

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**CAMBIOS MORFO-FISIOLÓGICOS EXPRESADOS EN GENOTIPOS DE
MEDICAGO SATIVA Y *MEDICAGO ALBOREA* TOLERANTES A SEQUÍA**

POR

NICOLÁS ANDRÉS MUÑOZ MANRÍQUEZ

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN - CHILE
2023**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CAMBIOS MORFO-FISIOLÓGICOS EXPRESADOS EN GENOTIPOS DE
MEDICAGO SATIVA Y *MEDICAGO ALBOREA* TOLERANTES A SEQUÍA**

POR

NICOLÁS ANDRÉS MUÑOZ MANRÍQUEZ

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN-CHILE
2023**

Aprobada por:

Profesor Asistente, Miguel Garriga C.

Lic. Biología, Dr. Cs. Agrarias.

Guía

Profesor Asistente, Macarena Gerding G.

Ing. Agrónomo, PhD en Microbiología.

Asesor

Investigador, Luis Inostroza F.

Ing. Agrónomo, Dr. Cs. Agropecuarias.

INIA Quilamapu.

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.

Ing. Agrónomo, Mg. Cs.

Decano

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen.....	1
Summary.....	1
Introducción.....	2
Materiales y Métodos.....	6
Resultados y Discusión.....	11
Conclusiones.....	25
Referencias.....	25

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Población, taxón al que pertenece y origen de los genotipos evaluados.....	6
Tabla 2 Características fisiológicas potencial xilemático (Ψ_x), conductancia estomática (gs), contenido de clorofila (Chl), contenido de antocinianas (Anth) e índice de balance de nitrógeno en la hoja (NBI) evaluadas a los 130 días después de siembra en poblaciones de <i>M. alborea</i> y <i>M. sativa</i> cultivadas en condiciones hídricas contrastantes. SEH: sin estrés hídrico y CEH: con estrés hídrico.....	14
Tabla 3 Características morfo-fisiológicas área foliar (AF), área foliar específica (AFE), diámetro de tallo (Dx) y temperatura del dosel (T°h) evaluadas a los 130 días después de siembra en poblaciones de <i>M. alborea</i> y <i>M. sativa</i> cultivadas en condiciones hídricas contrastantes. SEH: sin estrés hídrico y CEH: con estrés hídrico.....	15
Tabla 4 Características morfo-fisiológicas potencial xilemático (Ψ_x), conductancia estomática (gs), contenido de clorofila (Chl) y antocianinas (Anth), índice de balance de nitrógeno en la hoja (NBI), área foliar (AF), área foliar específica (AFE) y temperatura del dosel (T°h) evaluadas a los 174 días después de siembra en poblaciones de <i>M. alborea</i> y <i>M. sativa</i> cultivadas en condiciones hídricas contrastantes. SEH: sin estrés hídrico y CEH: con estrés hídrico.....	16
Tabla 5 Altura de planta (AP) y tasa de crecimiento relativo (TC) de poblaciones de <i>M. alborea</i> y <i>M. sativa</i> cultivadas en condiciones hídricas contrastantes. SEH: sin estrés hídrico y CEH: con estrés hídrico.....	17
Tabla 6 Producción de materia seca aérea total (MSaéreaT), materia seca de raíces finas (MSraícesf) y materia seca de raíz total (MSraízT) a los 174 días después de la siembra en poblaciones de <i>M. alborea</i> y <i>M. sativa</i> cultivadas en condiciones hídricas contrastantes. SEH: sin estrés hídrico y CEH: con estrés hídrico.....	19
Tabla 7 Diámetro de corona (Dcorona) y parámetros topológicos (RLD, densidad de la longitud de raíces; DBI, índice de	

	ramificación dicotómica y RLDfineroot, densidad de longitud de raíces finas) de poblaciones de <i>M. alborea</i> y <i>M. sativa</i> a los 174 días después de siembra cultivadas en condiciones hídricas contrastantes. SEH: sin estrés hídrico y CEH: con estrés hídrico.....	22
Tabla 8	Correlación de Pearson entre variables morfo-fisiológicas, biomasa y parámetros de arquitectura de raíz evaluadas en poblaciones de <i>Medicago sativa</i> y <i>Medicago alborea</i> en condiciones hídricas contrastantes.....	24

CAMBIOS MORFO-FISIOLÓGICOS EXPRESADOS EN GENOTIPOS DE *MEDICAGO SATIVA* Y *MEDICAGO ALBOREA* TOLERANTES A SEQUÍA.

MORPHO-PHYSIOLOGICAL CHANGES EXPRESSED IN DROUGHT TOLERANT *MEDICAGO SATIVA* AND *MEDICAGO ALBOREA* GENOTYPES.

Palabras índice adicionales: Alborea, estrés hídrico, arquitectura de raíz.

RESUMEN

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una forrajera que se utiliza como heno y para pastoreo debido a su alta productividad y valor alimenticio. A través del cruzamiento entre *M. sativa* x *M. arborea* se ha obtenido el híbrido inter-específico Alborea, el cual presenta un rendimiento sobresaliente en ambientes propensos a sequía. Considerando que la sequía es una de las limitantes ambientales más importantes para el crecimiento y rendimiento de los cultivos, se hace necesario evaluar el desempeño de diferentes genotipos de *Medicago alborea* y *Medicago sativa* en condiciones de déficit hídrico y establecer la relación entre los cambios en parámetros morfo-fisiológicos y la tolerancia a sequía. Para ello, se establecieron ocho poblaciones de alfalfa, en invernadero, bajo condiciones hídricas contrastantes. Se evaluaron variables morfo-fisiológicas, de producción de biomasa y parámetros de arquitectura de raíz. En general, las variables morfo-fisiológicas mostraron diferencias significativas entre los tratamientos de riego. Las plantas bajo estrés hídrico desarrollaron sistemas radicales más ramificados. La población más productiva fue APFG44669 y la de menor productividad Alta Sierra 2. Se concluye que las poblaciones estudiadas pueden modificar su expresión morfológica y fisiológica a nivel aéreo y también su arquitectura de raíz para aclimatarse a condiciones de estrés hídrico.

SUMMARY

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is a forage legume that is used as hay and for grazing due to its high productivity and nutritional value. By crossing *M. sativa* x *M. arborea*,

the inter-specific hybrid Alborea has been obtained, which shows outstanding performance in drought-prone environments. Considering that drought is one of the most important environmental constraints for crop growth and yield, it is necessary to evaluate the performance of different genotypes of *Medicago alborea* and *Medicago sativa* under water deficit conditions and to establish the relationship between changes in morpho-physiological traits and drought tolerance. For this purpose, eight alfalfa populations were established in a greenhouse under contrasting water conditions. Morpho-physiological traits, biomass production and root architecture parameters were evaluated. In general, morpho-physiological traits showed significant differences between irrigation treatments. Plants under water deficit developed more branched root systems. The most productive population was APFG44669 and the least productive was Alta Sierra 2. It is concluded that the studied populations can modify their morphological and physiological expression at the aerial level and also their root architecture to acclimatize to water stress conditions.

INTRODUCCIÓN

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una forrajera perenne de la familia de las leguminosas que se caracteriza por sus hojas trifoliadas y flores de color violeta. Presenta una raíz pivotante que profundiza en el suelo y un tallo de crecimiento erecto (Chavarría, 2001). También se conoce como "Reina de los forrajes" (Barnes *et al.*, 1988). Se usa como heno y para pastoreo debido a su alta productividad y valor alimenticio, pudiendo cosecharse varias veces durante la temporada de crecimiento (Lamm *et al.*, 2012).

La alfalfa se originó en el suroeste de Asia y se adapta a una amplia gama de climas (Barnes, 1980). A nivel mundial, esta especie se cultiva en condiciones climáticas diversas en cuanto a precipitación y fertilidad de suelo, así como con presencia o ausencia de agua de riego para complementar la producción (Humphries *et al.*, 2020). Es una de las especies forrajeras más cultivadas en regiones áridas y semiáridas (Huang *et al.*, 2018).

Según Soto (2000) la tolerancia de la alfalfa a altas temperaturas y sequía está dada a través de selección natural, ya que su hábitat de origen presenta veranos con altas temperaturas, secos y con baja humedad del aire. Estas plantas tienen la capacidad de absorber agua de las capas profundas del suelo a través de un sistema de raíces profundo (Zhu *et al.*, 2016; Sim *et al.*, 2017). En general, el sistema radical de la alfalfa es robusto y profundo (Odorizzi *et al.*, 2008) a diferencia de otras forrajeras como trébol rojo (*Trifolium pratense*) y trébol blanco (*Trifolium repens*), que poseen un sistema radical menos extenso (Annicchiarico *et al.*, 2015).

Asimismo, plantas con raíces profundas pueden absorber nutrientes de horizontes más profundos del suelo en suelos deficientes en nutrientes (McCulley *et al.*, 2004).

