qué
108 mecanismos/estrategias utilizan estas plantas para adaptarse a las diferentes situaciones de
109 estrés, que utilizamos. Evaluamos mediante el uso de parámetros fisiológicos y
110 arquitecturales en cuatro genotipos de vides provenientes de zonas áridas y semiáridas del
111 norte de Chile utilizando un sistema de mini-rizotrones.

112

113

114

115

116

117

118 **Materiales y métodos**

119 Material Vegetal

120 Se analizaron cuatro genotipos de vides colectados en la zona norte de Chile (18°S a 32°S,
121 72°W a 70°W), los cuales fueron seleccionados por su mayor crecimiento al ser sometidas
122 a estrés hídrico aplicado en cultivo *in vitro*:

123 Genotipo 148 y 134: Colectados en la región de Tarapacá

124 Genotipo 10: Colectado en la región de Atacama

125 Genotipo 93: Colectado en la región de Coquimbo

126 Se utilizó material clonal de 8 meses, proveniente de cultivo *in vitro*. El proceso de
127 micropropagación consistió en 3 etapas: establecimiento, crecimiento y enraizamiento, cada
128 una de un mes, utilizando un medio de cultivo MS modificado (Murashige and Skoog.,
129 1962). Las plántulas permanecieron en un cuarto de crecimiento en condiciones controladas
130 y constantes (16 horas de luz, temperatura promedio de 24°C y humedad relativa 70%).
131 Una vez que las plantas formaron raíces *in vitro*, se procedió a su transplante y aclimatación
132 en un sustrato inerte (turba/perlita 1:1), complementado con una solución nutritiva de MS al
133 0,5X. Durante esta fase de aclimatación, las plantas fueron transplantadas a un contenedor
134 cerrado, el cual se fue adaptando gradualmente a condiciones *ex vitro* durante 5 semanas.
135 Finalmente, las plantas enraizadas fueron instaladas en mini-rizotrones, conformados por
136 dos vidrios de 37 cm x 30 cm con sustrato inerte (turba/perlita 1:1). Se instalaron dos
137 plantas del mismo genotipo por mini-rizotrón, separadas por una banda de hule para evitar
138 que sus raíces se entrelazaran. Los mini-rizotrones se instalaron en contenedores plásticos

139 cerrados. Las plantas se cultivaron durante una semana antes de comenzar con la aplicación
140 de los diferentes tratamientos de riego deficitario

141 **Tratamiento de estrés por sequía.**

142 El estrés hídrico se realizó mediante dos tratamientos de riego deficitario: estrés hídrico
143 leve (T1, 60% del contenido hídrico a capacidad de campo), estrés hídrico severo (T2, 40%
144 del contenido hídrico a capacidad de campo), y los controles respectivos a capacidad de
145 campo (T0), con un diseño completamente aleatorizado. Para determinar la cantidad de
146 riego a utilizar, se realizó, previamente, un ensayo para registrar el contenido relativo de
147 agua del sustrato en los mini-rizotrones durante 35 días y consistió en dos tratamientos de
148 riego, un control con riego semanal a capacidad de campo y un tratamiento de sequía
149 absoluta, monitoreados por sondas ECH2O (EC-20, USA). Esto permitió determinar que la
150 cantidad de agua suficiente para mantener el rizotróon a capacidad de campo fueron 55 ml
151 por semana. Por tanto, el estrés leve fue aplicado mediante riego semanal de 22 ml de agua
152 destilada, y el estrés severo fue un riego mensual de 55 ml de agua destilada. Por cada
153 genotipo se analizaron 18 plantas divididas en tres tratamientos con 6 repeticiones por
154 tratamiento.

155 **Parámetros evaluados**

156 Una vez finalizado el ensayo, se midió la sobrevivencia de las plantas en los diversos
157 tratamientos de estrés hídrico transcurridos tres meses. La evaluación morfométrica se
158 realizó midiendo la distancia entre nudos (cm), longitud de tallo (cm), abscisión foliar, cada
159 15 días en la parte aérea y longitud de raíz (cm) final.

160 El potencial hídrico (Ψ_h) se evaluó mediante psicrómetro y una termocupla cada 15 días,
161 que permitió determinar la evapotranspiración de la hoja mediante el principio de Peltier
162 (Busso., 2008).

163 La medición de fotosíntesis se realizó mediante un equipo de intercambio gaseoso IRGA
164 (Licor-6400, USA). La evaluación de este parámetro fue realizada cada 15 días durante la
165 duración del ensayo.

166 Extracción RNA

167 Se utilizó un protocolo de extracción descrito previamente (Zeng and Yang., 2002),
168 moliendo 100 mg de tejido vegetal en nitrógeno líquido, usando un buffer de extracción
169 (2% CTAB, 2% PVP, 300 mM Tris-HCl (pH 8), 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 0,05%
170 espermidina y 2% β - mercaptoetanol). Una vez obtenido el RNA se utilizó *DNAse* I para
171 eliminar el DNA genómico, posteriormente columnas de purificación total de RNA (Ultra
172 CleanPlant RNA isolation kit). La cuantificación se llevó a cabo mediante un
173 espectrofotómetro NanoDrop™ 1000. Para determinar la integridad del RNA, se realizó
174 electroforesis en gel de agarosa bajo condiciones denaturantes. La transcripción reversa de
175 RNA en cDNA se realizó mediante el uso del kit High Capacity cDNA RT de Applied
176 Biosystems. Posteriormente, el cDNA fue almacenado a -20°C hasta su utilización
177 posterior.

