

# **Bases ecofisiológicas relacionadas con la tolerancia a la inundación y la defoliación en especies conspicuas de pastizales húmedos**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,  
Área Ciencias Agropecuarias*

**Milena Elisa Manzur**

Bióloga - Universidad Nacional de Córdoba - 2005

Lugar de trabajo: IFEVA-CONICET-FAUBA



**FAUBA**

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



## COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis  
**Gustavo Gabriel Striker**  
Ing. Agrónomo (UBA)  
Dr. (UBA)

Co-director  
**Agustín Alberto Grimoldi**  
Ing. Agrónomo (UBA)  
M. Sc. (UBA)  
Dr. (Technische Universität München,  
Freising-Weihenstephan, Alemania.)

Consejero de Estudios  
**Pedro Insausti**  
Ing. Agrónomo (UBA)  
M. Sc. (UBA)  
Dr. (UBA)

## **JURADO DE TESIS**

Director de tesis  
**Gustavo Gabriel Striker**  
Ing. Agrónomo (UBA)  
Dr. (UBA)

JURADO  
**Ignacio Martín Barberis**  
Ing. Agrónomo (UNR)  
Dr. (Universidad Nacional de Rosario)

JURADO  
**Oscar Ruiz**  
Bioquímico (Universidad Nac. del Nordeste)  
Dr. (Universidad Nac. del Nordeste)

JURADO  
**Gerardo Rubio**  
Ing. Agrónomo (UBA)  
Dr. (UBA)

Fecha de defensa de la tesis: 29 de Marzo de 2012

*A mis viejos, a Gus y a Vero.*

## Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que por distintas vías, en los distintos ámbitos, en distinta intensidad y en los distintos estadios ontogénicos de esta tesis, colaboraron conmigo, desde presentarme a una beca hasta el día de la defensa oral!! y que sin duda, si no hubieran estado, todo el trabajo que está escrito en las páginas que siguen no existiría.

Gustavo Striker, mi “maestro” y amigo, que se jugó desde el principio y además convenció al resto del comité!! Al profesor Rolando J.C. León, por su buena predisposición y apoyo, al resto de mi comité de doctorado Agustín Grimoldi, por las reuniones y discusiones, y Pedro Insausti;

A Tim Colmer, por sus aportes y comentarios sobre los experimentos y manuscritos;

A Regina Izaguirre y Emilce por su ayuda con los experimentos!

A Roberto Fernández Alduncin, Rodolfo Golluscio;

A los chicos que me ayudaron en tareas de campo Wally, Juan Carlos y Roberto Tornese;

A Mirta Rabadán, Marisol López, Melina;

A Daniel Bertero;

A mis compañeros de oficina Sebastián, María y Adelia;

A los chicos de Botánica Gaby Zarlavsky, J. Pablo Torreta, Hugo, Anita Mantesse; por toda la ayuda que siempre me dan!

A mi hermana del alma Vero “*freaky*” Reinoso, al resto de mi *familia adoptiva* Pablo Giménez, Carlos Ottone y Leti;

A Lu Couso y Esteban Fernández, por su contención y amistad siempre!

A las chicas de los *lunes rotos* Adelia, Male Druille y Mechi Vasallo, que rompen la rutina!

A Romi Cavagnaro, Luis Pérez, Fer Biganzoli

A Beatriz Santos,

A Pame Graff y Oggy, siempre con buena onda y consejos útiles!

A Caro y Palo, mis amigos de la montaña!

A Mer Silva y Daniel que me conectan con la naturaleza!

A Luisa y Manuel, que hacen su trabajo lo mejor posible!

A mi familia, que están lejos pero los llevo conmigo siempre! Y por supuesto a mis *roommates* Narciso y Poseidón!!

A todos muchas gracias!!!!

*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.*

**Publicaciones derivadas de la tesis**

- 1- **Manzur ME**, Grimoldi AA, Insausti P, Striker GG. **2009**. Escape from water or remain quiescent? *Lotus tenuis* changes its strategy depending on depth of submergence. *Annals of Botany* **104**: 1163–1169.

## ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>DECLARACIÓN</b> .....	<b>v</b>
<b>PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Capítulo 1:</b>	
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>7</b>
<b>Capítulo 2: CRECIMIENTO DE RAÍCES DURANTE LA INUNDACIÓN</b>	
<b>A.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
Objetivo.....	<b>13</b>
Hipótesis A.1.....	<b>11</b>
Hipótesis A.2.....	<b>11</b>
<b>A.2 METODOLOGÍA</b>	
Material vegetal y establecimiento del sistema.....	<b>11</b>
Tasa de elongación de raíces adventicias.....	<b>12</b>
Mediciones de pérdida radial de oxígeno de las raíces (ROL).....	<b>13</b>
Análisis anatómicos (aerénquima y cuantificación de suberina).....	<b>15</b>
Análisis estadísticos.....	<b>16</b>
<b>A.3 RESULTADOS</b>	
Porcentaje de aerénquima.....	<b>16</b>
Pérdida radial de oxígeno.....	<b>16</b>

Suberización.....	18
Elongación de raíces.....	20
<b>A.4 DISCUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>Capítulo 3: ESTRATEGIAS DE CRECIMIENTO DE <i>Lotus tenuis</i> y <i>Paspalum dilatatum</i> FRENTE A DISTINTAS INTENSIDADES DE INUNDACIÓN</b>	
<b>B.1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>26</b>
Objetivo 2.....	28
Hipótesis B.1.....	28
<b>B.2 METODOLOGÍA</b>	
Material vegetal y establecimiento del sistema.....	28
Tratamientos de intensidades de inundación.....	29
Porosidad.....	29
Número, longitud de tallos/hojas y ángulo de inserción de los macollos.....	30
Biomasa y contenido de clorofila.....	30
Análisis de carbohidratos.....	30
Análisis estadísticos.....	31
<b>B.3 RESULTADOS</b>	
Efectos de la inundación sobre la aireación del suelo y la disponibilidad de luz bajo el agua.....	31
Porosidad de las raíces.....	32
Número y longitud de los tallos de <i>Lotus tenuis</i> .....	33
Número, altura y ángulo de inserción de los macollos de <i>Paspalum dilatatum</i> .....	33
Biomasa de las plantas e intensidad de inundación.....	35
Carbohidratos solubles y almidón en coronas de <i>L. tenuis</i> .....	38
Carbohidratos solubles y almidón en láminas y vainas de <i>P. dilatatum</i> .....	39
<b>B.4 DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>Capítulo 4: EFECTOS DE LA FRECUENCIA DE DEFOLIACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTAS INUNDADAS DE <i>Lotus tenuis</i> y <i>Paspalum dilatatum</i>.</b>	

<b>C.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>47</b>
Objetivo 3.....	<b>48</b>
Hipótesis C.1.....	<b>48</b>
Hipótesis C.2.....	<b>48</b>
Hipótesis C.3.....	<b>49</b>
<b>C.2 METODOLOGÍA</b>	
Material vegetal.....	<b>49</b>
Tratamientos de inundación y frecuencias de defoliación.....	<b>49</b>
Porosidad, altura y biomasa.....	<b>50</b>
Análisis de carbohidratos.....	<b>50</b>
Análisis estadísticos.....	<b>51</b>
<b>C.3 RESULTADOS</b>	
Efectos de la inundación sobre la aireación del suelo.....	<b>51</b>
Porosidad de las raíces.....	<b>51</b>
Altura de las plantas y remoción de hojas.....	<b>51</b>
Efecto sobre la biomasa en <i>Lotus tenuis</i> .....	<b>53</b>
Efecto sobre la biomasa en <i>Paspalum dilatatum</i> .....	<b>54</b>
Número de tallos.....	<b>56</b>
Número de macollos.....	<b>57</b>
Carbohidratos solubles y almidón en las coronas de <i>Lotus tenuis</i> .....	<b>58</b>
Carbohidratos solubles y almidón en vainas de <i>Paspalum dilatatum</i> .....	<b>59</b>
<b>C.4 DISCUSIÓN</b> .....	<b>60</b>
<b>Capítulo 5: DISCUSION GENERAL</b> .....	<b>66</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>77</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>88</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 2.1.</b> Porcentaje de aerénquima a lo largo de raíces adventicias de plantas conspicuas del pastizal húmedo.....	<b>16</b>
<b>Cuadro 3.1.</b> Porosidad de raíces (%) de plantas de <i>Lotus tenuis</i> y <i>Paspalum dilatatum</i> , creciendo por 30 días bajo intensidades crecientes de inundación.....	<b>32</b>
<b>Cuadro 3.2.</b> Relaciones de biomasa ( $\text{g g}^{-1}$ ) entre los diferentes compartimentos de plantas de <i>Lotus tenuis</i> e índice de verdor (unidades Spad).....	<b>36</b>
<b>Cuadro 3.3.</b> Relaciones de biomasa ( $\text{g g}^{-1}$ ) entre los diferentes compartimentos de plantas de <i>Paspalum dilatatum</i> e índice de verdor (unidades Spad).....	<b>38</b>
<b>Cuadro 4.1.</b> Combinación de tratamientos de inundación y defoliación y sus niveles.....	<b>50</b>
<b>Cuadro 4.2.</b> Número de tallos de plantas de <i>Lotus tenuis</i> sujetas una combinación de tratamientos de inundación y defoliación al comienzo (día 0), a la mitad (día 20) y al final del experimento (día 40).....	<b>57</b>
<b>Cuadro 4.3.</b> Número de macollos de plantas de <i>Paspalum dilatatum</i> sujetas una combinación de tratamientos de inundación y defoliación al comienzo (día 0), a la mitad (día 20) y al final del experimento (día 40).....	<b>58</b>
<b>Cuadro 6.1.</b> Bases de la evolución de las tres estrategias en plantas vasculares.....	<b>90</b>
<b>Cuadro 6.2.</b> Concentraciones de carbohidratos solubles y almidón ( $\text{mg.g}^{-1}\text{PS}$ ) $\pm$ EE, en láminas, vainas y raíces de plantas de <i>Paspalum dilatatum</i> .....	<b>90</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Representación esquemática del paisaje de “Las Chilcas” .....	<b>6</b>
<b>Figura 2.1.</b> Cortes transversales de raíces mostrando las tipologías radicales graminoides y dicotiledóneas.....	<b>9</b>
<b>Figura 2.2.</b> Esquema donde se muestran patrones contrastantes de pérdida radial de oxígeno (ROL).....	<b>10</b>
<b>Figura 2.3.</b> Esquema del sistema de medición de crecimiento radical, donde se muestra la cámara de crecimiento con el burbujeo de aire y de N <sub>2</sub> , simulando condiciones aeróbicas y anaeróbicas, respectivamente.....	<b>13</b>
<b>Figura 2.4.</b> Esquema del sistema de medición de ROL.....	<b>15</b>
<b>Figura 2.5.</b> Patrón espacial de la pérdida radial de oxígeno (ROL) de cuatro especies conspicuas del Pastizal inundable: a) <i>Rumex crispus</i> , b) <i>Cyperus eragrostis</i> , c) <i>Lotus tenuis</i> y d) <i>Paspalidium geminatum</i> .....	<b>17</b>
<b>Figura 2.6.</b> Secciones transversales de raíces adventicias a 0.5 y 4 cm de distancia desde el ápice.....	<b>19</b>
<b>Figura 2.7.</b> Proporción de suberina (porcentaje de tejido suberificado en relación al área total de la sección transversal de la raíz adventicia).....	<b>19</b>
<b>Figura 2.8.</b> Longitud de raíces adventicias de especies herbáceas conspicuas del Pastizal inundable de la Pampa Deprimida.....	<b>20</b>
<b>Figura 3.1.</b> Radiación fotosintéticamente activa (PAR, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en las piletas donde se aplicaron los tratamientos.....	<b>32</b>
<b>Figura 3.2.</b> Número (a) y longitud (b) de tallos de plantas de <i>Lotus tenuis</i> crecidas por 30 días bajo intensidades crecientes de inundación.....	<b>33</b>
<b>Figura 3.3.</b> a) Número, b) longitud, c) ángulo de inserción y d) altura de macollos de plantas de <i>Paspalum dilatatum</i> crecidas bajos intensidades crecientes de inundación por 30 días.....	<b>34</b>
<b>Figura 3.4.</b> Biomasa de plantas de <i>Lotus tenuis</i> sujetas a tratamientos crecientes de inundación.....	<b>35</b>
<b>Figura 3.5.</b> Biomasa total <b>a)</b> , y separada por compartimentos: <b>b)</b> tallo y <b>c)</b> raíz, de plantas de <i>Paspalum dilatatum</i> sujetas a tratamientos crecientes de inundación.....	<b>37</b>
<b>Figura 3.6.</b> Variación en el contenido de carbohidratos solubles (CS) y almidón (día 30-día 0) y concentración final en coronas de plantas de <i>Lotus tenuis</i> , sujetas a intensidades crecientes de inundación.....	<b>39</b>

<b>Figura 3.7.</b> Variación en el contenido de carbohidratos solubles (CHS) y almidón (día 30-día 0) y concentración final en láminas y vainas de plantas de <i>Paspalum dilatatum</i> , sujetas a intensidades crecientes de inundación.....	<b>40</b>
<b>Figura 4.1.</b> Esquema donde se ilustra la secuencia de aplicación de los tratamientos de inundación por 40 días y defoliación en plantas de <i>Lotus tenuis</i> y <i>Paspalum dilatatum</i> .....	<b>50</b>
<b>Figura 4.2.</b> Altura de las plantas de <i>Lotus tenuis</i> sujetas a tratamientos combinados de inundación y defoliación.....	<b>52</b>
<b>Figura 4.3.</b> Altura de plantas de <i>Paspalum dilatatum</i> sujetas a tratamientos combinados de inundación y defoliación.....	<b>53</b>
<b>Figura 4.4.</b> Biomasa de plantas de <i>Lotus tenuis</i> sujetas a una combinación de tratamientos de inundación y defoliación.....	<b>55</b>
<b>Figura 4.5.</b> Biomasa de plantas de <i>Paspalum dilatatum</i> sujetas a una combinación de tratamientos de inundación y defoliación.....	<b>56</b>
<b>Figura 4.6.</b> Concentración de carbohidratos solubles (CS) y almidón en coronas de plantas de <i>Lotus tenuis</i> sujetas a tratamientos combinados de inundación y defoliación.....	<b>59</b>
<b>Figura 4.7.</b> Concentración de carbohidratos solubles (CS) y almidón en vainas de plantas de <i>Paspalum dilatatum</i> , sujetas a tratamientos de inundación y defoliación durante 40 días.....	<b>60</b>
<b>Figura 5.1.</b> Esquema del ápice de una raíz adventicia de una especie dicotiledónea y una graminoide.....	<b>68</b>
<b>Figura 5.2.</b> Esquema donde se muestran las principales respuestas observadas en plantas de <i>Lotus tenuis</i> y <i>Paspalum dilatatum</i> cuando son sometidas a intensidades crecientes de inundación y a la combinación de estrés por defoliaciones sucesivas en presencia de inundación.....	<b>71</b>
<b>Figura 5.3.</b> Esquemas de los cuatro tipos de arreglo aerenquimático de las especies estudiadas en esta tesis.....	<b>75</b>
<b>Figura 6.1.</b> Valores promedio de precipitaciones anuales en la Depresión del Salado.....	<b>89</b>

## **Bases ecofisiológicas relacionadas con la tolerancia a la inundación y la defoliación en especies conspicuas de pastizales húmedos**

### **RESUMEN**

Las inundaciones y el pastoreo son disturbios importantes que modulan la estructura y el funcionamiento de pastizales húmedos. La inundación genera un ambiente anaeróbico en el suelo, disminuyendo la disponibilidad de oxígeno para las raíces, mientras que el pastoreo afecta a la vegetación mediante la defoliación selectiva del forraje. En primer lugar se investigaron los rasgos anatómicos y las respuestas fisiológicas relacionadas con el crecimiento bajo anaerobiosis de raíces de gramínoideas (*Paspalidium geminatum*, *Cyperus eragrostis*) y dicotiledóneas (*Lotus tenuis*, *Rumex crispus*) con distintos tipos de aerénquima. Se encontró que las gramínoideas mantienen la tasa de elongación de sus raíces bajo anaerobiosis, con alta proporción de aerénquima para conducir oxígeno y una barrera física (>suberina) – constitutiva en *P. geminatum* e inducida en *C. eragrostis* – que limita la pérdida radial de oxígeno hacia la rizósfera. Por el contrario, las dicotiledóneas disminuyen la elongación radical en medio anaeróbico, a pesar de incrementar el aerénquima en sus raíces, asociado a una alta pérdida radial de oxígeno y una menor deposición de suberina en la corteza radical externa. En segundo lugar, se estudiaron las estrategias de crecimiento de *L. tenuis* y *P. dilatatum* bajo condiciones de sumersión parcial y completa de sus plantas (*i.e.* intensidad de inundación), con énfasis en el uso de carbohidratos de reserva. Se demostró que *L. tenuis* puede desarrollar dos estrategias de crecimiento: ‘escape’ del agua bajo sumersión parcial sin usar sus reservas y sobrevivir 30 días en estado de ‘quiescencia’ bajo sumersión completa utilizando sus reservas. Por el contrario, *P. dilatatum* sólo desarrolla ‘escape’ bajo sumersión parcial y no tolera (muere) la sumersión completa. En tercer lugar, se evaluaron las respuestas de *L. tenuis* y *P. dilatatum* frente a la combinación inundación/frecuencia de defoliación. Aquí se encontró que *L. tenuis* tolera los eventos sucesivos de defoliación bajo inundación, con un mínimo crecimiento, a partir de priorizar la emergencia de las hojas fuera del agua post-corte, utilizando exhaustivamente las reservas en coronas. Por el contrario, *P. dilatatum* no sobrevive a dos defoliaciones si se encuentra bajo anegamiento. De esta manera, si bien ambas especies toleran la inundación y la defoliación por separado, si estos estreses se combinan se compromete la supervivencia de la gramínea y el rebrote de la leguminosa. En consecuencia, resulta importante considerar el tiempo entre defoliaciones sucesivas, si el suelo está inundado, al momento de planificar las estrategias de manejo de estas especies en el pastizal.