Desde una perspectiva genética, es una especie autotetraploide ($2n = 4x = 32$), de polinización cruzada y con herencia polisómica (Veronesi *et al.*, 2010). Pertenecer al complejo *M. sativa*–*falcata*, donde coexisten formas interfértiles diploides y tetraploides (Quirós y Bauchan, 1988).

La mayor parte de la variación genética en la alfalfa (incluida la adaptación a la sequía) se debe a eventos de domesticación y tetraploidización del diploide silvestre *M. sativa* subsp. *caerulea* (Humphries *et al.*, 2020).

Por otro lado, estudios en poblaciones de alfalfa mediante marcadores moleculares han demostrado que los genotipos domesticados contienen en promedio 31 % menos diversidad genética que el grupo silvestre (Muller, 2005).

Además, para su uso en condiciones de déficit hídrico, así como en sistemas de bajos insumos, se requiere incrementar la tolerancia a sequía (Tang *et al.*, 2013) y el desarrollo de nuevos cultivares de alfalfa más productivos en condiciones hídricas limitantes (Humphries *et al.*, 2020).

Los parientes silvestres de la alfalfa incluyen poblaciones que han evolucionado para sobrevivir en diversos entornos extremos, pero hasta hace poco han tenido un uso limitado en programas de mejoramiento (Annicchiarico *et al.*, 2015). La hibridación entre *M. sativa* y dos especies del acervo genético terciario, *M. arborea* L. y *M. truncatula* Gaertn., puede proporcionar una mayor variación genética en cuanto a tolerancia a sequía, rendimiento potencial de forraje y otras características

de importancia económica (Irwin *et al.*, 2010; Bingham *et al.*, 2013; Humphries *et al.*, 2020).

Medicago arborea L. es un arbusto que puede alcanzar hasta 4 metros de altura, se adapta bien a la zona mediterránea y se utiliza para la producción de forraje durante el verano y el invierno. Se considera la especie más antigua del género y es conocida por su tolerancia a sequía (Noitsakis *et al.*, 1990). Esta especie tiene muchas características de uso potencial para el mejoramiento genético de alfalfa.

Además de la tolerancia a sequía, presenta algunos rasgos morfológicos que podrían reestructurar la alfalfa, por ejemplo, se caracteriza por semillas grandes, mayor vigor de plántulas, hábito de crecimiento arbustivo, resistencia a enfermedades (Irwin *et al.*, 2015; Bingham *et al.*, 2013). Después de cuatro décadas de estudios y un gran número de cruzamientos, investigadores de Estados Unidos y Nueva Zelandia, lograron híbridos inter-específicos entre *M. arborea* y *M. sativa* (Bingham *et al.*, 2013). Los investigadores lograron la introgresión de rasgos favorables del genoma de *M. arborea* a *M. sativa*, como la tolerancia a sequía. Los híbridos entre ambas especies se conocen como Alborea.

La sequía es uno de los factores ambientales más limitantes para el crecimiento y la productividad de las plantas (Valliyodan y Nguyen, 2006). Debido a la creciente demanda de agua para uso no agrícola y la disminución prevista de la cantidad de lluvia debido al cambio climático resulta de vital importancia el desarrollo de cultivos tolerantes a sequía (Annicchiarico *et al.*, 2013). Por tanto, la inclusión de los híbridos Alborea en los sistemas agrícolas chilenos podría satisfacer la demanda de cultivares de alfalfa con mayor tolerancia a la sequía y una mayor eficiencia en el uso del agua. Los que, adicionalmente, podrían ayudar a rehabilitar suelos agrícolas deteriorados (del Pozo *et al.*, 2016).

Se ha reportado en alfalfa que la sequía moderada o severa disminuyen significativamente el contenido relativo de agua y el intercambio de gases (Erice *et al.*, 2010). El déficit hídrico afecta negativamente el proceso de fotosíntesis en todas sus fases, debido principalmente a la disminución en la difusión de CO₂ al cloroplasto y a limitaciones metabólicas (Wang *et al.*, 2020; Pinheiro y Chaves, 2011). Por tanto, el estudio de la eficiencia fotosintética en condiciones de sequía

es fundamental para la detección eficaz de genotipos tolerantes y para el mejoramiento genético de esta especie en condiciones de déficit hídrico (Zhang *et al.*, 2018).

Las adaptaciones morfológicas a la sequía incluyen hábito de crecimiento postrado y raíces rizomatosas (Prosperi *et al.*, 2006), rasgos también asociados con la tolerancia al pastoreo. El desarrollo de raíces laterales se favorece en alfalfa en ambientes secos, pero la variación genética de este rasgo es algo controvertida (Lamb *et al.*, 2000; Odorizzi *et al.*, 2008). Bajo condiciones de estrés hídrico generalmente se observa un aumento estacional en el crecimiento de las raíces finas, lo que implica una nueva expresión génica y cambios morfológicos temporales. Sin embargo, una alta relación raíz/biomasa aérea y la profundidad de enraizamiento son adaptaciones comunes a condiciones de sequía, lo que significa que ocurre en la escala evolutiva e involucra diferenciación genética y cambios morfológicos permanentes (Moreno *et al.*, 2008). Estas características conferirían una ventaja durante el déficit de agua, ya que al tener un gran volumen de biomasa radicular se facilitaría la absorción de agua para satisfacer la demanda de la planta.

Por otro lado, la distribución espacial de todas las partes de la raíz en un entorno de crecimiento particular se conoce colectivamente como arquitectura del sistema raíz (ASR). La ASR es dinámica y se ve afectada por el entorno externo (humedad del suelo, temperatura, nutrientes y pH) y las comunidades microbianas circundantes que afectan la forma en que una planta detecta y responde a su entorno (Bao *et al.*, 2014; Robbins y Dinneny, 2015). En los últimos años, el interés por estudiar los sistemas radicales de las plantas ha aumentado debido a la escasez de agua ocasionada por el cambio climático y a los avances tecnológicos para evaluarlos de forma cuantitativa (Inostroza *et al.*, 2020).

Aunque se ha establecido que los híbridos Alborea muestran, en general, un rendimiento sobresaliente en ambientes propensos a sequía comparado con las especies cultivadas de alfalfa (Inostroza *et al.*, 2021), es necesario evaluar el desempeño de diferentes genotipos de *Medicago alborea* y *Medicago sativa* en condiciones de déficit hídrico y establecer la relación entre los cambios en parámetros morfo-fisiológicos y la tolerancia a sequía. Este estudio tiene como

objetivo evaluar rasgos morfológicos y fisiológicos, a nivel radical y aéreo de la planta, en *Medicago sativa* y *Medicago alborea* y su relación con el desempeño de la planta en condiciones hídricas contrastantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en el Centro Regional de Investigaciones Quilamapu, perteneciente al Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), ubicado en la ciudad de Chillán (36°34'S; 72°06'O), Chile. El ensayo se desarrolló bajo condiciones de invernadero. El invernadero permaneció a 25 ± 5 °C de temperatura (día y noche), con un fotoperiodo de 12 horas suplementado con luz artificial mediante lámparas de haluro-metálico de 400W. La humedad relativa del invernadero se mantuvo en 55 ± 5 %.

La siembra se llevó a cabo el 4 de junio de 2021 encontrándose las plantas en igual condición de riego hasta los 102 días después de siembra (DDS) donde se realizó el corte de homogenización y se establecieron los tratamientos de riego. Posterior a esto se realizaron dos mediciones, a los 130 y 174 DDS.

Material vegetal

Se estudió la tolerancia a sequía de 8 poblaciones de alfalfa (Tabla 1), en las que se incluyeron 2 híbridos interespecíficos y 6 accesiones de *Medicago sativa* con productividad sobresaliente en ensayos previos en condiciones de campo en ambientes Mediterráneos del secano interior (Cauquenes, región del Maule; Inostroza *et al.*, 2021).

Tabla 1. Población, taxón al que pertenece y origen de las poblaciones evaluadas.

Población	Taxón	Origen
AF3448	<i>Medicago sativa</i> x <i>Medicago arborea</i>	Agriseeds New Zealand
AF3347	<i>Medicago sativa</i> x <i>Medicago arborea</i>	Agriseeds New Zealand
Venus	<i>Medicago sativa</i>	Australia
Genesis	<i>Medicago sativa</i>	Australia
Aragón	<i>Medicago sativa</i>	España
Alta sierra 2	<i>Medicago sativa</i>	Chile

APG6567	<i>Medicago sativa</i>	España
APFG44669	<i>Medicago sativa</i>	Perú

Condiciones de crecimiento

Las plantas se establecieron en mesocosmos de PVC de 11 cm de diámetro y 100 cm de altura. Cada tubo en su interior se recubrió con una bolsa plástica para facilitar la posterior extracción de la raíz. Se utilizó como sustrato una mezcla de arena fina (50 %), vermiculita (35 %), suelo de la Serie Arrayán (medial, thermic Humic Haploxerands; Stolpe, 2006) (10 %) y perlita (5 %) (Zhu *et al.*, 2010). Los tubos se colocaron en gradillas con capacidad para 60 tubos.