178 Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR

179 Se obtuvieron tejidos de plantas control y tratadas al inicio del experimento, 14 y 35 días,
180 colectando un pool de hojas por cada tratamiento y genotipo. La cuantificación se realizó
181 en términos relativos, expresando el cambio en los niveles de expresión de RNAm a partir
182 del cDNA. El nivel de expresión de los genes inducibles de vid *NCED1*, *NCED2* y *GDH*,

183 más el gen Ubiquitina usado como referencia (housekeeping), analizado para los diferentes
184 tratamientos. Las secuencias de los partidores se indican a continuación:

185 *NCED1* (Hopper, 2007):

186 VvNCED1F: 5'GCAGAGGACGAGAGTGTAAGGA-3'

187 VvNCED1R: 5'GCAGAGTAAAAACACATGAAGCTAGTG-3'

188 *NCED2* (Savazzini et al., 2005):

189 VvNCED2F: 5'GAAGACTTGGCAAATCAAGCTTAGA3'

190 VvNCED2R: 5'GCTGAGCTCCAATTCTACCG3'

191 *GDH* (Skopelitis D. et al., 2006):

192 Vv GDHF: 5'CGACGTCCTGGAGCTGTTA3'

193 Vv GDHR: 5'GTGATCTCCGCCACTGAAAT3'

194 *UBI*, (Bogs et al., 2005):

195 VvUbi1F: 5'GTGGTATTATTGAGCCATCCTT-3'

196 VvUbi1R: 5'AACCTCCAATCCAGTCATCTAC-3'

197 Para las reacciones se utilizaron condiciones descritas previamente (Ruiz-Carrasco et al.,
198 2011). Los valores del umbral de Ciclo (Ct) fueron obtenidos y analizados mediante el
199 método $2^{-\Delta\Delta CT}$. La relación de expresión relativa (log2) entre cada gen de interés y el gen
200 referencia, y las veces de cambio (FC) entre muestras tratadas versus los controles
201 correspondientes, fueron calculadas a partir de las eficiencias del qRT-PCR y la desviación

202 del punto de detección utilizando el modelo matemático de Pfaffl (2001). Los datos
203 obtenidos fueron los promedios (+/- S.D.) de tres replicas biológicas.

204 Análisis estadístico

205 Los parámetros morfométricos así como capacidad fotosintética, potencial hídrico y tasa de
206 crecimiento relativo fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA)
207 factorial.. Previamente se evaluó la normalidad de los datos y la homogeneidad de la
208 varianza mediante los test Shapiro-Wilks y Bartlett, respectivamente (Sokal y Rohlf, 1995).
209 Las variables de sobrevivencia y abscisión fueron analizadas mediante un modelo lineal
210 generalizado debido a que los datos no cumplían los principales supuestos. Las pruebas de
211 distribución aplicada fue Poisson.

212

213 **Resultados**

214 Sobrevivencia de plantas

215 La sobrevivencia de plantas medida al final del ensayo mostró que el efecto de tolerancia
216 de los genotipos se vio afectado de manera significativa solo por el tratamiento aplicado,
217 específicamente el tratamiento de estrés hídrico severo ($p = 0,016401$). No existió efecto
218 dado por los genotipos ni de la interacción entre genotipo y tratamiento (Tabla 1; Figura 1).

219

220 Longitud de tallo

221 La longitud de tallo fue significativamente diferente entre los tratamientos ($F_{59,1} = 29.2184$;
222 $p < 0.01$), no así entre los genotipos ($F_{59,2} = 1.5507$; $p = 0.210755$). La interacción
223 tratamiento-genotipo también fue significativa ($F_{59, 5} = 7,8563$; $p \leq 0,0001$). Las mayores
224 diferencias se dieron entre el control y el estrés severo. Se presentaron diferencias entre los
225 genotipos pero sólo en tratamiento control (Figura 2A).

226

227 Longitud de raíz

228 Este parámetro mostró un efecto significativo dependiente del genotipo ($F_{59, 2} = 4.615$; $p <$
229 0.01), y la interacción con tratamiento ($F_{59, 5} = 3,804$; $p < 0.01$), no así por el tratamiento
230 ($F_{59, 1} = 2.502$; $p = 0.090454$). Diferencias significativas entre los genotipos y los
231 tratamientos se presentan en la Figura 2B, en donde los genotipos 93 y 134 presentaron los
232 mayores cambios en respuesta al estrés severo, y los genotipos 10 y 93 presentaron una
233 variación menor. La mayor longitud radical se observó en el genotipo 148 en el tratamiento
234 control, pero, a medida que el nivel de estrés aumentó, dicho genotipo presentó menor
235 desarrollo radical (Fig. 2B). En tanto, el genotipo 134 incrementó su longitud radical, tanto
236 en estrés moderado como severo.

237

238 Tasa elongación relativa del tallo

239 El análisis mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{59, 1} = 29.2184$; $p <$
240 0.01) y la interacción Tratamiento x Genotipo ($F_{59, 5} = 7.8563$; $p < 0,01$). Esta respuesta no
241 estuvo determinada por el genotipo ($F_{59, 2} = 1.5507$; $p = 0.210755$). La mayor diferencia se
242 determinó entre el control y el estrés severo. Los genotipos 134 y 148 mostraron una
243 tendencia de disminución en la tasa de crecimiento a medida que el tratamiento de estrés
244 fue más severo. El genotipo 93 no mostró diferencias entre control y estrés leve, pero ante
245 un estrés severo disminuyó dicha tasa de la misma manera que el resto de los genotipos. El
246 genotipo 10 presentó un aumento en su crecimiento en el tratamiento de estrés leve, pero
247 sin presentar diferencias entre control y estrés severo (Fig. 3C).

248

249 Distancia entrenudos

250 La distancia de entrenudos varió de manera significativa entre los tratamientos ($F_{59, 1} =$
251 6.411 ; $p < 0.01$), de manera independiente a la variación observada entre genotipos ($F_{59, 2}$
252 $=17.718$; $p < 0.01$). La mayor diferencia se registró entre los tratamientos moderado y
253 severo. En los genotipos, la mayor diferencia significativa se observó entre los genotipos
254 148 y 10, y la menor diferencia se observó entre el genotipo 10 y 134. Entre los genotipos
255 93, 134 y 148 no existieron diferencias significativas (Fig. 2C).

256

257 Fotosíntesis

258 La tasa fotosintética a radiación saturante (A_{max}) fue significativamente mayor al considerar
259 el tratamiento ($F_{59, 1} = 20.1723$; $p < 0.01$), que al comparar entre genotipos ($F_{59, 2} = 4.2443$;
260 $p < 0.01$), y no se obtuvo una diferencia significativa en la interacción de estos factores. La
261 mayor diferencia significativa se verificó entre el control y el estrés severo.
262 Adicionalmente, se observó una disminución significativa en la tasa fotosintética en los
263 genotipos 134 y 148, siendo el 134 el de mayor desempeño fotosintético (Fig. 3A). La tasa
264 fotosintética disminuyó solamente en los genotipos en el control (Fig. 3A).