*Palabras claves:* *Cyperus eragrostis*, defoliación, escape, inundación, *Lotus tenuis*, *Paspalum dilatatum*, *Paspalidium geminatum*, pérdida radial de oxígeno, quiescencia, raíces, *Rumex crispus*.

## Ecophysiological basis of tolerance to flooding and defoliation in humid grasslands species

### ABSTRACT

Flooding and grazing are major disturbances that modulate the structure and function of humid grasslands. Flooding provokes an anaerobic soil condition, reducing the oxygen availability for roots, while grazing affects vegetation through selective defoliation of forage. First, it was investigated the anatomical features and physiological responses related to growth under anaerobiosis of graminoids (*Paspalidium geminatum*, *Cyperus eragrostis*) and dicots (*Lotus tenuis*, *Rumex crispus*) with different aerenchyma type. Results showed that graminoids were able to maintain the root elongation rate under anaerobiosis, with high aerenchyma proportion for oxygen transport and a physical barrier (> suberin that was constitutive in *P. geminatum* and flood-induced in *C. eragrostis*), which limits the radial oxygen loss towards the rhizosphere. Conversely, root elongation rates decrease in dicots under anaerobic environment, despite high aerenchyma increases in their roots. This was associated with a high radial oxygen loss and a lower suberin deposition in the outer cortex of roots. Second, it was studied the growth strategies of *L. tenuis* and *P. dilatatum* under partial and complete submergence conditions (*i.e.* intensity of flooding), with emphasis on reserve carbohydrates uses. It was shown that *L. tenuis* can develop two strategies for growth, 'escape' from water under partial submersion without using its reserves, and survival 30 days in a state of 'quiescence' under complete submergence by using its reserves. By contrast, *P. dilatatum* only develops 'escape' under partial submergence and it does not tolerate (dies) complete submergence. Third, it was evaluated the responses of *L. tenuis* and *P. dilatatum* to the combination of flooding and defoliation frequency. Here we found that *L. tenuis* tolerates successive events (two) of defoliation under flooding conditions, with minimal growth, but always prioritizing the shoots emergence from water and by using its crown reserves extensively for doing this. By contrast, *P. dilatatum* does not survive if two defoliations occur under flooding conditions. Thus, although both species are able to tolerate flooding and defoliation stress separately, if both are combined, they compromise the survival of the grass and regrowth of the legume. Therefore, the time between successive defoliation events should be considered when planning management strategies for these species in the flooded grasslands.

*Key words:* *Cyperus eragrostis*, defoliation, escape, flooding, *Lotus tenuis*, *Paspalum dilatatum*, *Paspalidium geminatum*, quiescence radial oxygen loss, roots, *Rumex crispus*.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

### Capítulo 1

Los pastizales húmedos cubren aproximadamente el 10% de la superficie terrestre (Revenga *et al.*, 1998). Las especies vegetales que habitan estos tipos de pastizales están frecuentemente sujetas a condiciones de estrés abiótico por períodos de excesos hídricos y por la defoliación, producto de la actividad ganadera (McNaughton, 1983; Sala *et al.*, 1986; Insausti *et al.*, 1999; Van Eck *et al.*, 2006; Striker *et al.*, 2011). Tanto las inundaciones temporarias, como los eventos de defoliación pueden diferir en estacionalidad, duración, intensidad y frecuencia. Esto trae como consecuencia un amplio espectro de condiciones a las que pueden estar sujetas las plantas que habitan en estos ambientes, y que en definitiva imponen limitaciones para su crecimiento, determinando la distribución y abundancia de las especies según su tolerancia a dichos factores de estrés (Armstrong y Beckett, 1985; Voesenek *et al.*, 2004).

Los efectos de la inundación sobre el suelo están relacionados con la disminución significativa de oxígeno, debido a la baja tasa de difusión que presenta este gas en el agua, lo que genera un ambiente anaeróbico para las raíces (Armstrong, 1979). Además de la deficiencia de oxígeno, y dependiendo del tipo de suelo, la inundación puede imponer otros desafíos para las raíces: la acumulación de  $Mn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $S^{-2}$ , ácidos carboxílicos,  $CO_2$  y etileno, como consecuencia de la actividad microbiana en la rizósfera (Ponnamperuma, 1984). En los tejidos sumergidos, el etileno endógeno incrementa su presión parcial entre 0.1 y 1 Pa (Jackson, 2008). Puede existir, además, una interacción entre la inundación y los componentes químicos del suelo, como la salinidad (Barrett-Lennard, 2003) y las altas concentraciones de aluminio (Setter *et al.*, 2009).

La crisis energética a la que están sometidas las plantas bajo anoxia es uno de los problemas más severos, ya que el  $O_2$  es el aceptor final de electrones en la fosforilación oxidativa que, indirectamente, provee de ATP a la planta. Sin embargo, puede existir una aclimatación metabólica en las especies tolerantes, que le permite a la planta obtener energía con una menor eficiencia a partir de la fermentación (Gibbs y Greenway, 2003). Otro de los efectos de la anaerobiosis en la planta, es la formación de aerénquima, tejidos especiales formados por espacios de aire que facilitan la difusión del oxígeno desde la parte aérea de la planta hacia los órganos sumergidos (Colmer, 2003b). Por esta vía, el oxígeno difunde longitudinalmente hacia el ápice de las raíces, o bien puede perderse radialmente hacia la rizósfera. Esta pérdida radial de oxígeno hacia la rizósfera (de aquí en adelante denominada ROL) reduce significativamente su disponibilidad en los ápices radicales (Colmer y Voesenek, 2009). Por lo tanto, las especies que presentan una alta tasa de ROL presentan un menor crecimiento de sus raíces durante eventos de inundación. Por el contrario, las especies de mayor tolerancia a la inundación presentan una muy baja tasa de ROL en la región basal de sus raíces (Visser *et al.*, 2000; McDonald *et al.*, 2001; Kotula *et al.*, 2009). La pérdida radial de oxígeno en condiciones de anaerobiosis ha sido cuantificada en diferentes especies herbáceas, principalmente en el cultivo de arroz (*Oryza sativa*, Colmer *et al.*, 1998; Colmer, 2003a). Sin embargo, no están establecidos los rasgos anatómicos ni las respuestas plásticas que pueden ser inducidas en las raíces como consecuencia de la inundación y que se relacionen con la menor tasa de ROL que podrían presentar especies de pastizales naturales. En este sentido, algunas evidencias sugieren como posibles barreras a la pérdida de oxígeno, el engrosamiento de las paredes celulares en la exodermis y/o aumentos en la deposición de suberina en dicha zona (Colmer, 2003a; Soukup *et al.*, 2005). Por ello, y sobre la base de estudios anatómicos de raíces en especies de los pastizales de la Pampa Deprimida (Grimoldi *et al.*, 2005; Striker *et al.*, 2007), se presume que las especies gramíneas y dicotiledóneas presentarán diferencias en el crecimiento de sus raíces durante la inundación. En el **primer capítulo experimental** se

abordó el estudio de este tema utilizando dos especies gramínoideas y dos dicotiledóneas en la búsqueda de los rasgos anatómicos y los mecanismos fisiológicos que subyacen a las respuestas diferenciales que presentan dichas especies frente a la inundación. Se exploraron las diferencias en cuanto a la tasa de elongación radical, aerénquima radical (cantidad y disposición espacial), la pérdida radial de oxígeno (ROL), complementado con estudios anatómicos detallados de cortes transversales de raíces de estas especies, que permitieron identificar las posibles barreras que disminuyen la pérdida de oxígeno hacia la rizósfera.

Las especies tolerantes también pueden cambiar su morfología en respuesta a la inundación. Estos cambios morfológicos parecen depender de la intensidad de inundación a la que se ven expuestas las plantas. En este sentido, se han propuesto dos estrategias de supervivencia frente a estrés por sumersión, escape y quiescencia (Bailey-Serres y Voesenek, 2008). Brevemente, la estrategia de escape se caracteriza por un rápido crecimiento en altura de las plantas ante una sumersión parcial que les permite ubicar una alta proporción de hojas por encima del nivel de agua para facilitar la captura de oxígeno y continuar con la fijación actual de carbono. Por el contrario, la estrategia de quiescencia se caracteriza por un estado de “dormición vegetativa” por la cual las plantas detienen casi por completo su crecimiento (sin alargamiento de tallos) y utilizan de manera conservativa sus carbohidratos de reserva para sobrevivir hasta que el nivel del agua disminuya (Bailey-Serres y Voesenek, 2008). Estas posibles estrategias han sido estudiadas en cultivares de arroz (Mettraux y Kende, 1983; Setter y Laureles, 1996) y en especies herbáceas que habitan en las riberas de los ríos, tales como *Ranunculus repens* y especies del género *Rumex* (Laan y Blom, 1990; Voesenek *et al.*, 1990; Lynn y Waldren, 2003; Pierik *et al.*, 2009). En el **segundo capítulo experimental** de esta tesis se analizaron las posibles estrategias que adoptaron dos especies conspicuas de los pastizales de la Pampa Deprimida frente a un gradiente de intensidad de inundación (testigo, suelo saturado, sumersión parcial y sumersión completa de plantas). Se utilizaron como especies representativas: la dicotiledónea leguminosa *Lotus tenuis*, y la gramínea *Paspalum dilatatum*. Para ello se determinaron variables que definen tales estrategias, en términos del crecimiento o quiescencia de las plantas, como la acumulación de biomasa por compartimentos (parte aérea, coronas [*L. tenuis*] y raíces), número de tallos/macollos, longitud de tallos/macollos, contenido de clorofila foliar para caracterizar el potencial fotosintético de las plantas y utilización de carbohidratos de reserva de coronas/láminas y vainas.

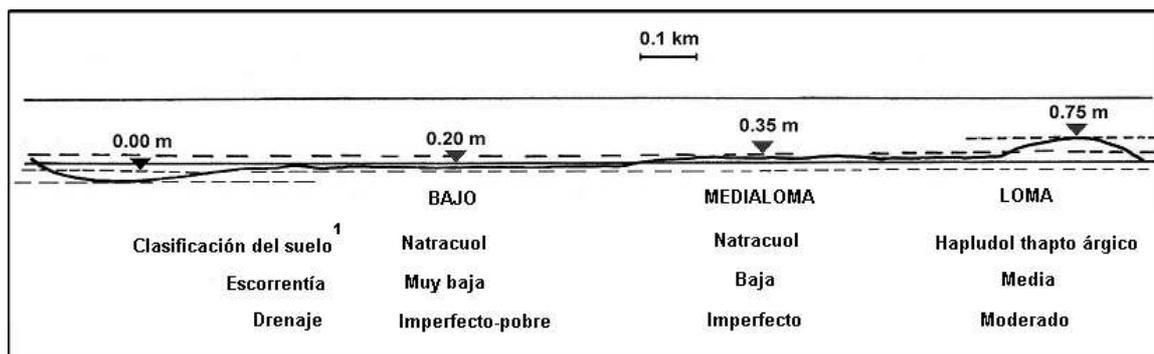
La habilidad de las plantas de cambiar su morfología en respuesta a cambios en el ambiente, es decir su plasticidad fenotípica (Bradshaw, 1965; Auld *et al.*, 2010), le permite una mejor aclimatación y funcionamiento ante condiciones de crecimiento fluctuantes, como puede ocurrir en los pastizales naturales (ej. eventos de excesos hídricos, sequía, remoción de biomasa por pastoreo; Oosterheld *et al.*, 1999). En los pastizales inundables aparece un conflicto de respuestas morfológicas de las plantas cuando la inundación se combina con la defoliación como consecuencia del pastoreo (Oosterheld y McNaughton, 1991; Striker *et al.*, 2008). Esto ocurre porque la defoliación promueve una forma de crecimiento postrada en las plantas (Detling y Painter, 1983; McNaughton, 1983; Sinclair *et al.*, 2007), mientras que la inundación induce formas de crecimiento erecto (Naidoo y Mundree, 1993; Grimoldi *et al.*, 1999; Insausti *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2009). Las plantas defoliadas son de baja estatura y concentran su biomasa en los estratos inferiores del canopeo, disminuyendo su exposición a eventos subsecuentes de defoliación (McNaughton, 1983). Por el contrario, las plantas inundadas son más altas, concentrando una alta proporción de hojas por encima del nivel del agua, facilitando la captura de oxígeno para la aireación de las

raíces a través del tejido aerenquimático (Laan *et al.*, 1990; Colmer, 2003b; Striker *et al.*, 2005). Está demostrado que este conflicto de respuestas morfológicas puede condicionar el rebrote de las plantas durante la inundación, modificando la relación de tallos sumergidos/emergidos (Striker *et al.*, 2008). Resultados obtenidos en gramíneas, con conocida dependencia de la asimilación actual de carbono (en lugar de las reservas) para el rebrote (Schnyder y de Visser, 1999), apoyan tal idea, ya que luego de una defoliación hay un alto número de tallos sumergidos (Oosterheld y McNaughton, 1991; Hayball y Pearce, 2004; Striker *et al.*, 2008). Por el contrario, en leguminosas el rebrote es sostenido por las reservas de las coronas, tal como lo demuestra el único antecedente en *Lotus tenuis*, donde su rebrote no se ve afectado luego de un evento de defoliación (Striker *et al.*, 2008). Sin embargo, cuando la inundación es prolongada, la posibilidad de que las plantas sean defoliadas en más de una oportunidad es alta (ver frecuencia de defoliación de especies de pastizal en Agnusdei y Mazzanti, 2001). Al momento, no existen antecedentes que hayan investigado los efectos de la frecuencia de defoliación en presencia de inundación sobre el crecimiento de plantas forrajeras de pastizal. En el **tercer capítulo experimental** se abordó este tema utilizando como especies modelos la gramínea *Paspalum dilatatum* y la leguminosa *Lotus tenuis*. Estas especies resultan de sumo interés como tales, no solo por pertenecer a dos grupos funcionales diferentes del pastizal (graminoides y dicotiledóneas), sino que su crecimiento luego de la defoliación depende de diferentes fuentes de carbono. La gramínea rebrota principalmente a partir de carbono fijado por fotosíntesis actual (Lattanzi *et al.*, 2005), mientras que la leguminosa puede utilizar carbohidratos de reserva para su rebrote (Smith, 1962; Kallenbach *et al.*, 2001; Striker *et al.*, 2008).

## **Los Pastizales de la Pampa Deprimida como sistema de estudio para la elección del material experimental**

En Argentina, los pastizales de la Pampa Deprimida cubren una extensa región de la provincia de Buenos Aires, dedicada casi exclusivamente a la cría de ganado vacuno (Soriano, 1991). Estos pastizales naturales han sido mejorados con la introducción de leguminosas forrajeras que promueven un desarrollo sustentable de la vegetación nativa (Berreta *et al.*, 2000). Las leguminosas forrajeras cumplen un rol importante en estos sistemas debido a su contribución de nitrógeno al suelo derivado de la fijación biológica. Adicionalmente, las especies del género *Lotus* tienen un potencial uso, que está relacionado con su capacidad de crecer en suelos ácidos o con baja fertilidad y su tolerancia al aluminio, manganeso y cloruro de sodio (Blumenthal y McGraw, 1999; revisión del potencial uso de las especies del género *Lotus* por Escaray *et al.*, 2011). Esta última característica es de suma importancia, ya que el suelo del pastizal inundable puede presentar altos niveles de salinidad, principalmente en la zona del bajo o de lagunas (Figura 1.1; Berasategui y Barberis, 1982).