Dos días antes de establecer las plantas, se regó cada tubo con 1 litro de solución nutritiva compuesta por (μM): KNO_3 (1,2), K_2HPO_4 (0,2), CaCl_2 (0,39), H_3BO_3 (0,0025), NH_4NO_3 (0,19), MgSO_4 (0,09), MnSO_4 (0,00019), ZnSO_4 (0,00019), CuSO_4 (0,005), Na_2MoO_4 (0,0005) y FeSO_4 (0,005) (Zhu *et al.*, 2010). El riego se realizó mediante un sistema presurizado automático con emisores tipo gotero con caudal de 2 L h^{-1} (PCJ, Netafim). Cada tubo dispuso de un gotero y el sistema funcionó diariamente, en dos momentos (8:00 y 16:00 horas) por periodos de 2 horas, manteniendo la humedad del sustrato en el umbral óptimo cercano a capacidad de campo. A los 102 días posterior al establecimiento, se cortó la parte aérea de las plantas a 5 cm sobre el nivel del sustrato, con el fin de homogenizar su estado de desarrollo, se aplicó nuevamente la solución nutritiva y posteriormente se establecieron los tratamientos hídricos.

Tratamientos hídricos y Diseño experimental

Se establecieron dos tratamientos, uno donde las plantas permanecieron bajo condiciones hídricas favorables sin estrés hídrico (SEH) (Ψ_{sustrato} -0,33 MPa) y otro con estrés hídrico (CEH) (Ψ_{sustrato} -1,5 MPa). Para establecer los umbrales de humedad se determinó la curva de retención de humedad del sustrato (contenido de humedad vs tensión). Este análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Suelos y Plantas de INIA Quilamapu.

La tensión del agua en el sustrato (potencial hídrico) se monitoreó periódicamente con sensores de capacitancia MPS1 (Decagon, EE.UU). Para esto,

se establecieron dos unidades experimentales adicionales, una en cada tratamiento. Durante el establecimiento se instalaron 5 sensores por mesocosmo a los 10, 30, 50, 70 y 90 cm de profundidad. A los 10 cm también se incluyó un sensor para monitorear la temperatura del sustrato. La información fue registrada en intervalos de 1 h y almacenada en dataloggers.

Cada condición (SEH y CEH) tuvo un sistema de riego independiente, de acuerdo a lo descrito en la sección anterior. Las frecuencias de riego se determinaron en función de las tensiones de sustrato en cada tratamiento. Los riegos fueron proporcionados de forma automática mediante un controlador de riego.

Los ensayos se organizaron en un diseño de parcelas divididas con tres repeticiones (cada una compuesta por cinco mesocosmos). En total se trabajó con 240 mesocosmos (8 poblaciones x 2 condiciones hídricas x 3 repeticiones x 5 mesocosmos en cada repetición).

Mediciones fisiológicas y morfológicas de la parte aérea

Potencial de xilema (Ψ_x)

Se determinó el potencial hídrico xilemático en una planta por población en cada repetición y tratamiento. Se seleccionó un tallo y se envolvió completamente con film plástico y luego con papel de aluminio. Posterior a una hora, el tallo se cortó con un bisturí para su evaluación. Se utilizó una bomba de presión tipo Scholander para llevar a cabo la medición. Las mediciones se realizaron entre las 12:00 y 15:00 horas. Se realizaron dos mediciones a los 130 y 174 DDS.

Contenido de pigmentos (Chl, Anth, NBI)

Se determinó el contenido foliar de clorofila y antocianos, así como un índice de balance de nitrógeno, mediante el sensor Dualex Scientific (Force-A, Francia). La medición se realizó en hojas maduras completamente expandidas. Se seleccionaron tres hojas al azar entre las cinco plantas que componen cada población y repetición. Se realizaron dos mediciones a los 130 y 174 DDS.

Conductancia estomática (gs)

Para la medición de conductancia estomática se seleccionó una planta por población en cada repetición y tratamiento. De cada planta se escogió una hoja madura completamente expandida en la que se llevó a cabo la medición a los 130 y 174 DDS. Para ello se utilizó un porómetro SC-1 (Decagon, EE.UU).

Temperatura del dosel ($T^{\circ}h$)

La temperatura de la planta (dosel) se determinó con el uso de una cámara térmica FLIR i40 (FLIR, Canadá). Se tomaron imágenes a una planta en cada repetición. La cámara se colocó de modo cenital a 30 cm sobre la planta. Las imágenes se analizaron mediante el software Flir Tools (5.x, Teledyne flir). Se evaluó a los 130 y 174 DDS.

Área foliar específica (AFE) y área foliar (AF)

A los 130 DDS, previo al primer corte, se extrajeron 5 hojas completamente expandidas de la parte media del tallo, por población en cada repetición y tratamiento. Luego, en laboratorio se determinó el área foliar. Posteriormente fueron secadas las hojas en horno de aire forzado a 65°C, hasta alcanzar peso constante. Se determinó el área foliar específica como la relación entre el área y el peso seco ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$). La medición se repitió en el siguiente corte de follaje a los 174 DDS.

Altura de planta (AP) y tasa de crecimiento relativo (TC)

Se determinó la altura de planta y la tasa de crecimiento relativo a los 174 DDS utilizando una regla metálica de 100 cm y un pie de metro digital, respectivamente. Para la altura se consideró la distancia entre la base del sustrato hasta el tallo más alto de la planta.

Arquitectura de raíz

Cosecha de raíces

De cada mesocosmo se extrajeron las bolsas que contienen el sustrato, las cuales se colocaron sobre una rejilla, se rasgaron y se lavaron las raíces con agua corriente. Inmediatamente se colocaron en bolsas plásticas con etanol al 70 % (v/v) y se conservaron a 4°C, hasta su posterior análisis. Para evitar la alteración de la corona, la extracción de las raíces incluyó dos centímetros de tallo sobre la corona.

Caracterización morfológica del sistema radical

Se separaron las raíces finas de la raíz pivotante. Luego, el sistema radical (sin raíces finas) fue digitalizado mediante imágenes digitales de alta definición que se tomaron con una cámara fotográfica EOS Rebel t5i (Canon, Japón). Para esto, el sistema radical se extendió sobre una bandeja negra con agua, a fin de disminuir la superposición de raíces. La cámara se colocó a 1,5 m sobre la bandeja. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa WinRHIZO PRO (Regent Instruments Inc., Canadá). Previo al análisis se calibró el software con el uso de medidas de referencia obtenidas de una regla que se encuentra en la imagen.

Para todo el sistema radical, se determinó el diámetro medio de la raíz (avgD), volumen total de la raíz (Vol), longitud total de la raíz (TrootL) y densidad de la longitud de la raíz (RLD = TrootL / volumen de mesocosmo). Para la sección superior de 30 cm, se determinaron el diámetro de la corona, la altitud (a), la magnitud (μ) y la longitud de la trayectoria externa (Pe). El índice de ramificación dicotómica (DBI) se calculó de acuerdo con Beidler *et al.* (2014):

$$\begin{aligned} \text{DBI} &= [\text{Pemin (P e)}] / [\text{max (Pe) min (Pe)}] \\ \text{máx (Pe)} &= 0,5 (\mu^2 + 3\mu^2) \\ \text{min (Pe)} &= \mu [\text{min (a) + 1}]^2 \text{ min (a)} \end{aligned}$$

donde max (Pe) y min (Pe) son la longitud teórica de la trayectoria externa (Pe) para un sistema de una determinada magnitud (μ) que tiene una topología completamente en espiga o completamente dicotómica, respectivamente. Min (a) es la altitud teórica (a) para un sistema de magnitud dada que tiene una topología dicotómica.

Producción y partición de materia seca

Materia seca aérea

En los dos cortes realizados a los 130 y 174 DDS se cosechó la biomasa aérea mediante un corte a 5 cm sobre el sustrato, sin afectar la corona. El material colectado se colocó en bolsas de papel y se secó en un horno de aire forzado a 65°C hasta que el peso se mantuvo constante. Posteriormente se determinó el peso seco utilizando una balanza analítica (Radwag, AS 220/C/2).

Materia seca de raíz

Después de digitalizar cada sistema radical, se determinó el peso seco total, peso seco de los primeros 33 cm de la raíz y el peso seco de las raíces finas de los primeros 33 cm del sistema radical. Para ello, las muestras se secaron en un horno de aire forzado a 65°C hasta peso constante, posteriormente fueron pesadas en una balanza analítica (Radwag, AS 220/C/2).

Análisis Estadístico

Cada variable se analizó mediante análisis de varianza y las medias de cada tratamiento se compararon mediante prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) de Fischer, con un nivel de confianza del 95 %. Este análisis fue realizado utilizando el software estadístico InfoStat Profesional (InfoStat, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediciones morfo-fisiológicas

El estrés hídrico tuvo un efecto altamente significativo ($P < 0,001$) sobre todas las variables morfo-fisiológicas evaluadas en el primer corte (Tablas 2 y 3). En el segundo corte las variables también mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos, excepto en NBI en el cual no se encontraron diferencias estadísticas (Tabla 4).