265

266 Potencial hídrico

267 El potencial hídrico (Ψ) fue significativamente menor en el estrés severo en relación al
268 control y al estrés moderado. Entre estos dos últimos tratamientos no existieron diferencias
269 estadísticamente significativas. Dicha respuesta fue influenciada tanto por el factor
270 genotipo ($F_{59, 1} = 378.7325$; $p < 0.01$), el tratamiento ($F_{59, 1} = 43.3690$; $p < 0.01$) y la
271 interacción entre ambos ($F_{59, 5} = 43.3690$; $p < 0.01$). El mayor contraste significativo se
272 registró con el genotipo 10, que mostró diferencias con todos los otros genotipos en estudio

273 (Fig. 3B), ya que conservó su potencial hídrico independiente del tratamiento de estrés
274 hídrico y no disminuyó en respuesta a dicho estrés, como se observó en los otros genotipos.

275

276 **Abscisión foliar**

277 El desempeño de los genotipos en relación al parámetro de abscisión foliar se presenta en
278 Tabla 2. Tanto en control como estrés leve, la pérdida foliar fue prácticamente nula. Por el
279 contrario, en el tratamiento de estrés severo se observó un efecto neto sobre el porcentaje de
280 pérdida foliar, en donde destaca el genotipo 134 por presentar solo un 40% de pérdida, en
281 relación a los 3 genotipos restantes que superaron el 60%.

282

283 **Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR**

284 Al considerar la expresión de genes inducibles por estrés hídrico, *NCED1* se indujo para el
285 genotipo 10 a los 35 días de estrés. En tanto *NCED2* mostró un nivel de expresión basal a
286 los 14 días en los genotipos 10,93 y 148, pero el genotipo 134 si mostró este gen inducido.
287 Luego a los 35 días el *NCED2* se vio inducido en los genotipos de más al norte (134 y 148).
288 En el caso de *GDH*, sufrió una inducción solo a los 35 días en tres de los cuatro genotipos
289 analizados, siendo el genotipo 148 el que no sufrió cambios transcripcionales para este gen.

290

291 **Discusión**

292 Mediante una evaluación de diferentes parámetros funcionales, se demostró la adaptación y
293 desempeño diferencial de un grupo de genotipos de vides ante situaciones de estrés hídrico
294 inducido. Los genotipos enfrentados a tratamientos de riego presentaron variaciones en los
295 parámetros evaluados. El genotipo 134 fue el que obtuvo un mejor desempeño en
296 parámetros de crecimiento, tanto en largo de tallo como en longitud de raíz, lo que fue

297 concomitante a la tasa de fotosíntesis registrada, ya que también fue el que presentó el
298 mayor intercambio gaseoso. Es interesante destacar que, en este parámetro, a diferencia de
299 lo que se esperaba, los controles tuvieron una menor tasa fotosintética. La fotosíntesis es
300 uno de los procesos más importantes en la productividad del mundo vegetal y la habilidad
301 para mantener la tasa de asimilación de CO₂ en condiciones de estrés ambiental es
302 fundamental para el crecimiento y la producción de la planta (Lawlor, 1995). Dicha tasa de
303 asimilación se vio reducida por el déficit hídrico, principalmente a consecuencia del cierre
304 estomático, no obstante, el aparato fotosintético fue resistente a los procesos de
305 deshidratación.

306 En un ambiente semiárido, en el cual se pueden llegar a conjugar todos los factores
307 ambientales promotores de estrés de manera sinérgica, la asimilación de CO₂ debe
308 establecer un compromiso entre el gasto hídrico, la fijación de materia y energía y la
309 disipación de la energía excesiva, aplicando todos estos mecanismos para poder mantener
310 la productividad de la especie. En consecuencia, la planta para poder mantener niveles
311 similares de fotosíntesis en diferentes riegos deficitarios, puede recurrir a un mecanismo de
312 abscisión foliar, con el objetivo de reducir su área de interacción con el ambiente. Las
313 plantas pierden agua principalmente a través de la superficie foliar, provocando que a
314 mayor superficie foliar, mayor será la pérdida de agua. En este sentido, la reducción de la
315 superficie transpiratoria estableció un buen control de esta pérdida. Se han descrito
316 diferentes formas de reducción, a nivel foliar podemos hablar de enrollamiento o pliegue
317 para reducir la superficie expuesta y de abscisión foliar (Blum et al., 1989). La idea es
318 reducir la captación de energía (Elheringer and Werk., 1986), que implica una menor tasa
319 de transpiración por unidad de superficie transpirante. La morfología de la cubierta vegetal
320 también tiene influencia: un follaje compacto y denso permite una mayor retención de agua

321 por efecto de la ventilación y el balance térmico (Nobel, 1991). El genotipo 148 evidenció
322 un rendimiento directamente proporcional a la cantidad de agua suministrada, en la mayoría
323 de los parámetros morfométricos y fisiológicos presentó un comportamiento similar a la
324 mayoría de las especies sensibles a la sequía (Cramer et al., 2007; Liakopoulos et al., 2006;
325 Tattersall et al., 2007).

326 En relación a los diferentes tratamientos aplicados a los genotipos, se sabe que la respuesta
327 de la planta al estrés es un proceso dinámico que depende de la intensidad del estrés y su
328 duración, y que consta de varias etapas en la respuesta de la planta. Esto indicaría por qué
329 el genotipo por sí solo no es determinante para la sobrevivencia. Las mayores diferencias
330 entre los tratamientos, se evidenciaron entre el control y el estrés severo, siendo el estrés
331 moderado fue prácticamente poco perceptible para los genotipos en la mayoría de las
332 variables evaluadas.