Las inundaciones periódicas (Paruelo y Sala, 1990), y el pastoreo continuo son los disturbios más importantes que afectan a estos pastizales (Sala *et al.*, 1986). Según la ocurrencia en el espacio y en el tiempo puede decirse que el pastoreo, como disturbio antrópico, es generalizado en todas las comunidades del pastizal y está presente durante todo el año (Soriano, 1991). Las inundaciones por su parte, como disturbio natural, afectan a las comunidades situadas en posiciones topográficas más bajas (que abarcan la mayor superficie de la región) y son un evento de ocurrencia casi anual a principios de la primavera (Paruelo y Sala, 1990). La historia del pastoreo vacuno en los pastizales de la Pampa Deprimida se inicia en 1573, con el ingreso de ganado por Juan de Garay, pero cobra mayor relevancia recién hacia 1609 cuando se menciona por primera vez la existencia de ganado salvaje en grandes cantidades en las cercanías de Buenos Aires (Soriano, 1991). Es sabido que, desde entonces, este disturbio antrópico es una de las fuerzas modeladoras más importantes del pastizal (Sala *et al.*, 1986) a pesar de su corta historia de pastoreo (poco más de 400 años) en relación con otros pastizales subhúmedos del mundo (Milchunas *et al.*, 1988) y de que las cargas animales que soporta son generalmente medias a bajas (0.5-1.0 EV/ha) por su metodología de aprovechamiento, que es el pastoreo continuo extensivo (Soriano, 1991; Jacobo *et al.*, 2006) y también debido a la expansión de la frontera agrícola que desplaza a la actividad ganadera (Rearte, 2010). El clima regional es templado subhúmedo con una precipitación media anual que varía de 1000 en el norte a 850 mm en el sur uniformemente distribuido a lo largo del año. Las temperaturas medias son de 6.8°C en Julio-Agosto y de 21.8°C en enero. Debido al relieve plano y la ocurrencia de capas de agua altas, la mayoría de los suelos pertenecen a los complejos halo-hidromórficos y las asociaciones influenciadas por las inundaciones (Natracuoles, Natracualfs, Natralbols y Argialbols). Los suelos con un buen drenaje (Hapludoles y Argiudoles) se restringen a los altos, que son las áreas más utilizadas para la ganadería y la agricultura (ver esquema del paisaje en la Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Representación esquemática del paisaje de “Las Chilcas” (*sensu* Burkart *et al.*, 1990) indicando la posición de las comunidades de pastos y las principales características del suelo (*sensu* Berasategui y Barberis, 1982).

La inundación es el otro disturbio conspicuo que moldea al pastizal y al respecto se conocen dos vías que la originan, una de ellas corresponde al comportamiento cíclico estacional de la capa freática y la otra, más esporádica, se debe a la ocurrencia de precipitaciones intensas. Las más frecuentes ocurren casi anualmente y comienzan a principios de primavera, logrando una altura del nivel del agua de 6-10 cm sobre el suelo y con una duración aproximada de dos meses. Las de mayor magnitud suelen alcanzar niveles de agua muy superiores ( $> 0.5$  m) y se caracterizan por su ocurrencia impredecible (Paruelo y Sala, 1990). Los factores que determinan la persistencia de las inundaciones son múltiples y, generalmente, concurrentes. En primer lugar, la cantidad, duración e intensidad de las precipitaciones en relación a la capacidad de almacenaje de los suelos y de la posibilidad de infiltración. En segundo lugar, la capacidad muy limitada de desagüe por los cursos de agua naturales y por los canales; en tercer lugar, la retención que presenta el terreno, dando lugar a la formación de lagunas. La Pampa Deprimida muestra distintos sistemas hidrográficos, con redes de drenaje no definidas, en erráticas direcciones, con múltiples lagunas y humedales que, luego de las precipitaciones intensas (ver Anexo Figura 6.1), ocupan grandes extensiones (Canziani *et al.*, 2001).

Los pastizales de la Pampa Deprimida resultan un sistema pertinente para el estudio de los temas abordados, ya que las plantas de las especies gramíneas y dicotiledóneas que habitan estos pastizales resultan frecuentemente sujetas a estrés anaeróbico por inundación, factor que podría limitar diferencialmente el crecimiento radical dependiendo de la capacidad de oxigenación de las raíces que presenten las mismas (**Experimento 1**). A su vez, la diferente intensidad de inundación (*i.e.* profundidad del agua) que sufren estos pastizales, posibilita la ocurrencia de sumersión parcial y total de plantas gramíneas y dicotiledóneas (**Experimento 2**). Por último, la coexistencia en el espacio y en el tiempo de eventos de inundación con la defoliación debida al pastoreo vacuno determina que las plantas inundadas de este sistema puedan sufrir defoliaciones frecuentes durante el período de anegamiento (**Experimento 3**).

## **OBJETIVO GENERAL**

El **objetivo general** es describir y evaluar caracteres anatómicos, morfológicos y mecanismos fisiológicos relacionados con la respuesta a la inundación y a la defoliación, de especies graminoides y dicotiledóneas de los pastizales inundables de la Pampa Deprimida.

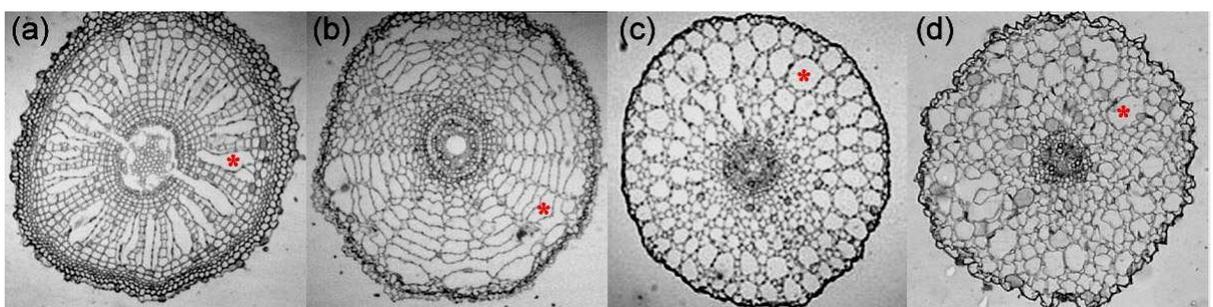
Capítulo 2

**CRECIMIENTO DE RAÍCES DURANTE LA INUNDACIÓN:  
Atributos morfológicos y anatómicos de especies graminoides y dicotiledóneas**

\* Manzur ME, Grimoldi AA, Insausti P, Striker GG. “Root elongation under anaerobic conditions as affected by the pattern of radial oxygen loss and root anatomical traits in species with different aerenchyma type” (artículo en preparación). [Resultados de avance presentados en *International Conference on Plant Vascular Biology*, Columbus, Ohio, USA 2010].

## A.1 INTRODUCCIÓN

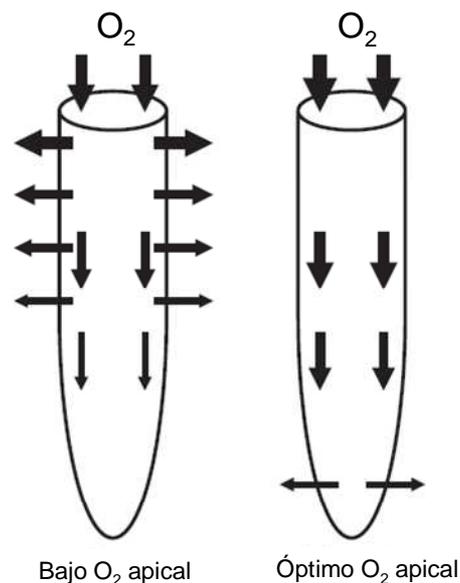
La falta de oxígeno en las raíces causada por la inundación desencadena en las plantas respuestas morfológicas, anatómicas y fisiológicas asociadas con la supervivencia en tales condiciones (Armstrong, 1979; Insausti *et al.*, 2001; Striker *et al.*, 2005; Colmer y Voeselek, 2009). Uno de los cambios morfológicos más importantes es la generación de raíces adventicias de alta porosidad, que le permiten a las plantas continuar con la absorción de agua y nutrientes durante la inundación (Visser *et al.*, 1996; Shimamura *et al.*, 2007). En las raíces de las especies tolerantes a la inundación la respuesta anatómica de mayor relevancia es la formación de aerénquima (Justin y Armstrong, 1987). Al respecto, se reconocen dos tipos principales de aerénquima: lisígeno y esquizógeno (Jackson y Armstrong, 1999; Seago *et al.*, 2005). La formación de cada uno de ellos es diferente. El aerénquima lisígeno es el resultado de la muerte selectiva de las células de la corteza de la raíz, dejando espacios de aire (Kawai *et al.*, 1998). Este tipo de aerénquima se encuentra en diversas especies cultivadas como cebada (Arikado y Adachi, 1955), trigo (Trought y Drew, 1980), arroz (Justin y Armstrong, 1991) y maíz (Drew y Lynch, 1980). El aerénquima esquizógeno se forma a causa de la separación de las capas de células sin que ocurra muerte celular, y se encuentra principalmente en dicotiledóneas que habitan lugares inundables, como las especies del género *Rumex* (Laan *et al.*, 1989; Seago *et al.*, 2005). Algunas especies pueden tener ambos tipos de aerénquima en diferentes órganos, como es el caso de *Sagittaria lancifolia* (Schussler y Longstreth, 1996). Consecuentemente, el arreglo espacial del aerénquima, es decir, la disposición de las lagunas y espacios que se generan, difiere entre las especies. En este sentido, se reconocen en la literatura cuatro tipologías anatómicas: dos en las graminoides (tipos graminácea y ciperácea) y dos en las dicotiledóneas (tipos *Rumex* y *Apium*). Las estructuras básicas de estas tipologías se asemejan a una rueda de bicicleta (graminácea), tela de araña (ciperácea), panal de abeja (*Rumex*) y estructura con lagunas irregulares (*Apium*) (Justin y Armstrong, 1987; Seago *et al.*, 2005). Estos tipos de aerénquima se encuentran representados en las especies de los pastizales de la Pampa Deprimida (Grimoldi *et al.*, 2005; Striker *et al.*, 2007) (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Cortes transversales de raíces mostrando las tipologías radicales graminoides (a,b) y dicotiledóneas (c,d). (a) *Paspalidium geminatum*: raíz tipo graminácea; (b) *Cyperus eragrostis*: raíz tipo ciperácea; (c) *Rumex crispus*: raíz tipo *Rumex* y (d) *Lotus tenuis*: raíz tipo *Apium*. Los asteriscos indican las lagunas de aerénquima. (Adaptado de Striker *et al.*, 2005; 2007)

Es sabido que la efectividad de la aireación interna de las raíces depende de dos factores principales: la resistencia física a la difusión y la demanda de oxígeno a lo largo de la vía de difusión (raíz). La resistencia física está determinada, a su vez, por la longitud de la raíz, la tortuosidad (Luxmoore *et al.*, 1970) y la porosidad (Colmer,

2003b). La demanda de oxígeno se origina por la respiración de las células de la raíz y por la pérdida de oxígeno hacia el suelo anóxico (Armstrong *et al.*, 1991). Por lo tanto, la oxigenación de las raíces puede estar limitada por una excesiva pérdida radial de oxígeno (ROL) desde la raíz hacia la rizósfera (Figura 2.2) (Visser *et al.*, 2000; McDonald *et al.*, 2002; Colmer y Voesenek, 2009). Sin embargo, en especies tolerantes a la inundación como *Oryza sativa*, la excesiva pérdida de oxígeno en la región basal de las raíces puede estar disminuida por la presencia de barreras (constitutivas o inducidas) en las capas externas de la corteza (exodermis o subepidermis) (Colmer *et al.*, 1998). En especies dicotiledóneas como *Trifolium tomentosum* (Gibberd *et al.*, 1999) y *Rumex* spp. (Laan *et al.*, 1989b), la barrera a la pérdida radial de oxígeno puede ser parcial, liberando más oxígeno hacia la rizósfera; por lo que la capacidad de oxigenación de las raíces bajo condiciones de anoxia puede diferir entre las especies tolerantes a la inundación. Sin embargo, aún no se conocen con precisión las bases anatómicas que determinan dichas respuestas. Por ello, en este capítulo se propuso identificar los rasgos anatómicos de las raíces adventicias, asociados a la pérdida radial de oxígeno, en especies herbáceas de los Pastizales de la Pampa Deprimida representativas de los diferentes tipos de aerénquima (Figura 2.1).



**Figura 2.2.** Esquema donde se muestran patrones contrastantes de pérdida radial de oxígeno (ROL) desde las raíces hacia el suelo. A la izquierda se muestra una especie que no genera una barrera a la pérdida radial de oxígeno, por lo que éste no llega a la zona apical. A la derecha se muestra una especie capaz de generar una barrera física a la pérdida radial de oxígeno en la base de la raíz, lo que permite una óptima oxigenación del ápice bajo condiciones de anaerobiosis. El espesor de las flechas refleja la cantidad de oxígeno disponible (*i.e.* flechas finas= menor difusión de oxígeno). Adaptado de Colmer y Voesenek (2009).

La diferente capacidad de oxigenación entre las especies se vería reflejada en la longitud máxima que pueden alcanzar las raíces, ya que la pérdida radial de oxígeno limita su disponibilidad en el ápice radical y por lo tanto el crecimiento en longitud de las raíces (Armstrong, 1979; Armstrong *et al.*, 1991; Gibberd *et al.*, 2001). La presunta menor pérdida radial de oxígeno que tendrían las especies gramíneas con respecto a las dicotiledóneas, podría estar relacionada con una mayor deposición de suberina (constitutiva o inducible por anoxia) en las capas externas de la corteza radical, o bien,

con un mayor número de capas de células con paredes engrosadas/lignificadas en dicha zona. Como consecuencia, el crecimiento en longitud de las raíces se vería comprometido en aquellas especies que no posean o (alternativamente) que no generen este tipo de barrera que limite la pérdida radial de oxígeno. Esto derivaría en una menor capacidad de explorar el perfil del suelo limitando la absorción de nutrientes y agua, lo que en última instancia afectaría negativamente el crecimiento de toda la planta (Colmer y Voesenek, 2009).

Dado que la cantidad y disposición del aerénquima difiere entre las especies gramíneas y dicotiledóneas del pastizal (Grimoldi *et al.*, 1999; Insausti *et al.*, 2001; Grimoldi *et al.*, 2005; Striker *et al.*, 2007), y que se presume que ello se relaciona con una diferente pérdida radial de oxígeno, surge saber si en su conjunto esto se traducirá en diferencias en el crecimiento longitudinal de las raíces durante la inundación. Hasta el momento no existía un estudio comparativo entre las especies con distintos tipos de aerénquima que permita explicar las bases anatómicas y fisiológicas de la presunta oxigenación diferencial que existe entre las especies que habitan el pastizal de la Pampa Deprimida.

**Objetivo 1:** Analizar el crecimiento de raíces, en términos de longitud, en medio anaeróbico de especies gramíneas y dicotiledóneas herbáceas de pastizal con relación a su capacidad de generar aerénquima, la pérdida radial de oxígeno, y las características de las capas externas de la corteza (*i.e.* deposición de suberina/lignina).

**Hipótesis A.1:** Ante aumentos en la proporción de tejido aerénquimático, las especies gramíneas mantienen su tasa de elongación en sus raíces adventicias bajo condiciones anaeróbicas de crecimiento, mientras que en las especies dicotiledóneas se reduce. Esto se debe a la menor pérdida radial de oxígeno (ROL) que tienen las gramíneas con respecto a las dicotiledóneas.

**Hipótesis A.2:** Las especies capaces de mantener su tasa de elongación radical bajo condiciones anaeróbicas de crecimiento son aquellas que tienen mayor deposición de suberina en la exodermis, y por lo tanto, limitan la pérdida radial de oxígeno hacia la rizósfera.