En el primer corte, el potencial xilemático en la condición CEH disminuyó un 120 % respecto a la condición SEH, ocurriendo algo similar en el segundo corte donde en la condición CEH el potencial xilemático disminuyó un 250 %. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre poblaciones en ambos momentos de evaluación ($P > 0,05$), alcanzándose en el primer corte valores promedio de -11,7 y -5,3 bares bajo condiciones CEH y SEH, respectivamente y de -23,3 y -6,5 bares en el segundo corte. La alta variación entre evaluaciones se debe a que las condiciones ambientales en las que se realizó cada corte fueron distintas, ya que para el primer corte la temperatura ambiente fue de 21,6°C y humedad relativa de 57,2 % y para el segundo se alcanzaron 30,2°C y la humedad relativa fue de 51,6 % (Apéndice 1), generándose con ello un mayor déficit de presión de vapor al interior del invernadero.

Independiente de lo anterior, la ausencia de diferencias estadísticas entre las poblaciones sugiere que el estrés por sequía afectó a todas las poblaciones con similar intensidad. Los resultados se condicen con los obtenidos por Zhang *et al.* (2018), quienes reportaron que plántulas de diferentes variedades de *M. sativa* bajo estrés hídrico muestran una disminución en el potencial hídrico. La conductancia estomática fue menor en la condición CEH respecto a SEH en ambos cortes, con reducciones de 60 % y 74 %, en el primer y segundo corte, respectivamente. Se evidenció diferencias significativas ($P < 0,05$) entre poblaciones en ambos cortes. Los valores más altos se obtuvieron en Alta sierra 2 en ambas mediciones, con 325,6 y 359,7 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente, y los valores más bajos en Venus con 151,9 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el primer corte y Aragón con 138,6 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el segundo corte (Tablas 2 y 4). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Tani *et al.* (2019) en donde poblaciones de alfalfa en condición de estrés hídrico evidenciaron una disminución de la conductancia estomática cercana al 50 % en comparación con las plantas no estresadas. Esto se debe a que, en condiciones de déficit hídrico y producto de una pérdida excesiva de agua por transpiración, la planta responde cerrando los estomas, lo que se refleja en una menor conductancia estomática (Méndez, 2013). A su vez la temperatura del dosel se incrementó un 9 % en el primer corte y un 3 % en el segundo en la condición CEH respecto a SEH, sin encontrarse diferencias significativas entre poblaciones en ningún momento de medición. Lo anterior está estrechamente relacionado con lo observado en el potencial hídrico y sugiere que las poblaciones se afectaron de igual forma al estar sometidas al estrés hídrico. Los resultados concuerdan con los obtenidos por Méndez (2013) y Sánchez (2008) quienes estudiaron once accesiones *Lotus tenuis* y observaron como la disminución en la disponibilidad hídrica afecta negativamente la conductancia estomática, lo que a su vez provoca un aumento de temperatura en la hoja, ya que la temperatura de la hoja está directamente relacionada con la tasa de transpiración de la superficie del dosel (Leinonen y Jones 2004).

El contenido de clorofila e índice de balance de nitrógeno en la hoja aumentaron en la condición CEH respecto a SEH en un 14 y 18 % respectivamente, en el primer corte. En tanto en el segundo corte la tendencia fue similar y se registraron

aumentos del 21 % en el contenido de clorofila y de 10 % en el índice de balance de nitrógeno en condición de CEH. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre poblaciones ($P > 0,05$) en ninguna de las dos evaluaciones. Esto no concuerda con los resultados obtenidos por Mouradi *et al.* (2015), donde poblaciones de alfalfa sometidas a estrés hídrico mostraron una disminución en el contenido de clorofila y contenido de nitrógeno, ocurriendo lo mismo en los estudios realizados por Chaum *et al.* (2010) en arroz y Mafakheri *et al.* (2010) en garbanzo. La clorofila es un pigmento básico en la planta y la disminución de la concentración de esta provoca clorosis y reduce el crecimiento y rendimiento (Zobayed *et al.* 2005; Jangpromma *et al.* 2010), siendo el déficit hídrico uno de los factores abióticos que puede causar disminución en el contenido de clorofila (Mafakheri *et al.* 2010; Hanci y Cebeci 2014; Zhang *et al.*, 2018).

El contenido de antocianinas en la hoja fue 8 % mayor en la condición SEH respecto a CEH en ambos cortes (Tablas 2 y 3). Sólo se encontró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre poblaciones en el primer corte. El mayor valor de antocianinas foliares en el primer corte, se observó en el híbrido AF3448 y en Alta sierra 2 con una media de 0,25. En tanto, el menor valor se midió en Venus, Genesis y Aragón con una media de 0,23. En la segunda evaluación la tendencia fue similar, donde Alta Sierra obtuvo la media más alta con 0,24, seguido de AF3448 con 0,23 y la media más baja fue 0,21 en APFG44669. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Oral *et al.* (2021) en soja (*Glycine max* L.), en donde bajo una condición de riego normal el contenido de antocianinas (0,026) fue mayor que cuando se restringía el riego a la mitad (0,017), sin embargo, al reducir el riego un 75 % el contenido de antocianinas tenía un leve aumento (0,022). El estrés por sequía puede inducir estrés oxidativo al aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno. Lo que puede inhibir el metabolismo y el crecimiento de las plantas (Zhang *et al.*, 2018). Por tanto, las plantas para superar este estrés inducen actividades enzimáticas antioxidantes como estrategia de adaptación (Mouradi *et al.*, 2015). La contribución de los antioxidantes a la tolerancia a la sequía se ha informado en varios estudios (Tani *et al.*, 2019). Sin embargo, no se observó en este trabajo un valor mayor de antocianinas en condición CEH.

Tabla 2. Características fisiológicas potencial xilemático (Ψ_x), conductancia estomática (gs), contenido de clorofila (Chl), contenido de antocinianas (Anth) e índice de balance de nitrógeno en la hoja (NBI) evaluadas a los 130 días después de siembra en poblaciones de *M. alborea* y *M. sativa* cultivadas en condiciones hídricas contrastantes. SEH: sin estrés hídrico y CEH: con estrés hídrico.

Población (P)	Ψ_x (-Bar)	Gs (mmol m ⁻² s ⁻¹)	Chl	Anth	NBI
AF34 48	11,2	163,9 A	37,9	0,3 bc	35,1
AF3347	8,7	173,5 A	41,4	0,2 abc	40,2
Venus	8,8	151,9 A	42,3	0,2 ab	39,2
Genesis	6,5	179,0 ab	44,1	0,2 a	40,9
Aragón	6,6	294,9 Bc	42,5	0,2 a	41,3
Alta sierra 2	8,0	325,6 C	39,6	0,3 c	37,1
APG6567	10,1	225,5 abc	40,4	0,2 abc	40,4
APFG44669	8,3	221,8 abc	40,5	0,2 abc	40,3
	ns	*	ns	*	ns
Tratamiento (T)					
SEH	5,3	313,4	38,3	0,3	36,0
CEH	11,7	120,7	43,8	0,2	42,6
	***	***	***	***	***
P x T	ns	Ns	ns	ns	ns

ns: no significativo; * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. Letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas y letras iguales indican diferencias no significativas, según prueba de DMS de Fischer ($p \leq 0,05$).

En la condición CEH el área foliar (AF) y el área foliar específica (AFE) disminuyeron 24,5 % y 30,3 %, respectivamente, en comparación a SEH, en el primer corte. Un efecto similar se observó en el segundo corte con valores de AF y AFE 53,7 % y 27,3 % menores, respecto a SEH. Solo se encontraron diferencias significativas en AF en el primer corte (Tabla 3). El AF presentó una media de 30,9 cm² entre las poblaciones evaluadas. En el primer corte, el valor más alto de AF se obtuvo en Genesis con 38,5 cm² y también se destacó el híbrido alborea AF3448 con 31,8 cm². En la segunda evaluación no se encontraron diferencias estadísticas entre

poblaciones, sin embargo, la media entre poblaciones aumentó 6 cm². Aragón tendió a tener la media más alta con 41,83 cm², seguido de APG6567, AF3448 y Genesis con medias de 40,6 cm² y los últimos dos con 38 cm² cada uno. La disminución del área foliar es un efecto típico en condiciones de déficit hídrico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Galván-Tovar *et al.* (2003) en frijol, donde el AF disminuyó cuando las plantas estaban bajo estrés hídrico. En estas condiciones se inhiben los procesos de expansión y división celular, resultando en una disminución del área foliar (Taiz *et al.*, 2015).

Tabla 3. Características morfo-fisiológicas área foliar (AF), área foliar específica (AFE), diámetro de tallo (Dx) y temperatura del dosel (T°h) evaluadas a los 130 días después de siembra en poblaciones de *M. alborea* y *M. sativa* cultivadas en condiciones hídricas contrastantes. SEH: sin estrés hídrico y CEH: con estrés hídrico.