333 Por otro lado, el potencial hídrico fue una respuesta influenciada por los genotipos y el
334 tratamiento, y de manera interesante el genotipo 10 conservó su potencial hídrico y no
335 disminuyó dicho potencial como en los otros 3 genotipos analizados. Esto explicaría
336 solamente en parte el desempeño del genotipo 10. Los mecanismos por los cuales el estrés
337 hídrico induce el cierre estomático, puede ser a través de señales hidráulicas, hormonales o
338 una combinación de ambas (Flexas et al., 1998). Aunque el cierre estomático suponga una
339 gran ventaja a la hora de evitar pérdidas de agua, tiene como contrapartida una reducción en
340 la captación de CO₂ y el aumento de la temperatura de la hoja. Esto puede conducir a la
341 inanición de la planta y a daños en la estructura celular, disminuyendo su crecimiento y
342 biomasa. Por esta razón la respuesta compensatoria de los genotipos 93, 134 y 148 podría
343 considerarse un mecanismo para otorgar a la planta tolerancia a periodos prolongados de
344 estrés hídrico. La longitud radicular sería también una respuesta compensatoria ya que los

345 tipos de adaptaciones en plantas isohídricas, presentan una estrategia basada en la
346 reducción de pérdidas, implicando la modificación de su sistema radical. Esta respuesta la
347 podemos encontrar en el genotipo 148, que disminuyó la longitud radicular (Levitt, 1980;
348 Schultz, 2003; Vandeleur et al., 2009). La estrategia de plantas anisohídricas, donde los
349 efectos de la sequía se reducen al incrementar la absorción de agua, con tasas de
350 fotosíntesis y crecimiento mayores que plantas isohídricas, sería la estrategia presente en el
351 genotipo 134. Estos aumentos en las variables de desempeño cuya consecuencia fue la
352 modificación en la biomasa radicular, buscó mantener tanto las tasas de crecimiento como
353 las de fotosíntesis (Levitt, 1980; Schultz, 2003; Vandeleur et al., 2009).

354 La respuesta molecular de las plantas al estrés, mediante la modificación de la expresión de
355 genes durante el déficit hídrico, se verificó analizando el comportamiento transcripcional de
356 la primera enzima relacionada directamente con la síntesis de ABA, la 9-cis-
357 epoxicarotenoide dioxigenasa (*NCED*), localizada en los plástidos y que rompe un
358 precursor epoxicarotenoide para formar xantosina. Se ha propuesto que la *NCED* es la
359 principal enzima regulatoria debido a que su expresión está correlacionada con los niveles
360 endógenos de ABA. Los genes *NCED1* y *NCED2* son genes de respuesta sobre-regulatoria
361 transitoria (Castellarin et al., 2007). La diferencia observada se presentó a los 15 días para
362 *NCED1* en el genotipo 10, donde el gen se vió inducido desde los primeros días de
363 tratamiento (Schwartz et al., 2003). Para los genotipos 93, 134 y 148 en cambio se observó
364 una expresión basal para este gen. Para el gen *NCED2* la expresión se esperaba similar al
365 *NCED1* por estar relacionados con el metabolismo de ABA (Yu et al., 2006). Pero *NCED2*
366 se vió inducido solo en los genotipos de zonas áridas. En el genotipo 134 se indujo en
367 ambos tiempos analizados, lo que podría significar que este genotipo tiene una producción
368 de ABA previa a su etapa de estrés, por lo tanto la disminución de riego la afecta de menos

369 manera que el resto de los genotipos, otorgándole mayor tolerancia a situaciones de estrés
370 hídrico. A diferencia del genotipo 148 que a medida que su nivel de estrés aumenta, el gen
371 se va viendo mas inducido, otorgándole tolerancia pero más tardía. Para el gen GDH, a
372 medida que el nivel de estrés aumenta el gen se reprime (Cramer et al., 2007). Los
373 genotipos 10, 93 y 134 presentaron al gen inducido, a medida que el estrés hídrico fue
374 mayor. Esto podría indicar que para estos genotipos el estrés no fue perceptible, a
375 diferencia del genotipo 148 que siempre mantuvo este gen reprimido, por lo tanto percibió
376 el estrés hídrico a los pocos días de empezado el tratamiento.

377 Por lo tanto considerando todos estos parámetros fisiológicos, morfológicos y moleculares
378 evaluados, podemos decir, que el genotipo que presenta un comportamiento tolerante al
379 estrés hídrico es el genotipos 134 proveniente de la zona árida de nuestro país. Si bien, el
380 genotipo 148 también era de la misma zona, sus respuestas no fueron suficientemente
381 efectivas para tolerar el estrés hídrico inducido que le provocamos.

382 Por otra parte de los cuatro genotipos también podemos mencionar que los genotipos 10 y
383 93 mostraron un desempeño fisiológico y morfológico deficiente, siendo los genotipos más
384 sensibles a condiciones de estrés hídrico inducido.

385 De esta manera, podemos concluir que el genotipo 134 es el más tolerante de los evaluados
386 en este ensayo, y será considerado para futuras evaluaciones de otros tipos de estrés
387 abióticos. Con el fin de determinar si es un genotipo altamente tolerante a estrés hídrico,
388 salino, térmico, etc. Que son las condiciones que ya se están manifestando en esta región
389 productora de uva por los cambios climaticos, la minería y la extrema sequía que los afecta.

390

391 **Agradecimientos**

392 A.Z.-S. agradece a la carrera de Biotecnología de la Universidad de La Frontera por las
393 facilidades otorgadas para el desarrollo de tesis en nuestro laboratorio. Este artículo forma
394 parte de las actividades de investigación del proyecto Innova Chile 05CR11PAT-19 a A.Z.-
395 S.