## A.2 METODOLOGÍA

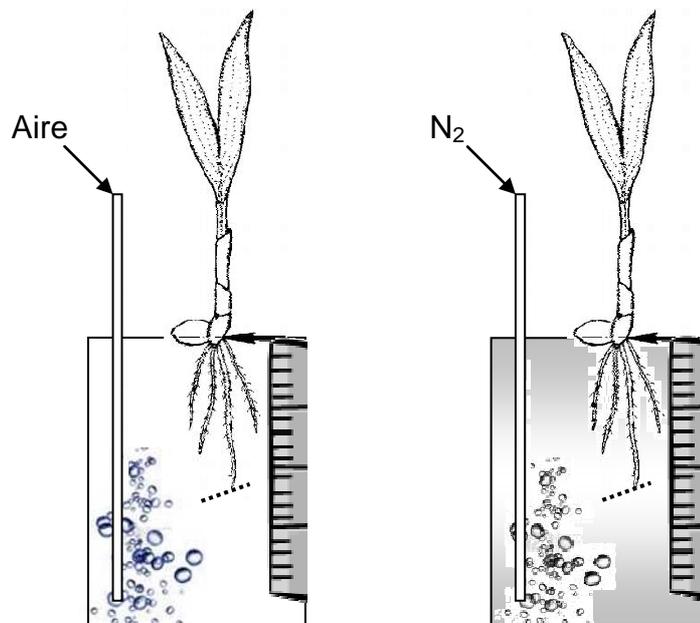
### *Material vegetal y establecimiento del sistema*

Para probar la hipótesis se utilizaron las especies gramíneas *Paspalidium geminatum* (Forssk.) Stapf y *Cyperus eragrostis* Lam.; y las dicotiledóneas *Lotus tenuis* Waldst. & Kit. (*sin.* *Lotus glaber* Mill.) y *Rumex crispus* L. Estas especies se eligieron sobre la base de estudios previos, dado que representan las cuatro configuraciones anatómicas reconocidas por la literatura con relación a la disposición de aerénquima en la corteza radical (Insausti *et al.*, 2001; Grimoldi *et al.*, 2005; Striker *et al.*, 2007). Se extrajeron plantas de esas especies de un pastizal inundable de la Pampa Deprimida dentro de poblaciones vegetales de praderas húmedas de mesófitas (Perelman *et al.*, 2001) y se transplantaron a macetas de 4 L con arena y suelo del horizonte A del pastizal (1:1). El suelo es un Natracuol típico con un horizonte A con 3.3% de materia orgánica, ubicado en un relieve plano con muy baja escorrentía y un drenaje pobre (Taboada y Lavado 1988). La comunidad es de praderas húmedas de mesófitas (Perelman *et al.*, 2001),

fitosociológicamente definidas como *Piptochaetium montevidensis*, *Ambrosia tenuifolia*, *Eclipta bellidioides* y *Mentha pulegium* (Burkart *et al.*, 1990). Las plantas se extrajeron del campo cuando el suelo no estuvo inundado hacia finales del otoño, se dejaron aclimatar por 3 meses, y a partir de estas plantas adultas se hicieron clones de menor tamaño con los que se trabajó. Los tratamientos se hicieron en la época de crecimiento que es primavera y que coincide con el período posible de inundaciones en el pastizal. Las plantas fueron transferidas a un invernáculo de la Facultad de Agronomía-UBA, en condiciones semi-controladas de temperatura. Luego de tres meses de aclimatación, se seleccionaron 10 (diez) individuos homogéneos de cada especie, es decir, del mismo estadio ontogénico, similar tamaño, y se transfirieron a cultivo en hidroponía con burbujeo de O<sub>2</sub> (aireación del sistema por bomba comercial para peceras) y flujo continuo de solución nutritiva ¼ Hoagland III enriquecida con los nutrientes: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.23 μM; MnCl<sub>2</sub>, 0.71 μM; ZnSO<sub>4</sub>, 5 nM; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.6 nM; CuSO<sub>4</sub>, 1.6 nM (Colmer, 2003b). Luego de una semana de crecimiento en este medio, entre 5 (cinco) y 10 (diez) individuos de cada especie se sometieron a 2 tratamientos en un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA) por 10 días: i) mantenimiento de testigos con burbujeo constante de aire (21% O<sub>2</sub>) y ii) anoxia por estancamiento, con un burbujeo inicial con N<sub>2</sub>, de manera de extraer todo el oxígeno disuelto del medio, y con el agregado de agar (0.1% p/v) para limitar la difusión de oxígeno del ambiente a la solución donde crecen las raíces, siguiendo la metodología propuesta por Wiengweera *et al.*, (1997). En ambos casos se probó la efectividad de los tratamientos con un medidor de oxígeno disuelto (Lutron DO-5510). En el tratamiento de oxigenación se obtuvieron concentraciones de oxígeno disuelto de 7.9 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, mientras que bajo anaerobiosis se registraron valores de 0.5 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> caracterizando ambientes aeróbicos y anaeróbicos, respectivamente (Drew, 1997; Kotula *et al.*, 2009). Los tratamientos se hicieron en la época de activo crecimiento de las plantas (primavera-verano) y que coincide con el período de inundaciones en el pastizal.

#### *Tasa de elongación de raíces adventicias*

Se determinó la longitud de raíces adventicias para cada combinación de especie y tratamiento. Para ello, las plantas fueron transferidas desde el cultivo en hidroponía a cámaras de vidrio transparentes y cilíndricas de 700 ml de capacidad, de 6.5 cm de diámetro y 18 cm de largo (Figura 2.3). Las cámaras contenían el mismo medio que las piletas de crecimiento según el tratamiento: i) solución de Hoagland ¼ burbujeada con O<sub>2</sub> y ii) solución de Hoagland ¼ con agar 0.1% previamente burbujeada con N<sub>2</sub>. Las cámaras estuvieron recubiertas de papel de aluminio, para evitar la incidencia de la luz en las raíces y la temperatura fue controlada diariamente. Se seleccionaron entre dos (2) y diez (10) raíces adventicias por planta y se marcaron de manera de no interferir con su crecimiento. Esto consistió en separar con un hilo las raíces que no se fotografiaron, de modo de dejar libres aquellas a ser fotografiadas. Periódicamente se fotografiaron las raíces marcadas hasta que cesó su crecimiento, registrando el día y la hora, con el objetivo de determinar su tasa de elongación (mm h<sup>-1</sup>). Las imágenes se analizaron con el programa Image Tool 3.0 (Wilcox *et al.*, 2002), donde se midió la longitud en píxeles en las raíces identificadas. Posteriormente, estos resultados en píxeles fueron transformados a mm.



**Figura 2.3.** Esquema del sistema de medición de crecimiento radical, donde se muestra la cámara de crecimiento con el burbujeo de aire y de  $N_2$ , simulando condiciones aeróbicas y anaeróbicas, respectivamente. Con línea de puntos se muestran las raíces marcadas.

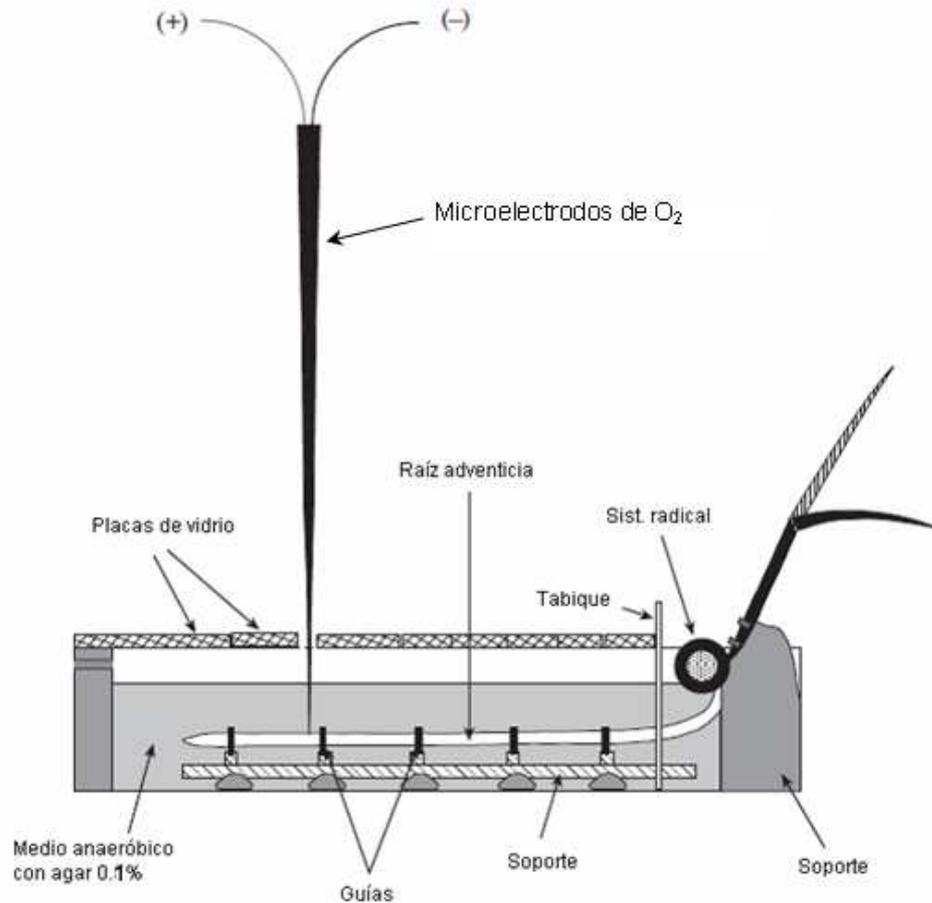
#### *Mediciones de pérdida radial de oxígeno de las raíces (ROL)*

Al finalizar los tratamientos, las plantas fueron transferidas a una caja de material plástico transparente (Figura 2.4), que contenía 0.1% (p:v) de agar con solución Hoagland a  $\frac{1}{4}$ , siguiendo la metodología propuesta por Armstrong *et al.*, (2000). Dicha solución fue previamente desoxigenada mediante burbujeo de  $N_2$  durante aproximadamente 15 minutos. El agar se utilizó para prevenir el intercambio de oxígeno entre la solución y la atmósfera, y de esta manera, garantizar que la planta capture el oxígeno sólo a través de su parte aérea (Wiengweera *et al.*, 1997). Cada una de las raíces adventicias medidas, de aproximadamente 10 días de edad, fue cuidadosamente sostenida horizontalmente en el interior de la caja mediante guías y se posicionó como se muestra en la Figura 2.4. Tanto la parte aérea de la planta como el resto de su sistema radical, permanecieron aislados de la raíz adventicia mediante un tabique, con el fin de mantener el medio donde se encontraba la raíz a medir libre de oxígeno. Una vez establecido el sistema, se midió la pérdida radial de oxígeno (ROL) con microelectrodos de oxígeno (OX100, OX25, Unisense, Denmark), conectados a un pico-amperímetro (PA2000) que registra la señal eléctrica de manera continua. El pico-amperímetro se conectó a una computadora donde la señal eléctrica fue transformada a concentración de oxígeno ( $mg L^{-1}$ ) (Sensor Trace Basic, Ver. 1.2, Unisense). El microelectrodo fue previamente calibrado introduciéndolo en una cámara de calibración (CAL300, Unisense) con agua destilada burbujeadada con aire (21%  $O_2$ ) y posteriormente burbujeadada con  $N_2$  para generar un medio libre de oxígeno. Se midió con un termómetro la temperatura del agua de la cámara. Con estas lecturas se construyó una curva de calibración, que permitió transformar la señal eléctrica (pA) en unidades de concentración de oxígeno ( $mg L^{-1}$ ). Los microelectrodos se posicionaron verticalmente sobre la raíz a 0.5; 1; 2; 3, 4 y 5 cm de distancia desde el ápice, con el objetivo de caracterizar el patrón espacial de ROL a lo largo de cada raíz. Para un preciso posicionamiento del microelectrodo se utilizó un micromanipulador manual (MM33, Unisense, Denmark) y se observó con una lupa el movimiento del mismo. La pérdida

radial de oxígeno (ROL) desde la raíz hacia la rizósfera se calculó según la ecuación propuesta por Henriksen *et al.*, (1992), usando las mediciones de concentración de oxígeno en dos posiciones radiales (ver más abajo):

$$\Phi = 2\pi D \frac{c_2 - c_1}{\ln(r_2/r_1)} \quad (\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1})$$

Donde D es el coeficiente de difusión del oxígeno en el medio (en el agua a 23° C:  $2.27 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ),  $C_1$  es la concentración de oxígeno en la superficie de la raíz ( $\text{mol m}^{-3}$ ) calculada a partir de la presión parcial,  $C_2$  es la concentración de oxígeno a 100  $\mu\text{m}$  de distancia de la superficie de la raíz,  $r_2$  es la distancia radial desde el centro de la raíz (m) y  $r_1$  es su radio (m). El diámetro de la raíz se determinó, en cada una de las posiciones de medición de ROL, mediante el análisis de la imagen digitalizada de la raíz, con el software de uso libre Image Tool 3.0 (Wilcox *et al.*, 2002). Las mediciones de ROL se hicieron en un ambiente con temperatura controlada entre 20-23° C e irradiancia con un flujo de fotones de  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Armstrong *et al.*, 2006). Se midieron de 1 a 3 raíces por planta y se tomaron 5 (cinco) plantas por cada tratamiento y por especie.



**Figura 2.4.** Esquema del sistema de medición de ROL, con la raíz adventicia en forma horizontal, en un medio anaeróbico con agar 0.1%. Adaptado de Armstrong *et al.*, (2000).

#### *Análisis anatómicos (aerénquima y cuantificación de suberina)*

Luego de las mediciones de la pérdida radial de oxígeno de las raíces adventicias, éstas se fijaron en alcohol 70° para su posterior análisis anatómico. Los cortes histológicos se realizaron en cuatro de las seis posiciones en las que previamente se midió la pérdida radial de oxígeno (0.5, 1, 2 y 4 cm desde el ápice). Tanto para el análisis de los cortes en el microscopio con luz blanca como para el análisis con fluorescencia, porciones transversales de raíces de aproximadamente 10 cm se incluyeron en parafina y se cortaron secciones de 15-20  $\mu\text{m}$  de espesor con micrótopo de rotación. A partir de estos cortes se determinó la formación, disposición espacial y porcentaje de aerénquima, tanto constitutivo (condiciones control) como el generado en la condición de anoxia (aerénquima inducido), utilizando un microscopio óptico con escala (10X, Axioplan, Zeiss, Germany). La deposición de suberina en las capas externas de la corteza radical se visualizó mediante excitación por fluorescencia a 395 nm y se realizó una medición semicuantitativa a partir de las imágenes digitalizadas, utilizando el software WinRhizo (Regent Instruments Inc, Canada). Este software permitió cuantificar el área suberificada (distinguida por la intensidad del color y el espesor) en relación al área total de la sección transversal de la raíz. A su vez, se cuantificó el número de capas y grosor de las paredes celulares de la zona externa de la corteza (no aerénquimática) a fin de

identificar, junto con la deposición de suberina, las posibles barreras a la pérdida radial de oxígeno.

### Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para este primer capítulo se analizaron separadamente para cada especie mediante una ANOVA de una vía con “tratamiento de O<sub>2</sub>” como factor principal para un diseño completamente aleatorizado. La significancia de las diferencias entre los tratamientos se evaluó con un test de Tukey ( $P < 0.05$ ). Previamente se verificó la normalidad y homogeneidad de varianzas. Las variables que involucraron proporciones fueron transformadas ( $\arcsen\sqrt{x}$ ) antes de realizar los análisis. Los análisis se hicieron con el software estadístico InfoStat versión 2010 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Los resultados se presentan como valores promedio no transformados  $\pm$  el error estándar.

## A.3 RESULTADOS

### Porcentaje de aerénquima

En condiciones óptimas de oxigenación las especies tuvieron entre 12.5% (en *P. geminatum*) y 47% (en *L. tenuis*) de aerénquima en sus raíces de manera constitutiva (Cuadro 2.1). Bajo condiciones de anaerobiosis, el porcentaje de aerénquima de las raíces adventicias se incrementó significativamente en todas las especies ( $P < 0.001$ ), aunque no en la misma magnitud. Las especies con mayor respuesta a la falta de oxígeno fueron *P. geminatum* y *R. crispus* mostrando un incremento de casi 2.5 y 1.7 veces en el porcentaje de aerénquima, mientras que *L. tenuis* y *C. eragrostis* fueron las que menor incremento tuvieron (1.2 y 1.6 veces, respectivamente). A su vez, a lo largo de la raíz el porcentaje de aerénquima se incrementó con la distancia desde el ápice en las especies gramíneas, mientras que en las dicotiledóneas no hubo diferencias entre los 0.5 cm y los 4 cm desde el ápice ( $P > 0.05$ , Cuadro 2.1).

**Cuadro 2.1.** Porcentaje de aerénquima a lo largo de raíces adventicias de plantas conspicuas del pastizal húmedo, crecidas bajo dos condiciones de oxigenación: A: aeróbico; AN: anaeróbico. 0.5, 1, 2 y 4 indican la distancia (en cm) desde el ápice de la raíz donde se realizaron los cortes.