Población (P)	AF (cm ²)	AFE (cm ² g ⁻¹)	Dx (cm)	T°h (°C)
AF3448	31,8 a	232,4	2,1 ab	18
AF3347	29,3 a	222	2,1 ab	18,4
Venus	28 a	220	1,9 a	17,5
Genesis	38,5 b	192,5	2,3 b	17,8
Aragón	33 ab	187,8	2,4 b	18,2
Alta sierra 2	29 a	211,3	2,2 ab	18
APG6567	28 a	217	1,9 a	18,1
APFG44669	29,2 a	224,4	1,9 a	18,5
	*	ns	*	ns
Tratamiento (T)				
SEH	35,2	251,1	2,4	17,2
CEH	26,5	175,7	1,9	18,9
	***	***	***	***
P x T	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo; * P<0,05; *** P<0,001. Letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas y letras iguales indican diferencias no significativas, según prueba de DMS de Fischer ($p \leq 0,05$).

Tabla 4. Características morfo-fisiológicas potencial xilemático (Ψ_x), conductancia estomática (gs), contenido de clorofila (Chl) y antocianinas (Anth), índice de balance de nitrógeno en la hoja (NBI), área foliar (AF), área foliar específica (AFE) y temperatura del dosel (T°h) evaluadas a los 174 días después de siembra en poblaciones de *M. alborea* y *M. sativa* cultivadas en condiciones hídricas

contrastantes. SEH: sin estrés hídrico y CEH: con estrés hídrico.

Población (P)	Ψ_x (-Bar)	gs (mmol m⁻² s⁻¹)	Chl	Anth	NBI	AF (cm²)	AFE (cm² g⁻¹)	T°h (°C)
AF3448	15,3	234,9 ab	40,9	0,2	44,6	38,0	244,5	24,1
AF3347	16,5	249,4 abc	33,3	0,2	36,2	36,7	233,1	24,2
Venus	12,7	244,5 ab	39,7	0,2	40,6	30,8	207,2	23,7
Genesis	16,0	267,1 bc	40,2	0,2	45,2	38,0	212,2	23,9
Aragón	15,8	138,6 a	38,3	0,2	38,7	41,8	210,4	23,8
Alta sierra 2	12,2	359,7 c	36,3	0,2	38,9	36,0	215,3	23,5
APG6567	15,3	219,0 ab	38,8	0,2	42,2	40,7	237,7	24,2
APFG44669	15,3	188,7 ab	40,3	0,2	42,6	30,3	252,8	23,9
	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Tratamiento (T)								
SEH	6,5	376,5	34,7	0,2	39,1	50,0	262,4	23,6
CEH	23,3	99,0	42,2	0,2	43,2	23,1	190,9	24,3
	***	***	***	*	ns	***	***	*
P x T	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo; * P<0,05; *** P<0,001. Letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas y letras iguales indican diferencias no significativas, según prueba de DMS de Fischer ($p \leq 0,05$).

El diámetro de tallo se evaluó sólo en el primer corte (Tabla 3), fue 28,6 % mayor en la condición SEH respecto a CEH. Se evidenció diferencias significativas entre poblaciones alcanzándose el mayor diámetro en Aragón con 2,44 mm; en tanto, el valor más bajo se obtuvo Venus con 1,86 mm. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sabiel *et al.* (2014) y Ohashi *et al.* (2006) en maíz y soja, respectivamente, en los cuales el diámetro de los tallos evaluados se redujo en condición de déficit hídrico.

Tanto el potencial hídrico del suelo como el de la hoja contribuyen al cambio en el diámetro del tallo. Ya que este se reduce por los cambios de turgencia en las células de las plantas que se encuentran bajo estrés hídrico (Anjum *et al.*, 2017).

Altura de planta (AP) y tasa de crecimiento relativo (TC)

El estrés hídrico tuvo un efecto altamente significativo ($P < 0,001$) sobre AP y TC (Tabla 5). Sin embargo, en ambas variables no hubo diferencias estadísticas entre poblaciones. La AP y TC se redujeron debido al déficit hídrico en todas las poblaciones evaluadas. En los híbridos alborea, AF3448 y AF3347, la altura de planta se redujo en 32 % y 45 %, respectivamente. Mientras que para la población Alta sierra 2 la altura de planta se redujo hasta un 41 % bajo la condición CEH. Sin embargo, cabe destacar que el híbrido AF3448 en condición CEH logró una altura de 58 cm, siendo superior al promedio de altura del resto de poblaciones evaluadas (53 cm). De manera similar, la tasa de crecimiento se redujo a la mitad en las poblaciones AF3347 y Alta sierra 2 a causa del estrés hídrico. Por otro lado, AF3448 y APFG44669 fueron las poblaciones en que menos disminuyó la tasa de crecimiento (37 %). Este resultado concuerda con los obtenidos por Tani *et al.* (2019) y Zhang *et al.* (2018) quienes reportaron que la altura y tasa de crecimiento de las poblaciones de alfalfa disminuye a causa del estrés hídrico. Esto se debe a que el estrés por sequía reduce severamente el crecimiento de las plantas, por tanto, es un factor crítico para su productividad (Kashif, 2011).

Tabla 5. Altura de planta (AP) y tasa de crecimiento relativo (TC) de poblaciones de *M. alborea* y *M. sativa* cultivadas en condiciones hídricas contrastantes. SEH: sin estrés hídrico y CEH: con estrés hídrico.

Población (P)	AP (cm)	TC (cm día ⁻¹)
AF3448	71,90	1,78
AF3347	70,47	1,75
Venus	63,13	1,55
Genesis	69,07	1,67
Aragón	68,67	1,55
Alta sierra 2	70,23	1,72
APG6567	72,27	1,80
APFG44669	79,03	1,93
	ns	ns

Tratamiento (T)		
SEH	87,92	2,22
CEH	53,28	1,22
	***	***
P x T	ns	ns

ns: no significativo; *** $P < 0,001$. Letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas y letras iguales indican diferencias no significativas, según prueba de DMS de Fischer ($p \leq 0,05$).

Materia seca aérea y de raíces

Se observó diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) a nivel de tratamientos solo en materia seca aérea total (MSaéreaT), no encontrándose diferencias significativas para materia seca de raíces finas (MSraícesf) y materia seca total de raíz (MSraízT) (Tabla 6). La MSaéreaT disminuyó 38 % en la condición CEH respecto a SEH. Entre poblaciones se evidenciaron diferencias significativas ($P < 0,05$). La población con mayor producción de MSaéreaT fue APFG44669 con 59,6 g siendo estadísticamente diferente ($P < 0,05$) de los híbridos alborea (AF3448 y AF3347) que registraron ambos 51 g en promedio. La menor producción de biomasa aérea se obtuvo en Alta sierra 2 con 43,7 g. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zhang *et al.* (2018) y Mouradi *et al.* (2015) quienes evidenciaron que el estrés por sequía en alfalfa redujo la biomasa aérea, área foliar, altura de la planta y aumentó la relación raíz/brote. La disminución de la biomasa seca aérea en plantas bajo estrés hídrico podría ser consecuencia de la reducción en la expansión foliar y del cierre de estomas, lo que a su vez limita la asimilación de CO_2 , afectando la actividad fotosintética y resultando en una disminución de biomasa (Mouradi *et al.*, 2015).

Tabla 6. Producción de materia seca aérea total (MSaéreaT), materia seca de raíces finas (MSraícesf) y materia seca raíz total (MSraízT) a los 174 días después de la siembra en poblaciones de *M. alborea* y *M. sativa* cultivadas en condiciones hídricas contrastantes. SEH: sin estrés hídrico y CEH: con estrés hídrico.

Población (P)	MSaéreaT (g)	MSraícesf (g)	MSraízT (g)
---------------	-----------------	------------------	----------------

AF3448	50,89 ab	0,40 bc	9,42
AF3347	51,34 ab	0,40 bc	10,14
Venus	51,01 ab	0,28 a	11,76
Genesis	54,79 bc	0,47 c	10,04
Aragón	44,93 a	0,47 bc	12,13
Alta sierra 2	43,66 a	0,34 ab	10,40
APG6567	50,08 ab	0,38 abc	9,64
APFG44669	59,57 c	0,36 abc	11,33
	*	*	ns
Tratamiento (T)			
SEH	63,00	0,40	10,95
CEH	38,57	0,38	10,27
	***	ns	ns
P x T	ns	ns	ns

ns: no significativo; * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. Letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas y letras iguales indican diferencias no significativas, según prueba de DMS de Fischer ($p \leq 0,05$).