396

397 RESUMEN

398 El cultivo de la Vid (*Vitis vinifera*) ha sufrido paulatinas disminuciones de precipitaciones y
399 prolongados periodos de sequía, siendo una de las principales problemáticas que afectan la
400 productividad en el norte del país. Con objeto de analizar el potencial de tolerancia al estrés
401 por sequía en Vid, se estudiaron 4 genotipos naturalizados colectados en zonas áridas y
402 semiáridas del país, mediante el uso de mini-rizotrones, en donde se evaluaron las
403 respuestas de la planta en variables morfométricas tanto de la parte aérea de la planta como
404 de raíces, incluidas biomasa aérea, crecimiento y arquitectura radicular; fisiológicas como
405 medición del potencial hídrico y fotosíntesis neta de la planta. Utilizando material clonal
406 provenientes de cultivo *in vitro*, 4 genotipos fueron sometieron a tres diferentes niveles de
407 riego deficitario (estrés moderado y severo) con el fin de observar su respuesta fisiológica
408 frente al control, bajo un diseño completamente aleatorio. La duración del experimento fue
409 3 meses, observando que los genotipos provenientes de las zonas mas áridas han
410 desarrollado mecanismos de tolerancia a niveles de estrés hídrico, resultando que variables
411 como longitud radicular, largo de internudos, fotosíntesis y potencial hídrico respondieron
412 de manera diferenciada entre los genotipos estudiados, demostrando que el genotipo 134 ha
413 presentado mejores respuestas al déficit hídrico, a diferencia del genotipo 93 que ha
414 mostrado ser el menos tolerante, en relación con su procedencia de una región menos árida.

415

416 Palabras Claves: Estrés Hídrico, desarrollo radicular, respuestas fisiológicas, *Vitis vinifera*.

417

418

419 **References**

- 420 Blum A., Mayer J., Golan G. (1989) Agronomic and physiological assessments of genotypic
421 variation for drought resistance in sorghum. *Australian Journal of Agricultural Research*
422 40:49-61.
- 423 Bogs J., Downey M.O., Harvey J.S., Ashton A.R., Tanner G.J., Robinson S.P. (2005)
424 Proanthocyanidin Synthesis and Expression of Genes Encoding Leucoanthocyanidin
425 Reductase and Anthocyanidin Reductase in Developing Grape Berries and Grapevine
426 Leaves. *Plant Physiology* 139:652-663.
- 427 Busso C. (2008) Uso de la cámara de presión y los psicrómetros a termocupla en la determinación
428 de las relaciones hídricas en tejidos vegetales. *Phyton (Buenos Aires)* 77:327-350.
- 429 Castellarin S.D., Pfeiffer A., Sivilotti P., Degan M., Peterlunger E., Di Gaspero G. (2007)
430 Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under
431 seasonal water deficit. *Plant, Cell & Environment* 30:1381-1399. DOI: 10.1111/j.1365-
432 3040.2007.01716.x.
- 433 Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation
434 mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103:551-560. DOI:
435 10.1093/aob/mcn125.
- 436 Cramer G., Ergül A., Grimplet J., Tillett R., Tattersall E., Bohlman M., Vincent D., Sonderegger J.,
437 Evans J., Osborne C., Quilici D., Schlauch K., Schooley D., Cushman J. (2007) Water and
438 salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles.
439 *Functional & Integrative Genomics* 7:111-134. DOI: 10.1007/s10142-006-0039-y.
- 440 Deluc L.G., Quilici D.R., Decendit A., Grimplet J., Wheatley M.D., Schlauch K.A., Mérrillon J.M.,
441 Cushman J.C., Cramer G.R. (2009) Water deficit alters differentially metabolic pathways
442 affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and
443 Chardonnay. *BMC genomics* 10:212.

444 Elheringer J.R., Werk K.S. (1986) Modifications of solar-radiation absorption patterns and
445 implications for carbon gain at the leaf level, in: T. J. Givnish (Ed.), *On the Economy of*
446 *Plant Form and Function*, Cambridge University Press, Londres. pp. 57-81.

447 Flexas J., Escalona J.M., Medrano H. (1998) Down-regulation of photosynthesis by drought under
448 field conditions in grapevine leaves. *Functional Plant Biology* 25:893-900. DOI:
449 <http://dx.doi.org/10.1071/PP98054>.

450 Gaudillère J.P., Van Leeuwen C., Ollat N. (2002) Carbon isotope composition of sugars in
451 grapevine, an integrated indicator of vineyard water status. *Journal of Experimental Botany*
452 53:757-763. DOI: 10.1093/jexbot/53.369.757.

453 Gillaspay G., Ben-David H., Gruissem W. (1993) Fruits: A Developmental Perspective. *The Plant*
454 5:1439-1451. DOI: 10.1105/tpc.5.10.1439.

455 Grimplet J., Deluc L.G., Cramer G.R., Cushman J.C. (2008) Integrating functional genomics with
456 abiotic stress responses in wine grape. in: M. A. Jenks, et al. (Eds.), *In Advances in*
457 *Molecular Breeding towards Salinity and*
458 *Drought Tolerance*, Springer Verlag, Holanda. pp. 643-668.

459 Howden S.M., Soussana J.-F., Tubiello F.N., Chhetri N., Dunlop M., Meinke H. (2007) Adapting
460 agriculture to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
461 104:19691-19696. DOI: 10.1073/pnas.0701890104.

462 Kramer P.J., Boyer J.S. (1995) *Water relations of plants and soils* Academic Press, San Diego.

463 Lambers H., Chapin F.S., Pons T.L. (1998) *Plant Physiological Ecology* Springer, Nueva York.

464 Lawlor D.W. (1995) The effects of water deficit on photosynthesis, in: N. Smirnoff (Ed.),
465 *Environment and plant metabolism flexibility and acclimation.*, BIOS Scientific Publishers,
466 Oxford. pp. 129–160.

467 Levitt J. (1980) *Responses of Plants to Environmental Stresses: Water, radiation, salt, and other*
468 *stresses* Academic Press.

469 Liakopoulos G., Nikolopoulos D., Klouvatou A., Vekkos K.-A., Manetas Y., Karabourniotis G.
470 (2006) The Photoprotective Role of Epidermal Anthocyanins and Surface Pubescence in
471 Young Leaves of Grapevine. *Annals of Botany* 98:257-265. DOI: 10.1093/aob/mcl097.

472 McKersie B.D., Leshem Y.Y. (1994) *Stress and stress coping in cultivated plants* Kluwer Academic
473 Publishers.

474 Morgan J.M. (1984) Osmoregulation and Water Stress in Higher Plants. *Annual Review of Plant*
475 *Physiology* 35:299-319. DOI: doi:10.1146/annurev.pp.35.060184.001503.

476 Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco
477 tissue cultures. *Physiology Plant* 15:473-497.