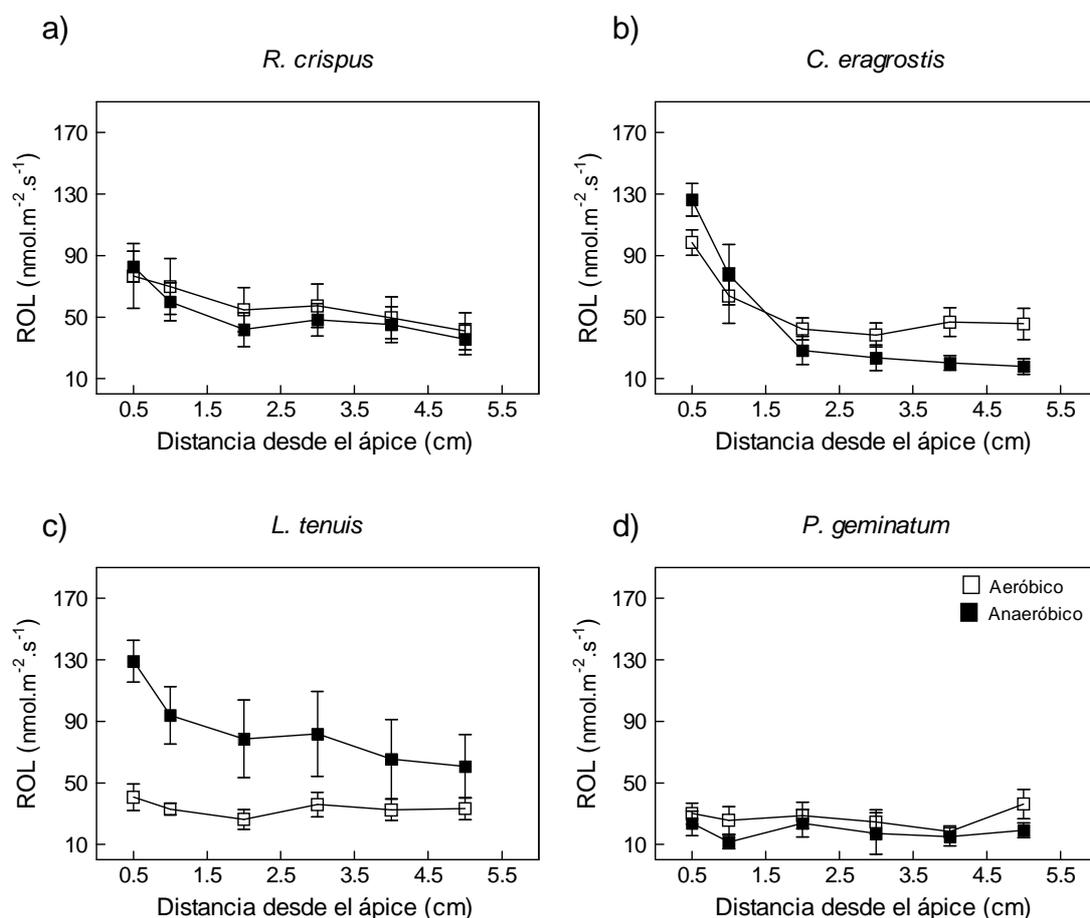
% Aerénquima								
Distancia desde el ápice	<i>R. crispus</i>		<i>C. eragrostis</i>		<i>L. tenuis</i>		<i>P. geminatum</i>	
	A	AN	A	AN	A	AN	A	AN
0.5	39.8±4 b	63.8±2.2 a	24.5±3.1 b	44.6±4.8 a	48.7±2.5 b	59.6±7.1 a	14.8±2.1 a	14.7±3.3 a
1	37.5±6.8 b	62.2±1.2 a	27.5±5.7 b	43.2±1.8 a	44.3±7.1 b	55.7±7.8 a	10.1±1.6 b	29.3±4.2 a
2	34.6±3.5 b	62.9±1.0 a	35.3±5.6 b	46.7±2.0 a	45.2±7.3 b	58.9±3.0 a	8±1.3 b	31.6±3.8 a
4	29.3±4.6 b	53.9±2.5 a	34±4.9 b	51.1±3.8 a	53.4±3.6 b	57.5±5.3 a	17.2±2.7 b	37±1.8 a

Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos, para cada una de las posiciones.

### Pérdida radial de oxígeno

La pérdida radial de oxígeno (ROL) se modificó según la especie y el tratamiento. Bajo condiciones anaeróbicas, las dicotiledóneas tuvieron mayor pérdida radial de oxígeno que las gramíneas (Figuras 2.5a y 2.5c). Dentro de las especies dicotiledóneas, *R.*

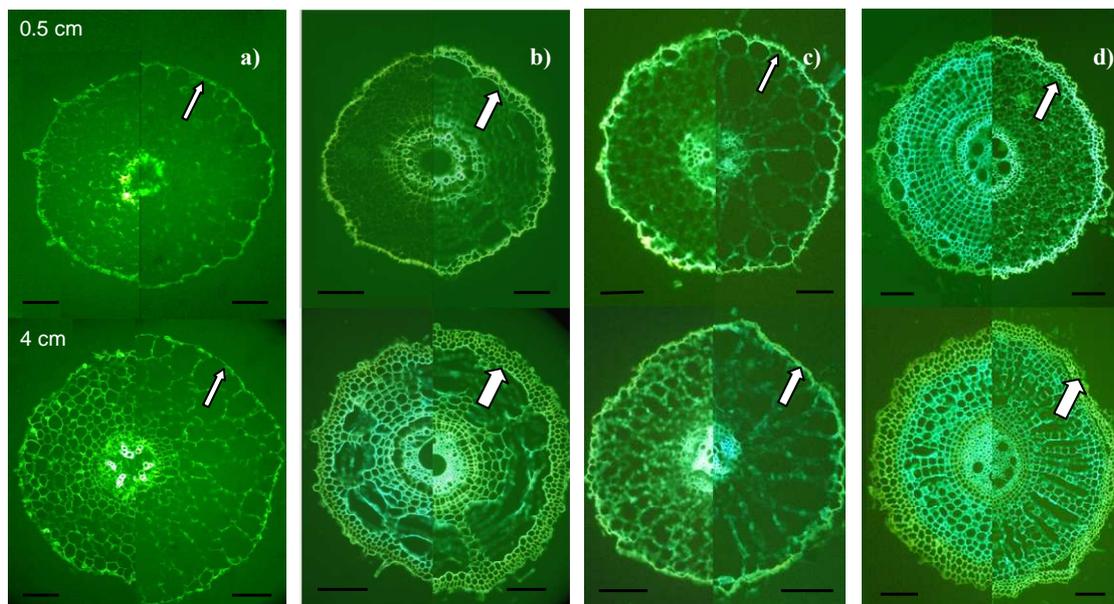
*crispus* tuvo el mismo patrón de ROL bajo las dos condiciones de oxigenación, y con una mayor pérdida de oxígeno cerca del ápice (Figura 2.5a). Por el contrario, *L. tenuis* mostró dos patrones espaciales de ROL a lo largo de la raíz, según el nivel de oxigenación. Bajo condiciones aeróbicas, el ROL permaneció constante desde el ápice hasta la base de la raíz y siempre fue significativamente menor que bajo condiciones anaeróbicas (Figura 2.5c). Bajo el tratamiento de anaerobiosis, la pérdida radial de oxígeno en las raíces de *Lotus* fue mayor e interesantemente se observó una disminución del ROL a medida que aumentó la distancia desde el ápice (Figura 2.5c). Por su parte, las raíces de las especies graminoides tuvieron dos tipos de respuestas. En el caso de *P. geminatum*, la pérdida radial de oxígeno fue muy baja siempre sin diferir entre los tratamientos, ni a lo largo de las distintas posiciones de la raíz (Figura 2.5d). El patrón espacial de ROL de *C. eragrostis* mostró una mayor pérdida en el ápice bajo las dos condiciones de crecimiento, que fue disminuyendo hacia la base de la raíz. Dicha disminución fue significativamente mayor bajo condiciones de anaerobiosis, como pudo observarse a partir de los 3 cm de distancia desde el ápice ( $P < 0.05$ ; Figura 2.5b), lo cual sugiere la inducción de una barrera a la pérdida de oxígeno causada por el tratamiento anóxico.



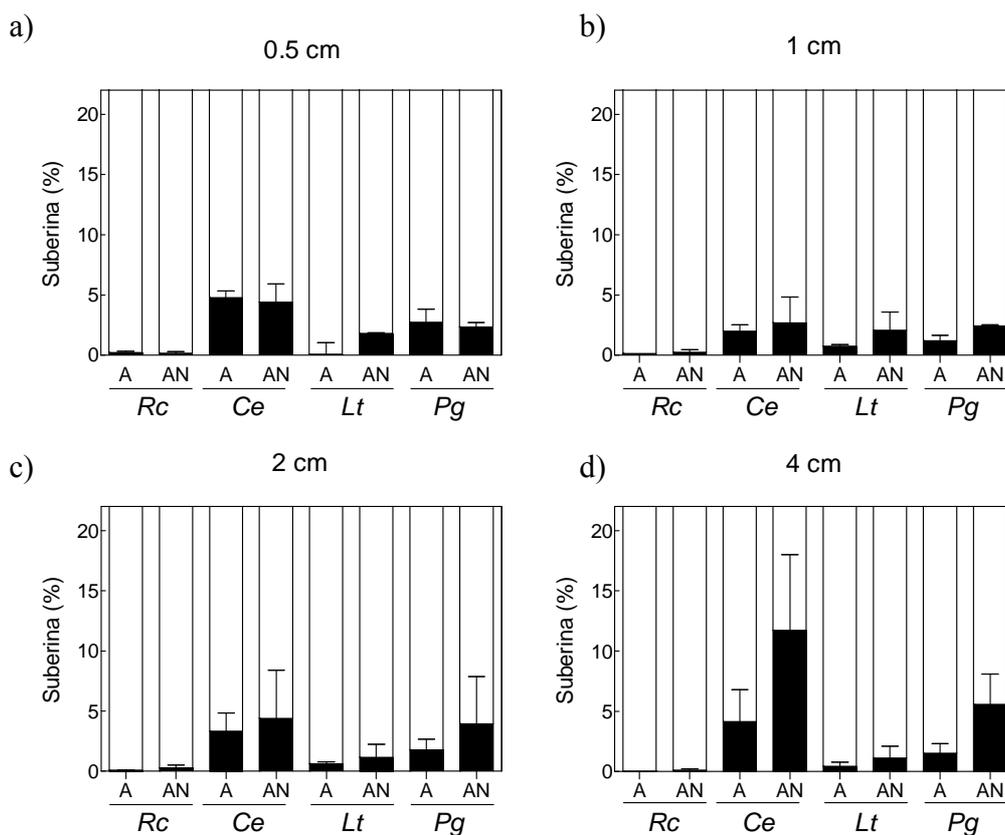
**Figura 2.5.** Patrón espacial de la pérdida radial de oxígeno (ROL) de cuatro especies conspicuas del Pastizal inundable: a) *Rumex crispus*, b) *Cyperus eragrostis*, c) *Lotus tenuis* y d) *Paspalidium geminatum*, crecidas bajo condiciones de hidroponía con burbujeo constante (aeróbico) y sin burbujeo (anaeróbico con agar 0.1%). Las mediciones se realizaron en 6 posiciones desde el ápice hacia la base de la raíz. Cada punto representa un promedio de 5 a 8 plantas (3-7 raíces medidas por planta)  $\pm$  error estándar.

### *Suberización*

A partir del análisis de las imágenes de las secciones transversales de las raíces, se cuantificó la proporción de suberina en la corteza radical (porcentaje de área de tejido con deposición de suberina en relación al área total del corte excluido el cilindro central y la endodermis). Los resultados mostraron que, al igual que el porcentaje de aerénquima, la proporción de suberina difirió entre los tratamientos de oxigenación en tres de las cuatro especies. En términos generales, la proporción de suberina en las paredes de las células de la corteza radical fue mayor en las gramíneas que en las dicotiledóneas, especialmente bajo condiciones anaeróbicas (comparar en cada una de las posiciones de la Figura 2.7). En las raíces de *P. geminatum* (Figura 2.6d), la deposición de suberina se incrementó a partir de los 2 cm de distancia desde el ápice hasta alcanzar valores mayores al 5% hacia la base de la raíz; mientras que en *C. eragrostis* el engrosamiento de las paredes (asociada a una mayor proporción de suberina) ya se observó desde 1 cm de distancia desde el ápice hacia la base de la raíz alcanzando valores cercanos al 10% (Figura 2.6b). En el caso de las dicotiledóneas, bajo ninguna condición/posición los valores de proporción de suberina superaron el 2.5% (Figura 2.6a-d). En particular, las raíces adventicias de *R. crispus* no tuvieron una mayor deposición de suberina a lo largo de los 4 cm analizados y los valores fueron mucho menores que en las gramíneas (<1% vs. >2 al 12% en gramíneas; Figura 2.6a). Por su lado, en las secciones de *L. tenuis* se observó una mayor deposición de suberina bajo estas condiciones ( $P < 0.05$ ) que bajo condiciones aeróbicas, aunque no hubo variación a lo largo de la raíz ( $P > 0.05$ ; Figura 2.6c).



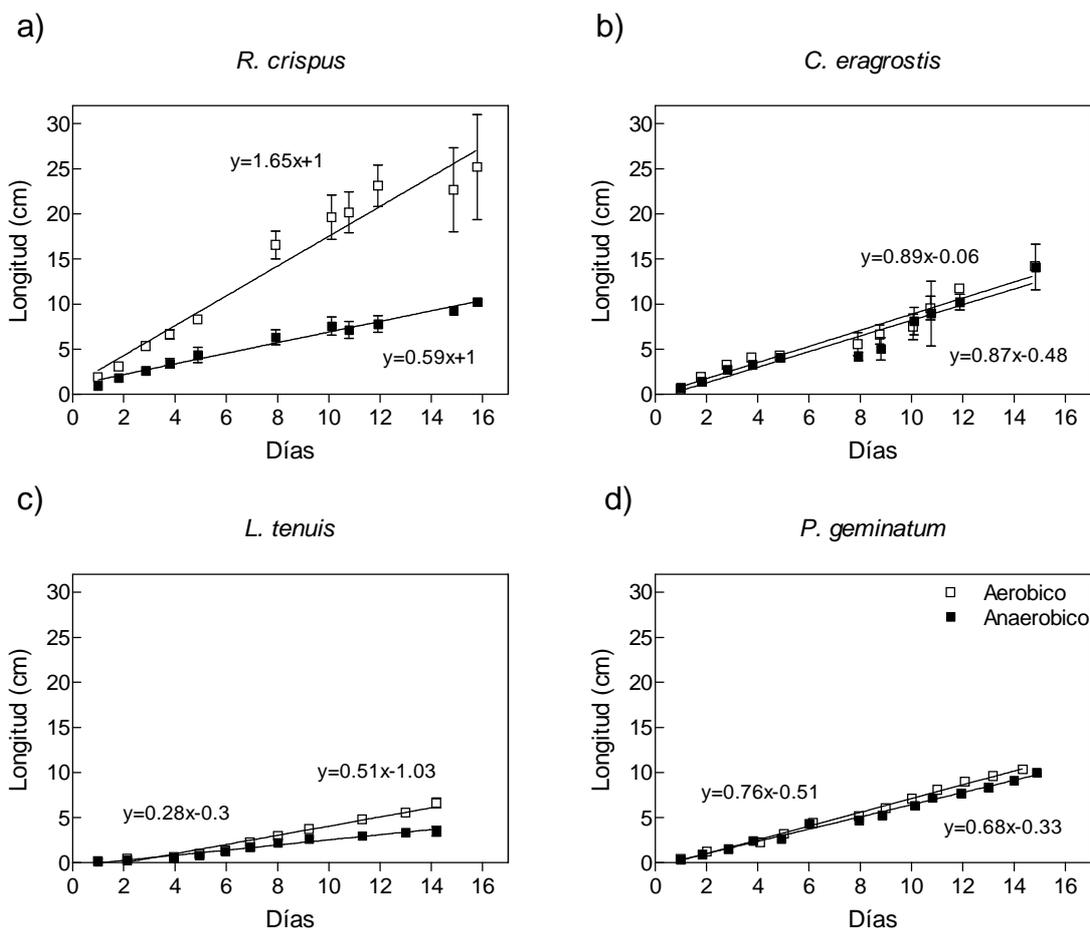
**Figura 2.6.** Secciones transversales de raíces adventicias a 0.5 y 4 cm de distancia desde el ápice. Las plantas crecieron bajo condiciones de aireación (panel izquierdo) y estancamiento (panel derecho) durante 10 días. La barra representa 100  $\mu$ m. Las flechas indican la zona de la exodermis suberificada, y el distinto grosor indica cualitativamente la cantidad de suberina. a) *Rumex crispus*; b) *Cyperus eragrostis*; c) *Lotus tenuis* y d) *Paspalidium geminatum*.



**Figura 2.7.** Proporción de suberina (porcentaje de tejido suberificado en relación al área total de la sección transversal de la raíz adventicia) para cuatro posiciones a lo largo de la raíz: a) 0.5, b) 1, c) 2 y d) 4 cm desde el ápice; creciendo bajo dos condiciones de oxigenación: A: aeróbica y AN: anaeróbica, durante 10 días. *Rc*: *Rumex crispus*; *Ce*: *Cyperus eragrostis*; *Lt*: *Lotus tenuis*; *Pg*: *Paspalidium geminatum*. Las barras son promedio de 3-7 raíces para cada posición por tratamiento  $\pm$  el error estándar.