La MSraícesf presentó diferencias significativas entre poblaciones ($P < 0,05$). Entre los que presentaron mayor valor de MSraícesf se encuentran los híbridos alborea con 0,4 g cada uno. En contraste, el menor valor lo presentó Venus con 0,28 g. La importancia de un mayor número de raíces finas se asocia a un sistema raíz con mayor capacidad de absorción y exploración del suelo en caso de presentarse condiciones adversas para la planta, siendo las raíces finas la principal vía para la absorción de agua y nutrientes (Eissenstat, 1992). En el caso de la MSraízT, no se encontraron diferencias significativas entre poblaciones ($P < 0,05$). Estos resultados sugieren que el déficit de agua influyó menos en el crecimiento de las raíces que en el crecimiento de los brotes (Zhang *et al.*, 2018).

Arquitectura de raíz

A nivel de tratamientos hídricos se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) para las variables RLD y DBI. No encontrándose diferencias significativas en el Dcorona ($P > 0,05$) (Tabla 7).

En cuanto al Dcorona, se evidenció una leve tendencia al aumento en la condición SEH respecto a CEH. Entre poblaciones se evidenciaron diferencias significativas ($P < 0,05$). El valor más alto de Dcorona lo obtuvo Genesis con una media de 9,83 mm, seguido por Aragón con una media de 9,08 mm. El valor más bajo lo obtuvo el híbrido AF3347 con una media de 7,99 mm (Tabla 7). Estos resultados se complementan con lo visto en la MSraízT, la cual presentó una leve tendencia al aumento en la condición SEH respecto a CEH. Marshall *et al.* (2017) demostraron en trébol rojo que un mayor diámetro de corona mejoraba la persistencia de las plantas. La corona actúa como una fuente de reservas de energía para la alfalfa y, además, en ella se encuentran las yemas que formaran el rebrote basal. Los carbohidratos que conforman estas reservas son utilizados para iniciar el nuevo crecimiento después de cada pastoreo y sobrevivir a condiciones de estrés.

La densidad de la longitud de la raíz (RLD) fue un 17 % mayor en CEH respecto a SEH. Entre poblaciones se evidenciaron diferencias significativas ($P < 0,01$). Genesis y Alta Sierra 2 obtuvieron los valores más altos con una media de 0,53 y 0,52, respectivamente, y el valor más bajo lo obtuvo APFG44669 con una media de 0,34 (Tabla 7). Estos resultados coinciden con lo obtenido por Liang *et al.* (2017) en sorgo donde a una profundidad de 0-45 cm el tratamiento con el porcentaje más bajo de riego produjo un RLD mayor. En general, genotipos con RLD más altos tienden a tener una mayor plasticidad en el crecimiento de las raíces, una mayor capacidad fisiológica para la absorción de agua y nutrientes, pero una menor longevidad de las raíces (Inostroza *et al.*, 2020). La importancia de un alto RLD es que podría resultar en una mayor utilización del agua que se almacena en el suelo. A su vez generar una captación más eficiente y reducir el riesgo de estrés por sequía y la subsiguiente pérdida de rendimiento (Liang *et al.*, 2017).

El índice de ramificación dicotómica (DBI) mostró en condición SEH un valor de 0,06, el cual fue 33 % mayor respecto a CEH ($P < 0,05$; Tabla 7). El DBI mostró

diferencias significativas ($P < 0,01$) entre poblaciones. Los híbridos AF3448 y AF3347 mostraron valores DBI más bajos que APFG44669, un 33 % y 44 %, respectivamente (Tabla 7). El DBI describe el tipo de ramificación del sistema radical. Los valores fluctúan entre cero y uno, indicando sistema con ramificación dicotómica o espina de pescado, respectivamente (Inostroza *et al.*, 2020). El valor DBI más cercano a cero lo obtuvo Alta Sierra 2, el cual se redujo en casi un 90 % en comparación a APFG44669.

Inostroza *et al.* (2020) evaluaron el DBI en poblaciones de trébol rosado, reportando valores entre 0,50 y 0,67. En este estudio, se observó que las poblaciones de alfalfa muestran valores de DBI cercanos a cero y menores a los observados en trébol rosado. Lo que indica que todas las poblaciones presentan sistemas radicales con mayor ramificación (dicótomo). Por otro lado, Lynch *et al.* (2007), plantearon que sistemas más ramificados tienen mayor capacidad de exploración de suelo para la captura de agua y nutrientes.

En este trabajo, se observó una alta estabilidad en la producción de biomasa de raíces (Tabla 6), pero con la inducción de cambios a nivel de arquitectura de los sistemas radicales (Tabla 7). Las plantas desarrollaron sistemas radicales más ramificados en condiciones CEH (menor valor de DBI). Indicando que las poblaciones estudiadas pueden modificar su arquitectura radical para incrementar la eficiencia en la absorción de agua.

La población APG44669 mostró el mayor valor de DBI y alcanzó la mayor producción de materia seca aérea. Por otro lado, Alta Sierra alcanzó el menor valor de DBI con la menor producción de materia seca aérea (Tablas 5 y 6). En este caso la diferencia en la producción de materia seca aérea no sólo se le asocia al DBI, sino que también a otros factores, por ejemplo, APG44669 obtuvo los valores más altos de AP y TC (Tabla 5) y fue la población con el tercer mayor valor de MSraízT (Tabla 6).

Tabla 7. Diámetro de corona (Dcorona) y parámetros topológicos (RLD, densidad de la longitud de raíces; DBI, índice de ramificación) de poblaciones de *M. alborea* y *M. sativa* a los 174 días después de siembra cultivadas en condiciones hídricas contrastantes. SEH: sin estrés hídrico y CEH: con estrés hídrico.

Población (P)	Dcorona	RLD	DBI
---------------	---------	-----	-----

	(mm)		
AF3448	8,42 a	0,37 ab	0,06 bc
AF3347	7,99 a	0,44 bcd	0,05 b
Venus	8,03 a	0,41 abc	0,05 b
Genesis	9,83 b	0,53 d	0,03 ab
Aragón	9,08 ab	0,48 cd	0,06 bc
Alta sierra 2	8,01 a	0,52 d	0,01 a
APG6567	8,40 a	0,43 abcd	0,04 ab
APG44669	8,37 a	0,34 a	0,09 c
	*	**	**
Tratamiento (T)			
SEH	8,70	0,40	0,06
CEH	8,34	0,48	0,04
	ns	**	*
P x T	ns	ns	ns

ns: no significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas y letras iguales indican diferencias no significativas, según prueba de DMS de Fischer ($p \leq 0,05$).

Correlaciones entre variables morfo-fisiológicas, biomasa y parámetros de arquitectura de raíz.

En general, las correlaciones entre las variables morfo-fisiológicas, de producción de biomasa y parámetros de arquitectura de raíz fueron bajas y no significativas (Tabla 8). Sin embargo, destaca la alta y negativa correlación ($r = -0,778$) entre Ψ_x y T_h , indicando que, la temperatura de la hoja en las plantas aumenta cuando estas se encuentran bajo una condición de estrés hídrico, concordando con los resultados obtenidos (Tabla 2, 3 y 4). Además, entre el Ψ_x y $MsRF$ también se evidenció una correlación inversa significativa, es decir, a medida que disminuye el potencial xilemático en las plantas aumenta el desarrollo de raíces finas, ya que bajo condiciones de estrés hídrico se favorece el desarrollo de estas (Moreno *et al.*, 2008).

Se observó también una alta y negativa correlación entre g_s y BDI ($r = -0,785$), indicando que a mayores valores de g_s en las plantas evaluadas estas presentan menores valores BDI . Estos resultados indican que las poblaciones evaluadas que

presentan una elevada conductancia estomática tienden a modificar su arquitectura de raíz presentando un sistema de raíz altamente ramificado, el cual favorece la captación de agua y nutrientes del suelo satisfaciendo las necesidades de la planta (Lynch *et al.*, 2007). Las poblaciones también mostraron una correlación negativa entre las variables RLD y DBI ($r = -0,825$), lo que está en concordancia con las modificaciones en la arquitectura de raíz observadas en el estudio (Tabla 7), ya que las plantas al estar bajo una condición de estrés hídrico presentan mayores valores de RLD, lo que indica una mayor capacidad de exploración de las raíces (Inostroza *et al.*, 2020) y menores valores de DBI, que están asociados a sistemas de raíces altamente ramificados. Siendo esta modificación en la arquitectura de raíz una respuesta de supervivencia al estrés hídrico.

Por otro lado, se destaca una correlación alta y positiva ($r = 0,885$), entre AP y TC, indicando que en la medida que aumenta la altura de la planta aumenta a su vez la tasa de crecimiento relativo. Concordando con lo observado en la tabla 5, donde las plantas sin estrés hídrico presentaron mayores valores en ambas variables. Siendo un resultado esperado ya que la variable TC es dependiente de AP. También se observó una correlación alta y positiva ($r = 0,849$) entre las variables Dc y MsRF, lo que indica que, para este ensayo, las poblaciones que mostraron valores mayores de Dc poseían a su vez un mayor valor de MsRF. Un mayor Dc está asociado en trébol rojo a mayor persistencia de las plantas (Marshall *et al.*, 2017). De igual modo, el aumento de raíces finas está asociado a sistemas de raíz más eficientes en la captación de agua y nutrientes del suelo (Eissenstat, 1992). Por lo que ambas variables están asociados a una respuesta de aclimatación de la planta en condiciones de estrés hídrico.