478 Nobel P.S. (1991) *Physicochemical and Environmental Plant Physiology* Academic Press, Inc., San
479 Diego.

480 ODEPA, oficina de estudio y politicas agrarias, 2012. <http://www.odepa.gob.cl>

481 Pareek A., Sopory S.K., Bohnert H.J., Govindjee. (2010) *Abiotic Stress Adaptation in Plants:*
482 *Physiological, Molecular and Genomic Foundation* Springer.

483 Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
484 *Nucleic Acids Research* 29:2002-2007.

485 Savazzini F., Dalla Costa L., Martinelli L. (2005) Evaluation of exogenous DNA by quantitative
486 real-time PCR in transgenic grape.

487 Schonfeld M.A., Johnson R.C., Carver B.F., Mornhinweg D.W. (1988) Water Relations In Winter
488 Wheat As Drought Resistance Indicators. *Crop Sci.* 28:526-531. DOI:
489 10.2135/cropsci1988.0011183X002800030021x.

490 Schultz R.A. (2003) A method to relate initial elastic stress to fault population strains. *Geophys.*
491 *Res. Lett.* 30:1593. DOI: 10.1029/2002gl016681.

492 Skopelitis D. K., Paranychianakis N.V., Paschalidis K.A., Pliakonis E.D., Delis I.D., Yakoumakis
493 D.I., Kouvarakis A., Papadakis A.K., Stephanou E.G., Roubelakis-Angelakis K.A. (2006)
494 *Abiotic Stress Generates ROS That Signal Expression of Anionic Glutamate*

495 Dehydrogenases to Form Glutamate for Proline Synthesis in Tobacco and Grapevine. .
496 Plant Cell 18:2767–2781.

497 Tattersall E., Grimplet J., DeLuc L., Wheatley M., Vincent D., Osborne C., Ergül A., Lomen E.,
498 Blank R., Schlauch K., Cushman J., Cramer G. (2007) Transcript abundance profiles reveal
499 larger and more complex responses of grapevine to chilling compared to osmotic and
500 salinity stress. Functional & Integrative Genomics 7:317-333. DOI: 10.1007/s10142-007-
501 0051-x.

502 Turner N.C., Jones M.M. (1980) Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and
503 evaluation, in: N. C. Turner and P. J. Kramer (Eds.), Adaptation of plants to water and high
504 temperature stress, Wiley Inter Science, Nueva York. pp. 84-104.

505 Vandeleur R.K., Mayo G., Sheldon M.C., Gilliam M., Kaiser B.N., Tyerman S.D. (2009) The role
506 of PIP aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses
507 reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. Plant
508 Physiology 149:445-460.

509 Yu X.-C., Li M.-J., Gao G.-F., Feng H.-Z., Geng X.-Q., Peng C.-C., Zhu S.-Y., Wang X.-J., Shen
510 Y.-Y., Zhang D.-P. (2006) Abscisic Acid Stimulates a Calcium-Dependent Protein Kinase
511 in Grape Berry. Plant Physiology 140:558-579. DOI: 10.1104/pp.105.074971.

512

513

514

515 **Leyenda de Figuras**

516 **Figura 1.** Sobrevivencia de 4 genotipos naturalizados de *Vitis vinifera* en tratamiento
517 control, estrés hídrico moderado y severo, expresado en porcentaje.

518 Figure 1. Grapevine survival percentage in stress treatment measured in four *Vitis vinifera*
519 naturalized genotypes in control, moderate and severe drought stress.

520 **Figura 2.** Longitud tallo (A), longitud de raíz (B) y distancia de entrenudos (C), medidas en
521 centímetros, evaluada en 4 genotipos diferentes de *Vitis vinifera*, en control, estrés hídrico
522 moderado y severo. Se muestran los valores medios (± 2 SE).

523 Figure 2. Shoot length (A), root length (B) and internode distance (C), measured in
524 centimeters, assessed in 4 different genotypes of *Vitis vinifera*, in control, moderate and
525 severe drought stress. Shown are mean values (± 2 SE).

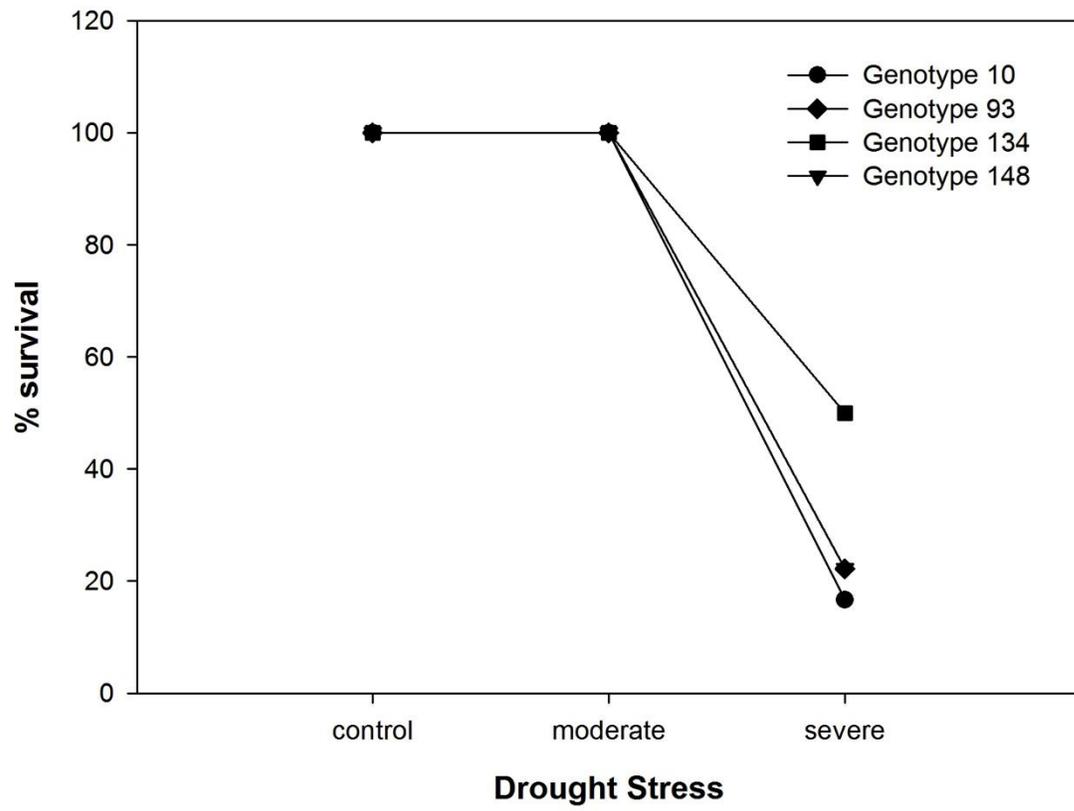
526 **Figura 3.** Tasa de fotosíntesis neta ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A), potencial hídrico (-MPa) (B) y tasa
527 de crecimiento relativo (cm) (C), medidas en 4 genotipos diferentes de *Vitis vinifera*, en
528 control, estrés hídrico moderado y severo. Se muestran los valores medios (± 2 EE).