### Elongación de raíces

Se calculó la tasa de elongación de las raíces adventicias en su fase lineal, crecidas en medio aeróbico y anaeróbico por aproximadamente 15 días. A partir de la ecuación ajustada para cada especie, se observó que las raíces de las dicotiledóneas tuvieron una menor tasa de elongación bajo condiciones anaeróbicas en relación a la condición aeróbica (test de pendientes:  $P < 0.05$ ). Dicha menor tasa de elongación radical se registró tanto para *R. crispus* como para *L. tenuis*, ambas dicotiledóneas que tuvieron una muy baja proporción de suberina en su corteza externa y una alta pérdida radial de oxígeno bajo anaerobiosis. Sin embargo, cabe aclarar que para *L. tenuis* la magnitud de la caída en la tasa de elongación radical fue menor (comparar Figuras 2.8a y 2.8c). Por el contrario, las gramínoideas mantuvieron la tasa de elongación de sus raíces independientemente de haber crecido éstas en medio aeróbico o anaeróbico (test de pendientes:  $P > 0.05$ ) (Figuras 2.8b y 2.8d). En este sentido, ambas gramínoideas habían registrado una alta proporción de suberina en la corteza radical y una baja pérdida radial de oxígeno, presumiblemente asociada a la presencia de dicha barrera (suberina) previniendo la salida de oxígeno de las raíces.



**Figura 2.8.** Longitud de raíces adventicias de especies herbáceas conspicuas del Pastizal inundable de la Pampa Deprimida, creciendo bajo dos condiciones de aireación: con oxígeno y sin oxígeno (agar 0.1% p:v) durante 20 días; a) *Rumex crispus*; b) *Cyperus eragrostis*; c) *Lotus tenuis* y d) *Paspalum geminatum*. En cada panel se muestran las ecuaciones ajustadas para cada set de puntos. Cada punto representa el promedio de 4-10 raíces por tratamiento  $\pm$  el error estándar.

#### A.4. DISCUSIÓN

Si bien trabajos anteriores han demostrado la tolerancia a la inundación que, en términos de acumulación de biomasa, tienen las especies que habitan el pastizal inundable [ver para *P. dilatatum*, *L. tenuis* Grimoldi *et al.*, (2005); Striker *et al.*, (2008; 2011); para *C. eragrostis* y *R. crispus* Voesenek *et al.*, 1990; Voesenek y Colmer, (2006); Chen *et al.*, (2010), para *P. geminatum* Insausti *et al.*, (1999)], en este capítulo se evaluó la tolerancia a la anoxia causada por inundación, en términos de elongación de raíces, características anatómicas y su funcionamiento. Cabe destacar que los resultados encontrados en este capítulo con relación a la capacidad de crecimiento de las raíces son coincidentes con lo reportado en los trabajos mencionados en términos de biomasa acumulada a nivel de planta entera. El porcentaje de aerénquima, la presencia y/o la inducción de una barrera en la corteza radical que limita la pérdida radial de oxígeno y la tasa de elongación de las raíces, fueron los atributos que se modificaron con la reducción de los niveles de oxígeno en el medio de crecimiento.

*Bajo condiciones de anaerobiosis la generación de aerénquima es un proceso relevante en la oxigenación de las raíces, aunque no el único*

La oxigenación de las raíces bajo condiciones de anaerobiosis está relacionada con sus características anatómicas, que afectan su funcionamiento y crecimiento (Colmer, 2003b; Enstone y Peterson, 2005). Una de las principales respuestas anatómicas en las especies tolerantes a la inundación está relacionada con el aumento en la porosidad de sus órganos, mediante la diferenciación de tejido aerenquimático, que le permite a la planta mantener el intercambio de gases con el medio bajo condiciones de baja velocidad de difusión (*i.e.* suelo saturado) (Armstrong *et al.*, 1991). Los resultados de este capítulo mostraron que el porcentaje de aerénquima en las raíces se incrementó bajo condiciones limitantes de oxígeno en la rizósfera, en las cuatro especies estudiadas (Cuadro 2.1). Las raíces de las especies gramínoideas generaron aerénquima bajo condiciones de anaerobiosis al igual que las de las dicotiledóneas, aunque el oxígeno disponible para la porción más apical de las raíces pareció verse limitado por la mayor pérdida radial de oxígeno en las dicotiledóneas si se considera su caída en la tasa de elongación radical (Figuras 2.5a y 2.5c). El mayor incremento de tejido aerenquimático fue para *R. crispus* y para *P. geminatum* (2.5 veces más en anaerobiosis; Cuadro 2.1), siendo esta última especie la que menor pérdida radial de oxígeno tuvo (Figura 2.5), facilitando una mayor disponibilidad de oxígeno para las células del ápice de la raíz. Trabajos anteriores han demostrado que las especies con mayor tolerancia a la inundación (anaerobiosis) tuvieron el mayor porcentaje de aerénquima, como el caso de *Paspalidium paludivagum*, donde el porcentaje de aerénquima superó el 40% (Grimoldi *et al.*, 2005). Las dicotiledóneas también incrementaron el porcentaje de aerénquima, aunque el transporte de oxígeno hacia la región más apical de la raíz no sólo va a depender de aumentar el porcentaje de aerénquima, como se discutirá más adelante. Resultados previos en otras dicotiledóneas tolerantes a los suelos inundados mostraron también que la porosidad se incrementó, pero que el arreglo espacial del aerénquima difería entre especies (Grimoldi *et al.*, 2005).

Se sabe que el aumento del tejido aerenquimático disminuye la carga respiratoria de las células de la corteza radical (Hsiao y Huang, 1989), incrementando la disponibilidad de oxígeno para los tejidos más apicales y lejanos a la fuente (Armstrong y Armstrong, 2005). Sin embargo, si no existiera una barrera física que limite la pérdida

de oxígeno hacia la rizósfera, éste será liberado, con la consecuente caída en la disponibilidad para los tejidos apicales (Colmer, 2003a). Especies de ambientes inundables como *Caltha palustris*, *Carex acuta* y *Juncus effusus* han mostrado bajos niveles de pérdida radial de oxígeno en condiciones de escasa oxigenación, aún habiendo duplicado su porosidad (Visser *et al.*, 2000). Dichos resultados sugirieron la existencia de una barrera física que estaría limitando la pérdida radial de oxígeno, aunque no se llegó a corroborarlo (Visser *et al.*, 2000). Los resultados de este capítulo aportan información novedosa en este sentido, permitiendo relacionar las diferentes características anatómicas de las diferentes tipologías radicales, en particular la proporción de suberina en la corteza externa como candidata a ser la barrera física que limita la salida de oxígeno al exterior de la raíz (ver más adelante). En síntesis, puede afirmarse que, bajo condiciones de anaerobiosis, las especies tolerantes a la inundación deben ser capaces, en primer lugar, de generar o incrementar su tejido aerenquimático, mejorando la aireación de los órganos sumergidos. En segundo lugar, una vez generado este aerénquima, las especies capaces de conducir el oxígeno de una manera eficiente hacia los ápices radicales serán aquellas que limiten la pérdida de este gas hacia la rizósfera (Colmer y Voeselek, 2009).

*En condiciones anaeróbicas de crecimiento las especies graminoides tienen menor pérdida radial de oxígeno (ROL) que las dicotiledóneas*

Un potencial destino para el oxígeno transportado a través del tejido aerenquimático es la rizósfera, donde el consumo por parte de los microorganismos del suelo y la oxidación de compuestos reducidos son los principales procesos que allí ocurren (Visser *et al.*, 2000; Armstrong y Armstrong, 2005). Sin embargo, este proceso de pérdida radial de oxígeno (ROL) tiene un patrón espacial variable a lo largo de las raíces y a su vez, puede ser diferente entre las especies que habitan lugares anegables (Jackson y Drew, 1984; Jackson y Armstrong, 1999). Los resultados descritos en este capítulo mostraron que, bajo condiciones anaeróbicas de crecimiento, el oxígeno captado por la parte aérea de las plantas y transportado hacia los tejidos sumergidos, se fue liberando gradualmente hacia la rizósfera desde el ápice (mayor pérdida) hacia la base de la raíz (menor pérdida) (Figuras 2.5a, 2.5b y 2.5c). La única especie que no tuvo este tipo de respuesta fue *P. geminatum*, que siempre mantuvo bajos niveles de ROL (Figura 2.5d). Esto podría estar asociado a la mayor deposición de suberina en la exodermis bajo condiciones de baja disponibilidad de oxígeno (Figura 2.6d) y también, al bajo porcentaje relativo de aerénquima constitutivo que tuvieron sus raíces en condiciones óptimas de oxigenación (Cuadro 2.1). Por el contrario, las raíces de *L. tenuis* y *R. crispus* tuvieron alto porcentaje de aerénquima y poca deposición de suberina en condiciones anaeróbicas, derivando en una mayor pérdida radial de oxígeno que las graminoides (comparar Figuras 2.5a y 2.5c vs. 2.5b y 2.5d). Este patrón espacial de la pérdida radial de oxígeno ha sido descrito en raíces de algunos cultivares de arroz (Schreiber *et al.*, 2005) y en respuesta a otros tipos de estrés abiótico (*i.e.* estrés salino, Krishnamurthy *et al.*, 2009). El patrón espacial de ROL encontrado para *C. eragrostis* (Figura 2.5b) en función de la concentración de oxígeno en el medio de crecimiento también ha sido descrito en especies de ambientes inundables como *Phragmites australis* y *Glyceria máxima* (Soukup *et al.*, 2007). Las diferencias encontradas entre las especies de los distintos grupos funcionales podrían estar explicadas por: a) La deposición de suberina en las paredes de las células exodérmicas que dejan perder más o menos oxígeno hacia la rizósfera; b) La carga respiratoria de las células parénquimáticas, de acuerdo al

porcentaje de aerénquima generado (Colmer y Greenway, 2011); c) El tipo de arreglo espacial del aerénquima, algo que aún no se ha estudiado en relación a la pérdida radial de oxígeno y que merece futuras investigaciones.

*La suberina en la exodermis de las raíces sería la barrera física a la pérdida radial de oxígeno hacia la rizósfera*

Estudios recientes han mostrado correlaciones negativas entre la pérdida radial de oxígeno (ROL) y el desarrollo de una barrera física en la corteza radical de plantas que crecen en ambientes inundables, aunque esta respuesta puede ser variable entre las especies (De Simone *et al.*, 2003). Con respecto a las cuatro especies examinadas en esta tesis, era esperable que difirieran en el patrón de suberización de la corteza radical, ya que tuvieron diferentes patrones espaciales de ROL. A partir del análisis histológico de las imágenes digitalizadas de las raíces, se realizó una aproximación semi-cuantitativa de la deposición de suberina en la exodermis, que permitió caracterizar la respuesta anatómica de las raíces al medio de crecimiento (Figura 2.6). Los resultados mostraron que las gramíneas tuvieron un alto contenido constitutivo de suberina, es decir bajo condiciones aeróbicas de crecimiento, como lo indicó la intensidad de fluorescencia de la exodermis (Figuras 2.6b y 2.6d), mientras que en las dicotiledóneas fue, en ocasiones, casi indetectable (*R. crispus*) o significativamente inferior (*L. tenuis*; Figura 2.6a y 2.6c, respectivamente). La presencia de una barrera constitutiva en la exodermis ya se sugirió a partir de los patrones de ROL descritos por Visser *et al.*, (2000) en *Carex acuta* y *Juncus efusus*. También en otras especies de ambientes anegables como *Echinochloa crus-galli*, *Schoenoplectus validus* (McDonald *et al.*, 2001, 2002). La deposición de suberina también puede inducirse en respuesta a la escasez de oxígeno en especies tolerantes a la inundación como *Oryza sativa* (Colmer, 2003a y b; Kotula y Steudle, 2009), *Zea mays* (Enstone y Peterson, 2005) y en diversas especies de ambientes inundables como *Lolium multiflorum* (McDonald *et al.*, 2002) y *Hordeum marinum* (Garthwaite *et al.*, 2003). La capacidad de inducir una deposición extra de suberina que contribuya a la barrera contra la pérdida radial de oxígeno se observó solamente en la región más basal de las raíces de *C. eragrostis* crecidas bajo condiciones de anaerobiosis (Figura 2.6b). Cabe destacar que en algunos de estos trabajos se ha determinado analíticamente la cantidad de suberina en las raíces, con el objetivo de caracterizar anatómicamente a las raíces (tesis doctoral Lucasz Kotula (Alemania), Kotula y Steudle, 2009). Si bien los resultados de esta tesis son semi-cuantitativos en relación a esta variable, se relacionan con la posición espacial en la raíz y con la pérdida radial de oxígeno en cada una de las especies estudiadas. La relación encontrada para la cantidad de suberina en la corteza en regiones sub-apicales de las raíces pueden estar respondiendo también a otros factores asociados a los suelos inundados anóxicos (De Simone *et al.*, 2003), como por ejemplo a la generación de compuestos tóxicos derivados de este ambiente reductor (Ponnamperuma, 1984). La existencia y/o la inducción de una barrera física en las raíces que limite la pérdida radial de oxígeno sería entonces una respuesta fisiológica adaptativa muy importante, que le permitiría a las plantas mantener el ápice radical oxigenado en suelos inundados anaeróbicos (Colmer *et al.*, 1998). Las especies gramíneas estudiadas en este capítulo experimental podrían estar adoptando este tipo de estrategia, mientras que las dicotiledóneas desarrollarían una estrategia diferente que involucra una mayor pérdida radial de oxígeno (ROL), manteniendo oxigenada la rizósfera. En tales casos, la ventaja de mantener la rizósfera oxigenada se relacionaría con evitar la entrada a la raíz de formas iónicas reducidas de

hierro, manganeso y azufre principalmente (Armstrong, 1979; Soukup *et al.*, 2002; Pedersen *et al.*, 2004; Armstrong y Armstrong, 2005), que pueden provocar toxicidad iónica específica para las plantas. De manera opuesta, el desarrollo de una barrera física impediría la entrada de estas formas tóxicas de los iones (graminoides). Las implicancias de adoptar una u otra estrategia no se han investigado aún y es un interrogante plausible de ser estudiado en especies de ambos grupos funcionales de los pastizales pampeanos.

*La tasa de elongación de las raíces adventicias podría ser un atributo indicador de la capacidad de oxigenar el ápice radical bajo condiciones limitantes de oxígeno*

La tasa de elongación de las raíces adventicias es un atributo morfológico que se relaciona con su capacidad de oxigenación. En condiciones limitantes de oxígeno, el crecimiento de las raíces adventicias podría verse comprometido (Colmer y Greenway, 2011). No obstante, el diferente grado de tolerancia a las condiciones anaeróbicas que tienen las especies, les permite mantener la tasa de elongación de sus raíces adventicias y, de este modo, no comprometer el funcionamiento y supervivencia de la planta durante una inundación. En este sentido, las raíces de las especies graminoides mantuvieron la misma tasa de elongación en ambas condiciones de crecimiento (comparar pendientes en la Figuras 2.8b y 2.8d), por lo que su capacidad de elongación no se vio limitada por la baja concentración de oxígeno en el medio de crecimiento. Resultados similares se han encontrado en genotipos de arroz, donde se vio que la tasa de elongación no cambió bajo condiciones limitantes de oxígeno, aunque las observaciones no fueron periódicas y no se obtuvo la tasa de elongación como la pendiente de la recta ajustada entre la elongación y el tiempo (Suralta y Yamauchi, 2008). La capacidad de mantener la tasa de elongación bajo condiciones de baja oxigenación puede influir en la exploración de nutrientes en suelos anaeróbicos/reducidos y proveer una ventaja competitiva para la reactivación del crecimiento de las raíces una vez pasada la inundación y restablecidos los niveles óptimos de oxígeno (Colmer, 2003a). Sin embargo, los resultados encontrados para *L. tenuis* y *R. crispus* difirieron de lo encontrado en las graminoides respecto a la tasa de elongación de las raíces y el incremento del tejido aerénquimático, ya que la tasa de elongación disminuyó en las dicotiledóneas cuando la disponibilidad de oxígeno fue baja (Cuadro 2.1 y Figuras 2.8a y 2.8c). Los resultados antes descritos sugieren que existiría una relación de compromiso entre mantener la tasa de elongación de las raíces (alta capacidad de oxigenación del ápice) y liberar el oxígeno a lo largo de la raíz, manteniendo la rizósfera oxigenada.

*Arreglo espacial del aerénquima, deposición de suberina y pérdida radial de oxígeno: son necesarias futuras aproximaciones para dilucidar cómo se relacionan funcionalmente dichos atributos*

Las especies de la Pampa Deprimida que fueron elegidas para estudiar los patrones de oxigenación y cómo esto se relaciona con la tasa de elongación de las raíces, permitieron responder preguntas relacionadas con: a) Cómo cambia la anatomía de las raíces adventicias en respuesta a la baja concentración de oxígeno, simulando lo que sucede en el suelo como consecuencia de una inundación; b) Si los patrones de pérdida radial de oxígeno (ROL) cambian entre especies y entre tratamientos (aireado *vs.* anaeróbico) y c) Cómo repercute esto en la elongación de las raíces. Además de permitir

contestar algunas preguntas, y de someter a prueba las hipótesis planteadas en la introducción, los resultados de este capítulo dieron lugar a nuevos interrogantes. Por un lado, a nivel de órgano y desde el punto de vista anatómico, sería interesante dilucidar: *¿Cuál es el significado funcional de tener uno u otro arreglo espacial de aerénquima?* y *¿En qué medida los diferentes arreglos espaciales (a igual porcentaje de aerénquima) afectan a la pérdida radial de oxígeno (ROL)?* La hipótesis que se desprende y que sería interesante someter a prueba en un futuro establece que: la tipología del aerénquima afectaría la pérdida radial de oxígeno (ROL), dado que la superficie de intercambio con el medio varía según si los espacios de aire están dispuestos de manera radial (*Paspalidium*), paralelos a la epidermis (*Cyperus*), si son numerosos y de menor perímetro (*Rumex*) o si son de forma irregular en grandes lagunas de aire (*Lotus*). Por otro lado, a nivel de planta (y tal vez de población), y teniendo en cuenta el funcionamiento de las especies dentro del Pastizal, sería interesante estudiar el efecto de tener una u otra estrategia (perder más o menos ROL hacia la rizósfera) y cómo condiciona al funcionamiento del pastizal cuando las especies graminoides y dicotiledóneas coexisten bajo condiciones de suelo saturado (anóxico).