Tabla 8. Correlación de Pearson entre variables morfo-fisiológicas, biomasa y parámetros de arquitectura de raíz evaluadas en poblaciones de *Medicago sativa* y *Medicago Alborea* en condiciones hídricas contrastantes.

	Ψ_x	gs	Chl	Anth	NBI	AF	AFE	T°h	AP	TC	MsAT	MsRF	MsRT	Dc	RLD	DBI
Ψ_x																
gs	0,59															
Chl	0,05	-0,31														
Anth	0,58	0,43	-0,34													
NBI	-0,12	-0,05	0,88	-0,41												
AF	-0,45	-0,19	-0,16	0,11	-0,03											
AFE	-0,39	-0,23	0,13	-0,01	0,25	-0,15										
T°h	-0,78	-0,39	-0,07	-0,29	0,14	0,34	0,62									
AP	-0,38	-0,20	0,11	-0,13	0,23	-0,10	0,85	0,34								
TC	-0,39	-0,03	0,01	-0,11	0,24	-0,20	0,95	0,58	0,88							
MsAT	-0,39	-0,25	0,41	-0,73	0,51	-0,54	0,55	0,38	0,51	0,62						
MsRF	-0,83	-0,59	0,19	-0,63	0,27	0,59	0,00	0,38	0,19	0,00	0,19					
MsRT	0,25	-0,44	0,07	-0,13	-0,36	-0,34	-0,43	-0,57	-0,26	-0,52	-0,09	-0,02				
Dc	-0,49	-0,28	0,43	-0,67	0,53	0,44	-0,30	0,03	-0,03	-0,23	0,17	0,85	-0,01			
RLD	0,12	0,45	-0,35	0,02	-0,20	0,48	-0,75	-0,40	-0,46	-0,58	-0,56	0,22	-0,05	0,45		
DBI	-0,43	-0,78	0,34	-0,36	0,13	-0,34	0,59	0,35	0,49	0,42	0,60	0,24	0,36	-0,06	-0,82	

Ψ_x : Potencial xilemático, gs: conductancia estomática, Chl: contenido de clorofila, Anth: contenido de antocianinas, NBI: índice de balance de nitrógeno, AF: área foliar, AFE: área foliar específica, T°h: temperatura de la hoja, AP: altura de planta, TC: tasa de crecimiento relativo, MsAT: materia seca aérea total, MsRF: materia seca de raíces finas, MsRT: materia seca de raíz total, Dc: diámetro de corona, RLD: densidad de longitud de raíz, DBI: índice de ramificación. Color rojo indica correlación significativa ($P < 0,05$) entre variables.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó este ensayo, donde se evaluaron poblaciones de alfalfa previamente seleccionadas por su comportamiento agronómico sobresaliente en condiciones de sequía severa en ambientes Mediterráneos, es posible concluir que:

- Bajo condiciones de estrés hídrico, todas las poblaciones de *M. alborea* y *M. sativa* modificaron la expresión morfológica y fisiológica a nivel aéreo de forma similar. Además, no se encontró atributos fenotípicos que pudieran diferenciar los híbridos alborea de *M. sativa*.
- A nivel de raíz, las poblaciones evaluadas mostraron habilidad para modificar su arquitectura radical bajo condiciones de estrés hídrico. En general, se observó un sistema de arquitectura de raíz más dicótomo y un mayor valor de RLD en condiciones de estrés hídrico respecto a la condición sin estrés hídrico.
- Las diferencias en la arquitectura de raíz fueron acompañadas de ventajas agronómicas en algunas poblaciones. Por ejemplo, la población APG44669 mostró el mayor valor de DBI y alcanzó la mayor producción de materia seca aérea. Por otro lado, Alta Sierra alcanzó el menor valor de DBI con la menor producción de materia seca aérea.

REFERENCIAS

1. Anjum, S. A., U. Ashraf, A. Zohaib, M. Tanveer, M. Naeem, I. Ali, T. Tabassum and U. Nazir. 2017. Growth and development responses of crop plants under drought stress: a review. *Zemdirbyste*. 104(3): 267-276.
2. Annicchiarico, P., B. Barrett, C. Brummer, B. Julier, and H. Marshall. 2015. Achievements and challenges in improving temperate perennial forage legumes. *Crit. Rev. Plant Sci*. 34(1-3): 327-380.
3. Annicchiarico, P., L. Pecetti, and A. Tava. 2013. Physiological and morphological traits associated with adaptation of lucerne (*Medicago sativa*) to severely drought-stressed and to irrigated environments. *Ann. Appl. Biol*. 162(1): 27-40.
4. Bao, Y., P. Aggarwal, N. E. Robbins, C. J. Sturrock, M.C. Thompson, H. Q. Tan and J. R. Dinnyen. 2014. Plant roots use a patterning mechanism to position

- lateral root branches toward available water. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111(25): 9319-9324.
5. Barnes, D. K. 1980. Alfalfa. pp 177-187. In: W. Fehr and H. Hadley (Eds.). *Hybridization of Crop Plants*. ASA-CSSA. Wisconsin, USA.
 6. Barnes, D. K., B. P. Goplen and J. E. Baylor. 1988. Highlights in the USA and Canada. pp 1-24. In: A. A. Hanson, D. K. Barnes and R. R. Hill (Eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Vol 29. ASA. Wisconsin, USA.
 7. Beidler, K. V., B. N. Taylor, A. E. Strand, E. R. Cooper, M. Schönholz and S. G. Pritchard. 2014. Changes in root architecture under elevated concentrations of CO₂ and nitrogen reflect alternate soil exploration strategies. *New Phytol.* 205(3): 1153-1163.
 8. Bingham, E., D. Armour, and J. Irwin. 2013. The hybridization barrier between herbaceous *Medicago sativa* and woody *M. arborea* is weakened by selection of seed parents. *Plants*. 2(2): 343-353.
 9. Cha-Um, S., N. T. H. Nhung and C. Kirdmanee. 2010. Effect of mannitol-and salt-induced iso-osmotic stress on proline accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of rice cultivars (*Oryza sativa* L. spp. indica). *Pak. J. Bot.* 42(2): 927-941.
 10. Chavarría, J., G. Klee, y N. Caro. 2001. La alfalfa en suelos de secano. 1. Su adaptación en la precordillera andina de la octava región. Informativo INIA Quilamapu no. 48. INIA Quilamapu. Chillán, Chile.
 11. del Pozo, A., C. Ovalle, S. Espinoza, V. Barahona, M. Gerding and A. Humphries. 2017. Water relations and use-efficiency, plant survival and productivity of nine alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars in dryland Mediterranean conditions. *Eur. J. Agron.* 84:16-22.
 12. Eissenstat, D. M. 1992. Costs and benefits of constructing roots of small diameter. *J. Plant. Nutr.* 15(6-7): 763-782.
 13. Erice, G., S. Louahlia, J. Irigoyen, M. Sanchez-Diaz, and C. Avice. 2010. Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *J. Plant. Physiol.* 167(2): 114-120.

14. Galván, M., J. Shibata, A. Esteva, P. Jiménez, E. Villegas & L. Posadas. 2003. Déficit hídrico en planta, acumulación de biomasa y área foliar en tres etapas vegetativas en frijol común. *Agricultura Técnica en México*. 29(2), 101-111.
15. Hanci, F. and E. Cebeci. 2014. Investigation of proline, chlorophyll and carotenoids changes under drought stress in some onion (*Allium cepa* L.) cultivars. *TURKJANS*. 2: 1499-1504.
16. Huang, Z., Y. Liu, Z. Cui, Y. Fang, H. He, R. Liu and L. Wu. 2018. Soil water storage deficit of alfalfa (*Medicago sativa*) grasslands along ages in arid area (China). *Field Crops Res*. 221: 1-6.
17. Humphries, A.W., C. Ovalle, S. Hughes, A. del Pozo, L. Inostroza, V. Barahona, and B. Kilian. 2020. Characterization and pre-breeding of diverse alfalfa wild relatives originating from drought-stressed environments. *Crop Sci*. 61(1): 69-88.
18. InfoStat (2008). InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
19. Inostroza, L., F. Ortega-Klose, C. Vásquez and R. Wilckens. 2020. Changes in Root Architecture and Aboveground Traits of Red Clover Cultivars Driven by Breeding to Improve Persistence. *Agronomy*. 10(12): 1896.
20. Inostroza, L., S. Espinoza, V. Barahona, M. Gerding, A. Humphries, A. Del Pozo and C. Ovalle. 2020. Phenotypic Diversity and Productivity of *Medicago sativa* Subspecies from Drought-Prone Environments in Mediterranean Type Climates. *Plants*. 10(5): 862.
21. Irwin, G., J. Armour, M. Pepper and F. Lowe. 2010. Heterosis in lucerne testcrosses with *Medicago arborea* introgressions and Omani landraces and their performance in synthetics. *Crop Pasture Sci*. 61(6): 450-463. *
22. Irwin, J., J. Sewell, D. Woodfield and E. Bingham. 2015. Restructuring Lucerne (*Medicago sativa*) through introgression of the *Medicago arborea* genome. *J. Agric. Sci*. 28(1): 40–46.
23. Jangpromma, N., S. Kitthaisong, K. Lomthaisong, S. Daduang, P. Jaisil and S. Thammasirirak. 2010. A proteomics analysis of drought stress-responsive proteins as biomarker for drought-tolerant sugarcane cultivars. *Am. J. Biochem. Biotechnol*. 6(2): 89-102. *