529 Figure 3. Net photosynthetic rate ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A), water potential (-MPa) (B) and
530 relative growth rate (cm) (C), variable measurements in 4 different genotypes of *Vitis*
531 *vinifera*, in control, moderate and severe drought stress. Shown are mean values (± 2 SE).

532

533

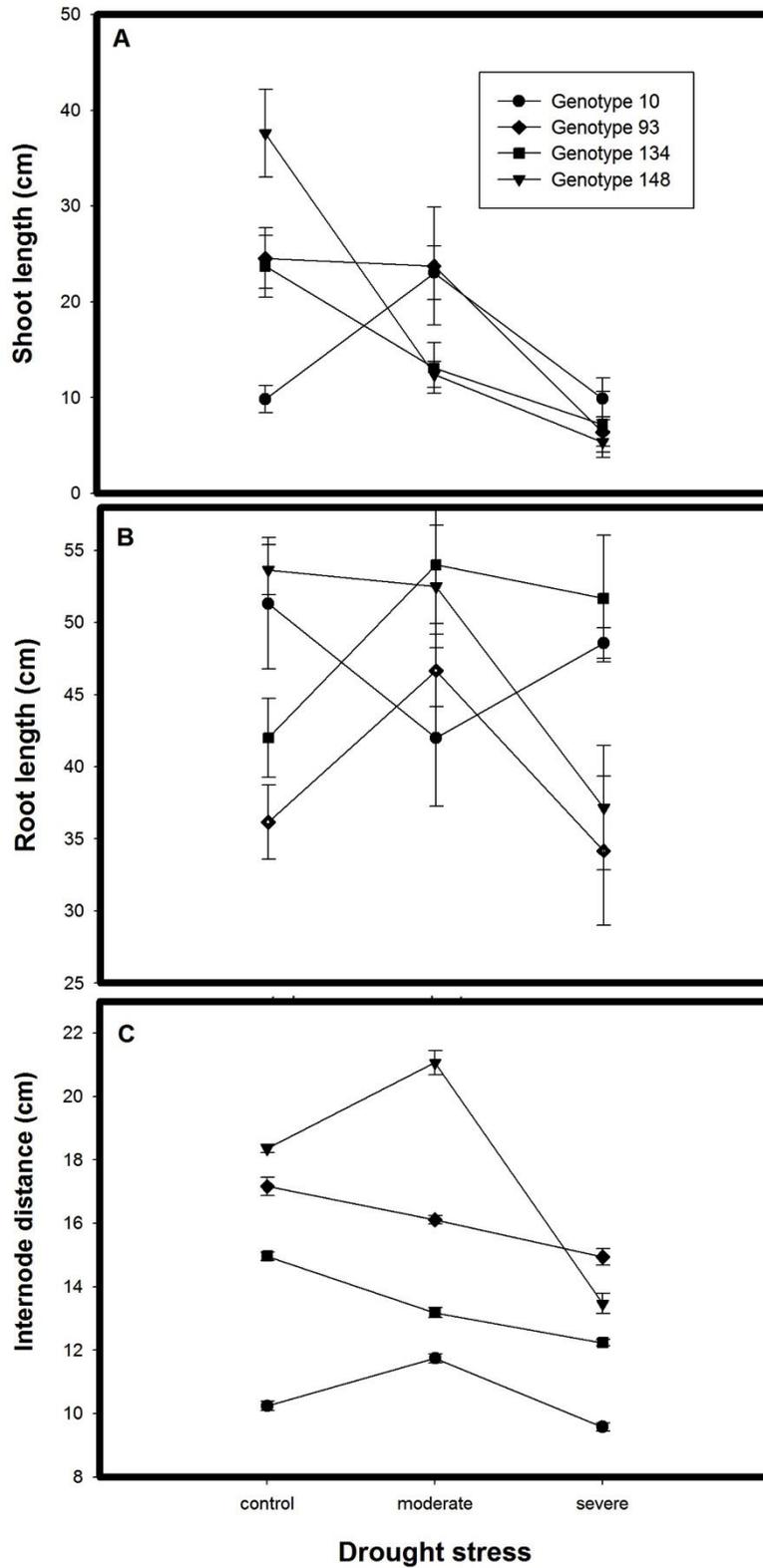
534 **Figure 1**

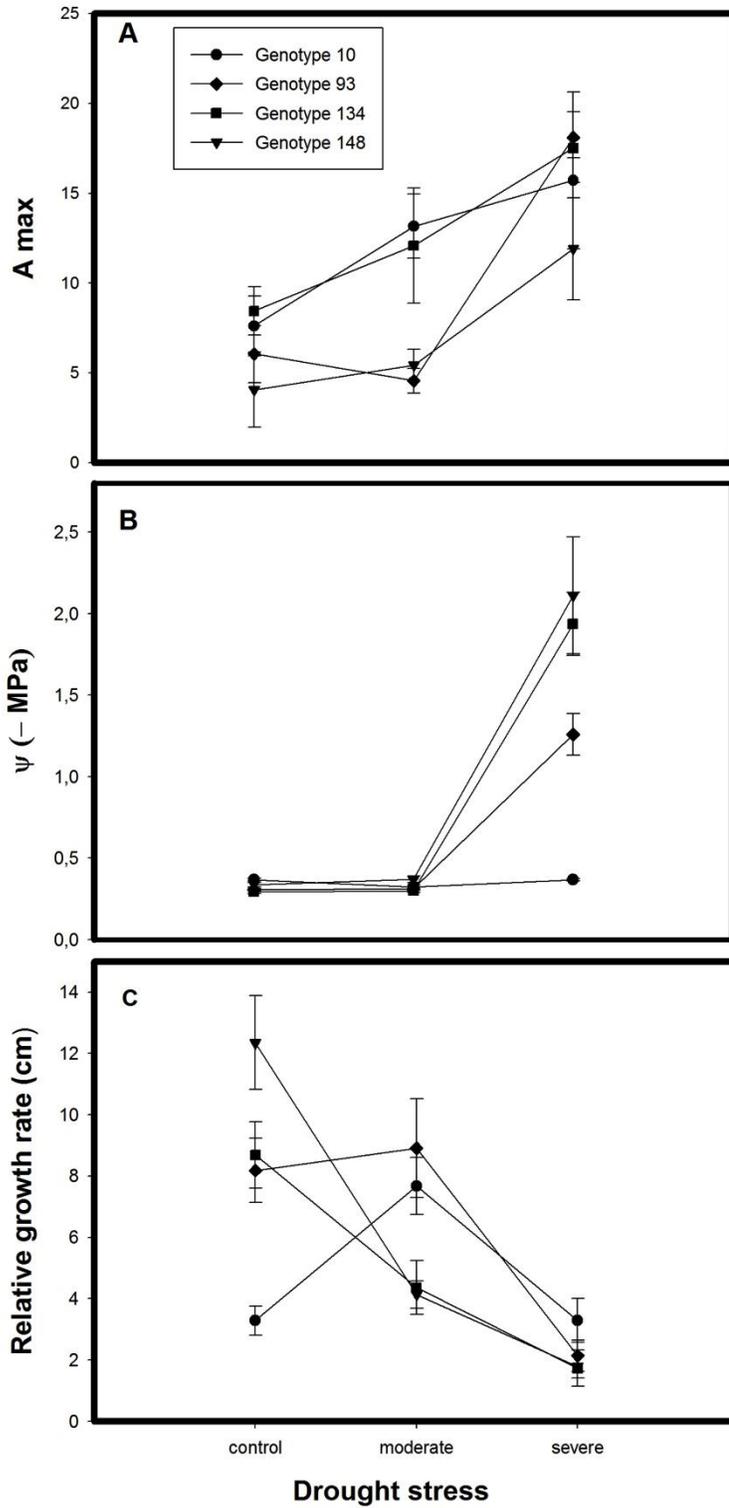


535

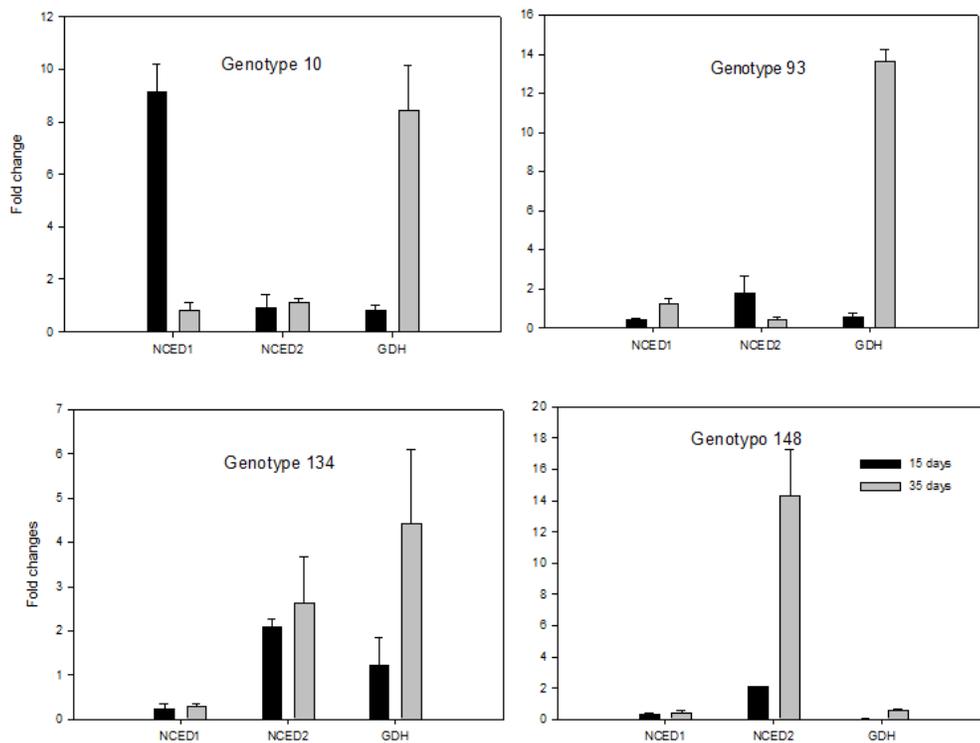
536

537





542 **Figure 4.**



543

544

545

546

547 **Leyendas de Tablas**

548 **Tabla 1. Evaluación del porcentaje de sobrevivencia de plantas en estrés severo.**

549 **Análisis estadístico del modelo lineal generalizado.**

550 **Table 1. Assessment of plant survival percentage in severe stress. Statistical analysis**

551 **of linear generalized model.**

552 **Tabla 2. Evaluación de abscisión foliar, en porcentajes de caída de hojas en**

553 **tratamiento de estrés severo. Análisis estadístico de modelo lineal generalizado.**

554 **Table 2. Leaf abscission, assessment rates falling leaves in treatment of severe stress.**

555 **Statistical analysis of linear generalized model.**

556

558 **Table 1**

Source of variation	Survival		
	d.f	Walds	p
genotype	3	0,605265	0,895226
treatment	2	8,220885	0,016401
Genotype*treatment	6	0,821608	0,991482

Tabla 2.

Source of variation	Leaf abscission		
	d.f	Walds	p
genotype	3	1,3882	0,708306
treatment	2	210,7547	0,000000
genotype*treatment	6	4,7998	0,569732