Capítulo 3

**ESTRATEGIAS DE CRECIMIENTO DE *Lotus tenuis* y *Paspalum dilatatum*  
FRENTE A INTENSIDADES CRECIENTES DE INUNDACIÓN**

Resultados parciales de este capítulo fueron publicados en: **Manzur ME**, Grimoldi AA, Insausti P, Striker GG. **2009**. Escape from water or remain quiescent? *Lotus tenuis* changes its strategy depending on depth of submergence. *Annals of Botany* **104**: 1163–1169.

## B.1 INTRODUCCIÓN

La inundación reduce drásticamente la disponibilidad de oxígeno en el suelo, afectando negativamente el crecimiento y la supervivencia de las plantas (Armstrong, 1979; Colmer, 2003b; Voesenek *et al.*, 2006). Cuando la profundidad del agua aumenta, se intensifica el estrés, ya que se restringe la captura de oxígeno y dióxido de carbono debido a la baja velocidad de difusión de estos gases en el agua. Por lo tanto, la severidad del estrés va a depender de la profundidad del agua. Como consecuencia, las plantas pueden desarrollar dos estrategias de supervivencia contrastantes si la sumersión es parcial o completa (Bailey-Serres y Voesenek, 2008). En arroz (Metraux y Kende, 1983), maíz (Jackson, 1989) y *Paspalum dilatatum* (Insausti *et al.*, 2001), la sumersión de la base del tallo promueve su elongación (escape), mientras que la sumersión completa puede inducir esta misma respuesta en plántulas de arroz (Setter y Laureles, 1996), en *Rumex palustris* (Voesenek *et al.*, 2006) y en otras especies. En respuesta a la sumersión parcial, las plantas tolerantes incrementan su partición de carbono y nutrientes hacia la parte aérea, permitiendo la rápida elongación, con el fin de emerger del agua y ubicar más área foliar en contacto con la atmósfera (Striker *et al.*, 2008). Por el contrario, algunas plantas son capaces de tolerar largos periodos de sumersión completa, utilizando sus carbohidratos de reserva para mantener un metabolismo basal hasta que el nivel del agua disminuya (Blom *et al.*, 1994; Parolín, 2009). Esta segunda estrategia se conoce como quiescencia (Bailey-Serres y Voesenek, 2008). Hasta el momento, la capacidad para adoptar esta estrategia se ha descrito en diferentes cultivares de arroz (Setter y Laureles, 1996), en *Ranunculus repens* (Lynn y Waldren, 2003) y en *Rumex crispus* (Laan y Blom, 1990; Voesenek *et al.*, 1990). Sin embargo, la posibilidad de que plantas individuales de una especie o ecotipo puedan adoptar una u otra estrategia según la profundidad del agua, no se había investigado aún. Este estudio se abordó utilizando plantas de *Lotus tenuis* y *Paspalum dilatatum* dos especies forrajeras importantes de los pastizales de la Pampa Deprimida, que pueden verse sujetas en el campo a distintas situaciones de estrés (sumersión parcial y sumersión completa) dependiendo de la magnitud de la inundación.

Además de los efectos de elongación (“escape”) y quiescencia, la sumersión parcial o completa puede provocar cambios en la porosidad de las raíces (Armstrong, 1979; Colmer, 2003b) y en el metabolismo de los carbohidratos de reserva, con el fin de mantener la respiración radical y facilitar la elongación del tallo en ausencia de una óptima tasa fotosintética (Colmer y Greenway, 2005). Los estudios previos realizados en leguminosas están principalmente enfocados en *Medicago sativa* (alfalfa), una especie no tolerante a la inundación. Las plantas en estas condiciones sufren daños severos y se acumulan los carbohidratos en las coronas (de 2-6% a 11-16% del peso seco), debido al cese de crecimiento y a la mínima demanda de azúcares bajo condiciones de anoxia, mostrando a su vez, un pequeño cambio en los niveles de almidón (Barta, 1988; Castonguay *et al.*, 1993). En gramíneas, se ha estudiado el uso de reservas en plántulas de la especie tolerante *Oryza sativa* (arroz) y en las intolerantes *Triticum aestivum* (trigo) y *Zea mays* (maíz), cuando se someten a tratamientos de anoxia (Mustroph y Albrecht, 2003). Las respuestas de las especies intolerantes están relacionadas con una marcada reducción de su capacidad fotosintética y un elevado consumo de sus carbohidratos de reserva. Por su parte, el arroz es capaz de mantener su metabolismo basal, con un consumo moderado de sus reservas y una leve reducción de su capacidad fotosintética (Mustroph y Albrecht, 2003). Sin embargo, las respuestas de plantas adultas de especies forrajeras tolerantes a la inundación como *L. tenuis* o *P. dilatatum*,

capaces de mantener la fijación de carbono y el crecimiento durante largos períodos de inundación, aún no habían sido exploradas.

Si las plantas quedan sumergidas completamente, el estrés es significativamente mayor y puede iniciarse una abrupta caída en el balance de carbono y en el estado energético de la planta, provocando su muerte (Vartapetian y Jackson, 1997; Bailey-Serres y Voesenek, 2008). Sin embargo, algunas plantas son capaces de sostener su metabolismo basal consumiendo sus carbohidratos de reserva (Laan y Blom, 1990; Schlüter y Crawford, 2001; Dixon *et al.*, 2006). Algunas especies de ambientes inundables sostienen su metabolismo mediante la fotosíntesis bajo el agua (Mommer y Visser, 2005; Mommer *et al.*, 2006). Las reservas de almidón pueden ser removilizadas durante la sumersión y proveer azúcares para la respiración en tejidos anaeróbicos (Perata *et al.*, 1992; Jackson y Ram, 2003; Colmer y Greenway, 2005). Sin embargo, esta capacidad (que refleja la habilidad de la planta para sobrevivir con escasa o nula disponibilidad de oxígeno) difiere ampliamente entre las especies (Crawford, 1992; Blom *et al.*, 1994). Por ejemplo, el consumo de almidón de reserva de *Scirpus maritimus* le permite a la planta sobrevivir a una sumersión completa por alrededor de 3 meses, mientras que los rizomas de *Juncus effusus* sobreviven sólo 4 días bajo condiciones de anaerobiosis (ver Crawford, 1992). Con estos antecedentes, en este capítulo experimental se abordó el uso potencial de los carbohidratos de reserva almacenados en las coronas de *L. tenuis* y en las láminas y vainas de *P. dilatatum* cuando las plantas están sujetas a distintos niveles de sumersión (parcial y total por 30 días). Esto se combinó con el análisis de la elongación y número de los tallos/macollos, la porosidad de los tejidos, características morfológicas y acumulación de biomasa de los distintos compartimentos por planta.

**Objetivo 2:** Estudiar las estrategias de crecimiento (elongación vs. quiescencia) que pueden presentar plantas de una misma especie frente a intensidades crecientes de inundación. Se pretende identificar los rasgos morfológicos, de crecimiento y en el uso de reservas que confieren tolerancia a la dicotiledónea leguminosa *Lotus tenuis* y a la gramínea *Paspalum dilatatum* cuando están sujetas a estrés creciente por sumersión, desde suelo saturado hasta la sumersión completa de las plantas.

**Hipótesis B.1:** Plantas de una misma especie son capaces de cambiar su estrategia de crecimiento dependiendo de la intensidad de inundación (*i.e.* grado de sumersión de la planta). Frente a estrés por sumersión parcial las plantas crecen elongando activamente sus tallos (vainas y láminas en gramíneas) con un mínimo uso de carbohidratos de reservas, mientras que bajo sumersión completa permanecen quiescentes, sin acumular biomasa ni generar nuevos tallos, sobreviviendo a expensas del consumo intenso de los carbohidratos de reserva.

## B.2 METODOLOGÍA

### *Material vegetal y establecimiento del sistema*

Se extrajeron de un pastizal de la Pampa Deprimida (establecimiento “Las Chilcas”, partido de Pila) plantas adultas de *Lotus tenuis* Waldst. & Kit. y de *Paspalum dilatatum* Poir. de características homogéneas (*i.e.* estructura de planta similar y número de tallos/macollos equivalente). Las plantas se transplantaron a macetas de material plástico de 4 L con un sustrato compuesto por arena y suelo (1:1 v/v) del horizonte A

del pastizal. El suelo es un Natracuol típico con un horizonte A con 3.3% de materia orgánica, ubicado en un relieve plano con muy baja escorrentía y un drenaje pobre (Taboada y Lavado 1988). La comunidad es de praderas húmedas de mesófitas (Perelman *et al.*, 2001), fitosociológicamente definidas como *Piptochaetium montevidensis*, *Ambrosia tenuifolia*, *Eclipta bellidioides* y *Mentha pulegium* (Burkart *et al.*, 1990). Las plantas se extrajeron del campo cuando el suelo no estuvo inundado hacia finales del otoño, se dejaron aclimatar por 3 meses, y a partir de estas plantas adultas se hicieron clones de menor tamaño con los que se trabajó. Los tratamientos se hicieron en la época de crecimiento que es primavera y que coincide con el período posible de inundaciones en el pastizal. Las plantas se transfirieron a un invernáculo de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y radiación (22.3°C; 82.2%; 1400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fueron los valores promedio durante el período en el que se realizó el experimento, respectivamente). Se dejaron aclimatar allí durante tres meses. Durante este período, las plantas fueron clonadas y sometidas a los tratamientos correspondientes. Los tratamientos se iniciaron en la época de activo crecimiento que es primavera-verano y que coincide con el período de inundaciones en el pastizal.

#### *Tratamientos de intensidades de inundación*

Luego del período de aclimatación, las plantas de *L. tenuis* y de *P. dilatatum* se sometieron a intensidades crecientes de inundación por 30 días: (i) Control (capacidad de campo), (ii) Suelo saturado (2-5 mm de agua sobre la superficie del suelo), (iii) Sumersión parcial (se mantuvo el nivel del agua a 6 cm por encima de la superficie del suelo), (iv) Sumersión completa (sumergidas en agua a 8-10 cm de profundidad). La disponibilidad de oxígeno en el suelo se determinó midiendo la tasa de difusión de oxígeno en el suelo (ODR) a una profundidad de 5 cm con microelectrodos de platino con referencia a calomelanos (Letey y Stolzy, 1964; Fiedler *et al.*, 2007). El agua de los tratamientos fue reemplazada semanalmente y se midió la temperatura en la zona de la raíz para asegurarse de que no difirieran significativamente entre los tratamientos. La disponibilidad de irradiancia debajo del agua, como factor limitante para el crecimiento de las plantas bajo sumersión completa, se caracterizó midiendo el perfil de extinción de la radiación fotosintéticamente activa con un sensor PAR subacuático (LI-192 Underwater Quantum Sensor; Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). Las mediciones se realizaron desde la superficie del agua y avanzando en profundidad a intervalos de 6-8 cm hasta llegar al nivel del suelo. Al día 0 y 30 de aplicados los tratamientos, se cuantificó la porosidad de sus raíces, el número y longitud de tallos y macollos, el ángulo de los macollos, la biomasa total y por órganos, la concentración y uso de los carbohidratos de reserva (solubles y almidón) de las coronas para *L. tenuis*, y de láminas y vainas para *P. dilatatum*.

#### *Porosidad*

La porosidad de las raíces se midió al final del período de inundación, por picnometría (Jensen *et al.*, 1969). La técnica consiste en registrar el incremento de peso que ocurre cuando los espacios aéreos de los tejidos (aire intercelular y aerénquima) son reemplazados por agua luego de la maceración. El análisis de porosidad permitió

comparar la capacidad de aireación interna desde los tallos hacia las raíces entre las plantas sujetas a los distintos tratamientos.

#### *Número, longitud de tallos/hojas y ángulo de inserción de los macollos*

Se contaron y midieron la longitud de tallos por planta al comienzo y al final del experimento. La longitud de los tallos se expresó como el promedio de los cinco (5) tallos más largos por planta. En el caso de *P. dilatatum* se midió además la longitud de la última hoja expandida en cada uno de los 5 macollos elegidos por planta y el ángulo de inserción de cada uno de ellos. Dichas variables brindaron información acerca de la estrategia desarrollada por las plantas en respuesta a los distintos grados de sumersión (*i.e.* elongación o no de sus órganos aéreos, cambio en el ángulo de inserción de los macollos).

#### *Biomasa y contenido de clorofila*

Se cuantificó la biomasa y el contenido de clorofila (estimada a través del verdor foliar con SPAD) al comienzo y al final del experimento, usando ocho (8) individuos elegidos aleatoriamente. Para determinar la biomasa, las plantas de *L. tenuis* fueron separadas en hojas, tallos, corona y raíces. Las plantas de *P. dilatatum* se separaron en láminas, vainas y raíces. La biomasa separada se secó en estufa a 80° C por 72 horas y se pesó. Además, se calculó la relación de biomasa entre hojas y tallos, láminas y vainas, coronas y biomasa total, vainas y biomasa total. Las relaciones hoja-tallo (*Lotus*) y lámina-vaina (*Paspalum*) fueron de importancia en el tratamiento de sumersión completa para inferir sobre el potencial fotosintético de los individuos sumergidos. Las relaciones coronas-biomasa total (*Lotus*) y vainas-biomasa total (*Paspalum*) permitieron inferir sobre el uso de reservas. La medición de clorofila se hizo sobre hojas totalmente expandidas usando un medidor de clorofila portátil (SPAD-502, Minolta, Ramsey, NJ, USA) y sirvió como complemento para determinar el potencial de fijación de carbono junto con la relación de biomasa hoja-tallo.

#### *Análisis de carbohidratos*

Con el objetivo de analizar el uso diferencial de reservas ante niveles crecientes de inundación, se determinó el contenido total y la concentración de carbohidratos solubles y almidón a partir de muestras de coronas de *L. tenuis* (2 cm de la zona de transición entre el tallo y la raíz, que funciona como tejido de reserva para el rebrote de la planta). En *P. dilatatum* se tomaron como órganos de reserva las láminas y las vainas a partir de un análisis exploratorio previo, donde se analizó la concentración de carbohidratos solubles y almidón de todos los compartimentos (láminas, vainas y raíces) y se vio que las láminas y las vainas foliares son los principales órganos de reserva (ver anexo, Cuadro 6.2). Dichas muestras se almacenaron en frío (4° C), se secaron en estufa a 80° C por 72 horas y se registró el peso seco antes de realizar los análisis. Una cantidad mínima de muestra (100 mg) se molió y se hizo una extracción con etanol 80 % (v/v) por 1 hora, se agitó y posteriormente se centrifugó por 5 minutos. El sobrenadante se filtró dos veces, con 25 ml de agua destilada y se calentó a 60° C por una hora. Se llevó a volumen final de 100 ml con etanol 80% y alícuotas de reactivo de antrona (200 mg de

antrona en 75% (v/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se dejó reposar por 30 minutos, luego se agitó y calentó por 10 minutos en un baño térmico a 80° C (Yemm y Willis, 1954). La absorbancia se registró a 620 nm, y la concentración de los carbohidratos solubles se calculó mediante una curva de calibración de glucosa. Para determinar la concentración de almidón, el residuo remanente se secó en estufa a 37° C por 24 horas, se suspendió en 10 ml de agua destilada y se calentó en baño térmico por 4 horas. El homogenato resultante se incubó a 38° C toda la noche, con 0.7 ml de una solución que contiene 18 unidades.ml<sup>-1</sup> de amiloglucosidasa en un buffer de acetato con un pH 4.5. La cantidad de glucosa liberada se analizó por el método de antrona tal como se describió antes. Tanto el contenido de carbohidratos solubles como de almidón (mg por planta), se calcularon como el producto entre la concentración (mg g<sup>-1</sup>) y la biomasa de la corona (g) al comienzo y al final del experimento, en *L. tenuis*. Para *P. dilatatum*, el contenido de carbohidratos solubles y almidón se calcularon como el producto de su concentración (mg g<sup>-1</sup>) y la biomasa de las láminas y vainas (g) al comienzo y al final del experimento. La diferencia entre estos dos valores representa el cambio en el contenido de carbohidratos solubles y almidón durante el curso de los 30 días de experimento.