24. Kashif, M. 2011. Performance of wheat genotypes under osmotic stress at germination and early seedling growth stage. *Sky J. Agric. Res.* 6: 971-975.
25. Lamb, S., K. Barnes and I. Henjum. 1999. Gain from two cycles of divergent selection for root morphology in alfalfa. *Crop Sci.* 39(4): 1026-1035.
26. Leinonen, I. and H.G. Jones. 2004. Combining thermal and visible imagery for estimating canopy temperature and identifying plant stress. *J. Exp. Bot.* 55(401): 1243-1231.
27. Liang, X., J. E. Erickson, W. Vermerris, D. L. Rowland, L. E. Sollenberger and M. L. Silveira. 2016. Root architecture of sorghum genotypes differing in root angles under different water regimes. *J. Crop Improv.* 31(1): 39-55.
28. Lynch, J. P. 2007. Roots of the second green revolution. *Aust. J. Bot.* 55(5): 493-512.
29. Mafakheri, A., A. F. Siosemardeh, B. Bahramnejad, P. C. Struik and Y. Sohrabi. 2010. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Aust. J. Crop Sci.* 4(8): 580-585.
30. Marshall, A. H., R. P. Collins, J. Vale and M. Lowe. 2017. Improved persistence of red clover (*Trifolium pratense* L.) increases the protein supplied by red clover/grass swards grown over four harvest years. *Eur. J. Agron.* 89: 38-45.
31. McCulley, L., G. Jobbagy, T. Pockman and B. Jackson. 2004. Nutrient uptake as a contributing explanation for deep rooting in arid and semi-arid ecosystems. *Oecologia.* 141(4): 620-628.
32. Mendez, J. 2013. Identificación de caracteres fenotipicos asociados a la tolerancia al estrés hídrico en accesiones de *Lotus tenuis* Waldst. Et kit. Ex willd., tolerante y sensible a la falta de riego. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
33. Mensah, J. K., B. O. Obadoni, P. G. Eruotor and F. Onome-Irieguna. 2009. Simulated flooding and drought effects on germination, growth, and yield parameters of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Afr. J. Biotechnol.* 5(13): 1249-1253.

34. Moreno, M., J. Gulías, M. Lazaridou, H. Medrano and J. Cifre. 2008. Ecophysiological strategies to overcome water deficit in herbaceous species under Mediterranean conditions. *Cah. Options Mediterr.* 79(1): 247-257.
35. Mouradi, M., M. Farissi, A. Bouizgaren, B. Makoudi, A. Kabbadj, A. Very, H. Sentenac, A. Qaddourya and C. Ghoulam. 2015. Effects of water deficit on growth, nodulation and physiological and biochemical processes in *Medicago sativa*-rhizobia symbiotic association. *Arid Land Res. Manag.* 30(2): 193-208.
36. Muller, H., C. Poncet, M. Prosperi, S. Santoni and J. Ronfort. 2005. Domestication history in the *Medicago sativa* species complex: inferences from nuclear sequence polymorphism. *Mol. Ecol.* 15(6): 1589-1602.
37. Noitsakis, B., M. Radoglou and G. Jarvis. 1991. Water relation and growth in two years old seedlings of *Medicago arborea* under short-time water stress. *Phyton.* 31(1): 111-120.
38. Odorizzi, A., D. Basigalup, V. Arolfo and M. Balzarini. 2008. Análisis de la variabilidad de caracteres de raíz en poblaciones de alfalfa (*Medicago sativa* L.) con alto número de raíces laterales. *Agriscientia.* 25(2): 65-73.
39. Ohashi, Y., N. Nakayama, H. Saneoka and K. Fujita. 2006. Effects of drought stress on photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence, and stem diameter of soybean plants. *Biol. Plant.* 50 (1): 138-141.
40. Oral, E., R. Tunçtürk and M. Tunçtürk. 2021. The effect of rhizobacteria in the reducing drought stress in soybean (*Glycine max* L.). *Legum. Res.* 44(10): 1172-1178.
41. Pinheiro, C. and M. Chaves. 2011. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. *J. Exp. Bot.* 62(3): 869-882.
42. Prosperi, M., E. Jenczewski, M. Angevain and J. Ronfort. 2006. Morphologic and agronomic diversity of wild genetic resources of *Medicago sativa* L. collected in Spain. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53(4): 843-856.
43. Quiros, C. F., and G. R. Bauchan. 1988. The genus *medicago* and the origin of the *Medicago sativa* comp. *Alfalfa and alfalfa improvement.* 29: 93-124.
44. Robbins, N. E. and J. R. Dinneny. 2015. The divining root: moisture-driven responses of roots at the micro-and macro-scale. *J. Exp. Bot.* 66(8): 2145-2154.

45. Sabiel, S. A., A. A. Abdelmula, E. M. Bashir, S. Khan, S. Yingying, Y. Yang, S. U. Baloch and W. Bashir. 2014. Genetic variation of plant height and stem diameter traits in maize (*Zea mays* L.) under drought stress at different growth stages. *J. Nat. Sci. Res.* 4(23): 116-122.
46. Sánchez, M. 2008. Caracterización de accesiones de *Lotus glaber* Mill. según respuesta a restricción hídrica. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
47. Sim, E., E. Brown, I. Teixeira and J. Moot. 2017. Soil water extraction patterns of Lucerne grown on stony soils. *Plant and soil.* 414(1): 95-112.
48. Soto, P. 1992. Técnicas agronómicas para el cultivo de la alfalfa, adaptación y establecimiento. Serie Carillanca. INIA Quilamapu, Chillán, Chile.
49. Taiz, L., E. Zeiger, I. M. Moller and A. Murphy. 2015. *Plant physiology and development.* (6th. ed.). Sinauer Associates Inc. Sunderland, USA.
50. Tang, L., H. Cai, W. Ji, X. Luo, Z. Wang, J. Wu and X. Bai. 2013. Overexpression of GsZFP1 enhances salt and drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 71: 22-30.
51. Tani, E., E. G. Chronopoulou, N. E. Labrou, E. Sarri, M. Goufa, X. Vaharidi and E. M. Abraham. 2019. Growth, physiological, biochemical, and transcriptional responses to drought stress in seedlings of *Medicago sativa* L., *Medicago arborea* L. and their hybrid (Alborea). *Agronomy.* 9(1): 38.
52. Valliyodan, B. and H. T. Nguyen. 2006. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(2): 189-195.
53. Veronesi, F., E. C. Brummer and C. Huyghe. 2010. Alfalfa. pp 395-437. In: B. Boller, U. K. Posselt and F. Veronesi (Eds.). *In Fodder crops and amenity grasses.* Springer. New York, USA.
54. Wang, H., Q. Zhou. and P. Mao. 2020. Ultrastructural and Photosynthetic Responses of Pod Walls in Alfalfa to Drought Stress. *Int. J. Mol. Sci.* 21(12): 4457.

55. Zhang, C., S. Shi, B. Wang and J. Zhao. 2018. Physiological and biochemical changes in different drought-tolerant alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties under PEG-induced drought stress. *Acta Physiol. Plant.* 40(2): 1-15.
56. Zhang, H., N. Xu, X. Sui, H. Zhong, Z. Yin, X. Li and G. Sun. 2018. Photosystem II function response to drought stress in leaves of two alfalfa (*Medicago sativa*) varieties. *Int. J. Agric. Biol.* 20(5): 1012-1020.
57. Zhu, L., H. Zhang, X. Gao, Y. Qi and X. Xu. 2016. Seasonal patterns in water uptake for *Medicago sativa* grown along an elevation gradient with shallow groundwater table in Yanchi county of Ningxia, Northwest China. *J. Arid Land.* 8(6): 921-934.
58. Zhu, L., S. H. Li, Z. S. Liang, Z. F. Zhang and X. Xu. 2010. Relationship between yield, carbon isotope discrimination and stem carbohydrate concentration in spring wheat grown in Ningxia Irrigation Region (North-west China). *Crop and Pasture Sci.* 61(9): 731-742.
59. Zobayed, S. M. A., F. Afreen and T. Kozai. 2005. Temperature Stress Can Alter the Photosynthetic Efficiency and Secondary Metabolite Concentrations in *St. John's wort*. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 977-984.

APÉNDICES

Apéndice 1. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) registrada en el invernadero entre la primera y segunda evaluación.