#### *Análisis estadístico*

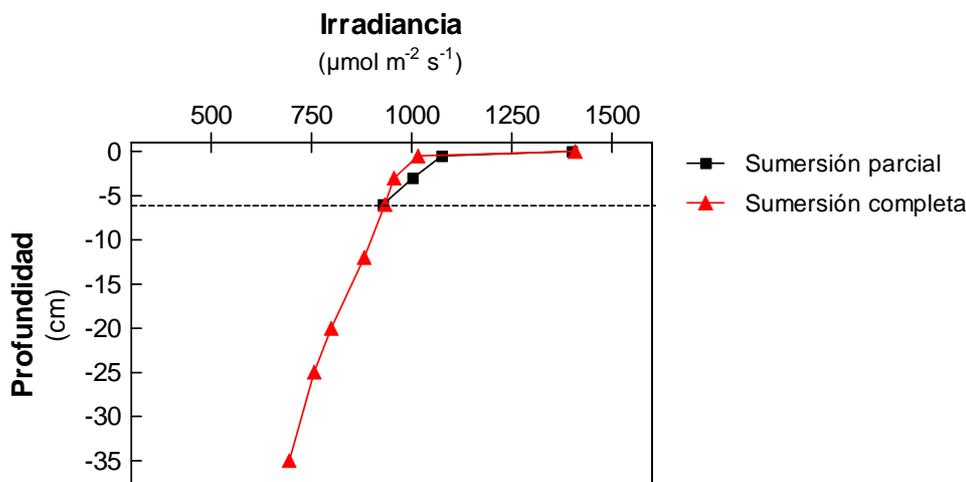
Se analizaron los resultados separadamente para cada especie mediante una ANOVA de una vía con “niveles de sumersión” como factor principal. La significancia de las diferencias entre los tratamientos se evaluó con un test de Tukey ( $P < 0.05$ ). Previamente se verificó la homogeneidad y normalidad de varianzas. Las variables que involucraron proporciones fueron transformadas ( $\arcsen\sqrt{x}$ ) antes de realizar los análisis. Los análisis se realizaron con el software estadístico InfoStat versión 2010 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Los resultados se presentaron como valores promedio sin transformar  $\pm$  el error estándar.

### **B.3 RESULTADOS**

#### *Efectos de la inundación sobre la aireación del suelo y la disponibilidad de luz bajo el agua*

Durante el curso del experimento, la tasa de difusión de oxígeno (ODR) permaneció constante bajo condiciones control, oscilando entre 74.3 a  $78.3 \times 10^{-8}$  g cm<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup>, indicando buenas condiciones de aireación del suelo. En el suelo anegado, esta variable decreció lentamente, incluso registrando valores de ODR reportados como no limitantes para el crecimiento de las raíces después de 6 días de tratamiento ( $25.5 \pm 3.2 \times 10^{-8}$  g cm<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup>). Sin embargo, los valores cayeron en el día 10 a  $1.5 \pm 0.7 \times 10^{-8}$  g cm<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup> y valores similares fueron registrados hasta el final del experimento. Finalmente, los valores de ODR bajo condiciones de sumersión parcial y completa decrecieron rápidamente de  $77.3 \pm 3.7$  a  $6.9 \pm 1.1 \times 10^{-8}$  g cm<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup> durante los primeros 3 días, y permanecieron cercanos a cero hasta el final del experimento como es esperado para un suelo anaeróbico. La irradiancia inmediatamente por encima del agua, superior a los 1250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , disminuyó drástica y progresivamente conforme aumentó la profundidad del agua hasta alcanzar valores de 650-700  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a los 35 cm de profundidad (Figura 3.1). Tales valores se pueden considerar relativamente altos para

permitir sostener niveles apreciables de fotosíntesis debajo del agua según los datos disponibles en la literatura (ver Mommer y Visser, 2005; Colmer y Pedersen, 2008).



**Figura 3.1.** Radiación fotosintéticamente activa (PAR,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) medida desde la superficie (aire) hasta la base de los tallos (bajo el agua) en las piletas donde se aplicaron los tratamientos. Las mediciones se realizaron a 0, 3, 6, 12, 20, 24, 35 cm de profundidad. La línea discontinua indica los 6 cm de altura del agua en el tratamiento de sumersión parcial.

#### Porosidad de las raíces

Se encontró una baja porosidad (12.8%) en las raíces de *L. tenuis* crecidas bajo condiciones control con respecto a aquellas crecidas en suelo con exceso de agua ( $P < 0.05$ ), donde la porosidad radical aumentó desde sumersión completa y suelo saturado (21.6%) hasta sumersión parcial (32.5%; Cuadro 3.1). En las raíces de *P. dilatatum* el aerénquima constitutivo fue mayor que en *L. tenuis* (ca. 20%; Cuadro 3.1), incrementándose a poco más del doble de lo registrado en plantas control en los tratamientos con exceso de agua, tanto bajo suelo saturado como en sumersión completa de las plantas (Cuadro 3.1).

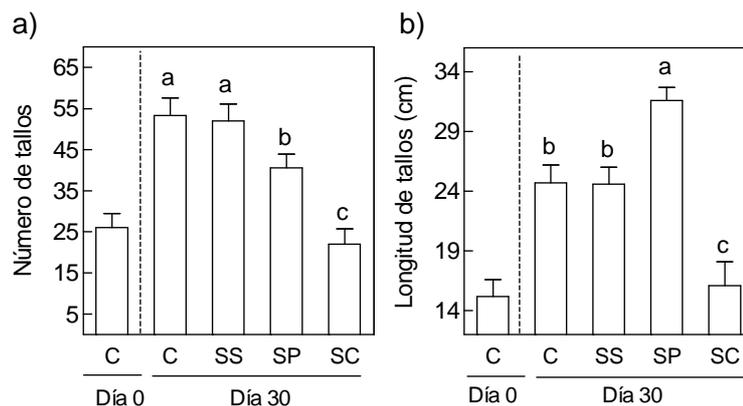
**Cuadro 3.1.** Porosidad de raíces (%) medida por picnometría de raíces de plantas de *Lotus tenuis* y *Paspalum dilatatum*, creciendo por 30 días bajo intensidades crecientes de inundación.

Porosidad de raíces (%)	Tratamientos			
	Control	Suelo saturado	Sumersión parcial	Sumersión completa
<i>L. tenuis</i>	12.8 ± 2.2 c	27.9 ± 3.1 ab	32.5 ± 2.9 a	21.6 ± 2.7 b
<i>P. dilatatum</i>	19.7 ± 2.0 b	45.7 ± 8.6 a	42.4 ± 4.1 a	43.7 ± 6.6 a

Los valores representan el promedio de ocho plantas ± el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos, basadas en el test de Tukey.

*Número y longitud de los tallos de Lotus tenuis*

Tal como se esperaba, el número de tallos de *L. tenuis* se incrementó durante el curso del experimento, con excepción de las plantas crecidas bajo condiciones de sumersión completa (Figura 3.2). La magnitud de este incremento fue menor en condiciones de sumersión parcial que bajo condiciones control y suelo saturado. Por lo tanto, el número de tallos de las plantas parcialmente sumergidas fue 22.1% menor en comparación con las plantas crecidas en condiciones control y en suelo saturado ( $P < 0.05$ ; Figura 3.2). Notablemente, en lugar de presentar una alta tasa de aparición de nuevos tallos, las plantas parcialmente sumergidas priorizaron la elongación de los tallos emergidos (una respuesta típica de plantas que desarrollan una estrategia de escape), tal como lo reveló la longitud de los cinco tallos más largos, que tuvieron una longitud un 30% mayor que las plantas control y que las de suelo saturado ( $P < 0.01$ ; Figura 3.2). Por el contrario, las plantas completamente sumergidas no mostraron un incremento en el número ni en la longitud de sus tallos en relación a los valores registrados el día 0 (comparar C día 0 vs. SC día 30;  $P > 0.7$  en ambos casos), aunque es importante destacar que todas las plantas sobrevivieron los 30 días de sumersión completa. El hecho de que estas variables permanezcan sin cambios bajo la condición de sumersión completa, fue la primer evidencia del síndrome de quiescencia en plantas de *L. tenuis*.

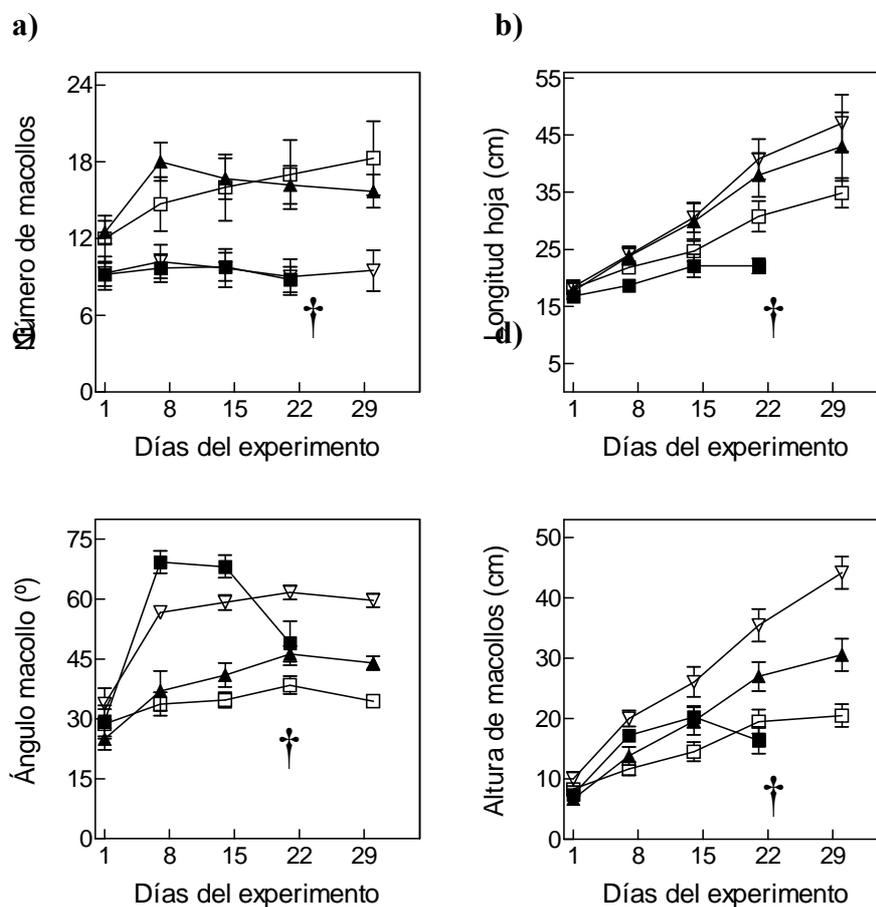


**Figura 3.2.** Número (a) y longitud (b) de tallos de plantas de *Lotus tenuis* crecidas por 30 días bajo intensidades crecientes de inundación. C: control; SS: suelo saturado; SP: sumersión parcial; SC: sumersión completa. Las mediciones se hicieron al comienzo (día 0) y al final del experimento (30). Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos al día 30, basadas en el test de Tukey. Los valores corresponden al promedio de ocho plantas  $\pm$  el error estándar.

*Número, altura y ángulo de inserción de los macollos de Paspalum dilatatum*

El número de macollos se incrementó en las plantas control y bajo suelo saturado, con respecto a la condición inicial ( $P < 0.05$ ; Figura 3.3a). Aquellas plantas crecidas bajo sumersión parcial y completa, no incrementaron el número de macollos con respecto al inicio de los tratamientos ( $P > 0.05$ ; Figura 3.3a). La longitud total de las hojas se incrementó al doble en aquellas plantas crecidas bajo suelo saturado y sumersión parcial en relación a aquellas crecidas bajo condiciones control ( $P < 0.01$ ; Figura 3.3b). A su vez, las plantas sumergidas completamente no mostraron un incremento significativo en la longitud de sus macollos respecto a la longitud inicial ( $P > 0.05$ ; Figura 3.3b).

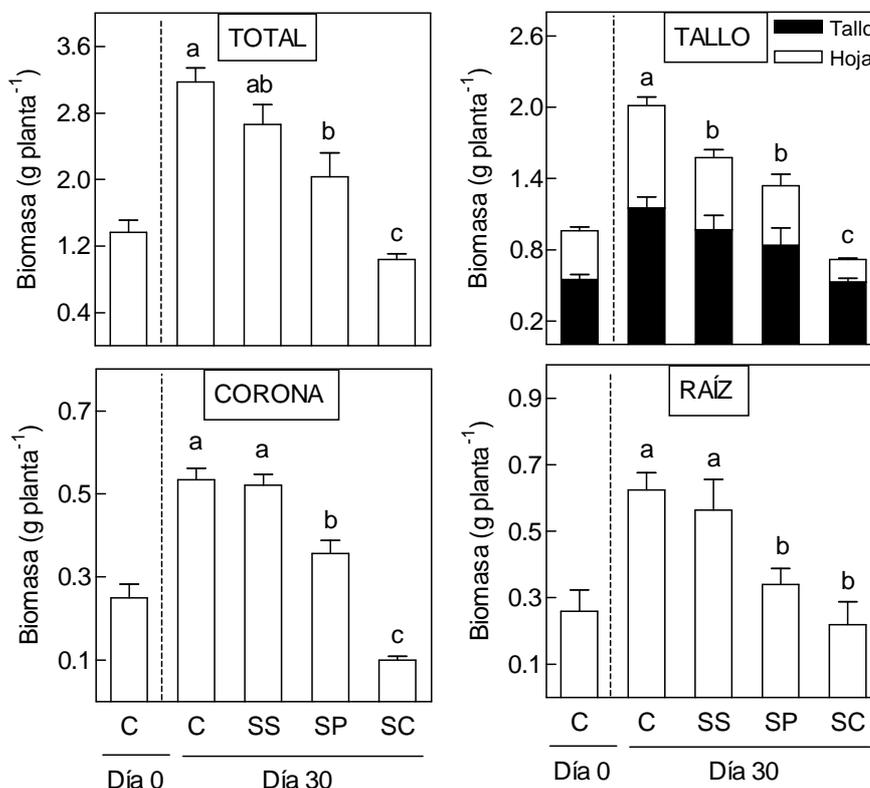
El ángulo de inserción de los macollos se modificó en las plantas con sumersión parcial ( $P < 0.01$ ) y completa ( $P < 0.001$ ) ya a los 7 días de iniciados los tratamientos (Figura 3.3c). Las plantas se tornaron más erectas a medida que la profundidad de la inundación aumentó (de  $33.8^\circ$  a  $56.7^\circ$  para SP y de  $29.5^\circ$  a  $69.3^\circ$  para SC). Sin embargo, bajo suelo saturado las plantas no mostraron cambios significativos en el ángulo de inserción de sus macollos a lo largo de todo el experimento ( $P > 0.05$ ; Figura 3.3c). A partir de la segunda semana de transcurridos los tratamientos, las plantas bajo sumersión completa comenzaron a disminuir el ángulo de inserción de sus macollos producto del inicio de su senescencia y posterior muerte hacia la tercer semana de iniciado el experimento (Figura 3.3c). El cambio del ángulo de inserción de los macollos y el incremento en su longitud se tradujeron en un incremento significativo de la altura de las plantas, tanto las crecidas en suelo saturado (33% más altas que las plantas control) como aquellas bajo sumersión parcial (54% más altas que las plantas control; Figura 3.3d). Estos resultados serían un primer indicio de una respuesta de “escape” a la inundación por parte de *Paspalum*.



**Figura 3.3.** a) Número, b) longitud, c) ángulo de inserción y d) altura de macollos de plantas de *Paspalum dilatatum* crecidas bajo intensidades crecientes de inundación por 30 días. □: Control; ▲: Suelo saturado; ▽: Sumersión parcial; ■: Sumersión completa. † indica que las plantas murieron antes de finalizar el experimento. Los valores corresponden al promedio de ocho plantas  $\pm$  el error estándar.

*Biomasa de las plantas e intensidad de inundación*

El incremento en la intensidad de inundación tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento de las plantas de *L. tenuis* (Figura 3.4). Al final del experimento, la biomasa total de las plantas fue 30.3% y 64.4% menor en condiciones de sumersión parcial y completa, respectivamente, con respecto a las plantas control y de suelo saturado ( $P < 0.05$ ), cuya biomasa final fue similar ( $P = 0.26$ , Figura 3.4). Como se esperaba para plantas quiescentes, la acumulación de biomasa durante el experimento fue despreciable bajo condiciones de sumersión completa. Más aún, se observó una tendencia a reducir la biomasa en las plantas completamente sumergidas ( $P = 0.072$ ; comparar día 0 vs. día 30 en Figura 3.4), relacionado con la intensa caída en los carbohidratos de las coronas (ver sección siguiente). La biomasa de los tallos fue progresivamente menor a medida que la intensidad de inundación aumentó: las plantas crecidas bajo suelo saturado, sumersión parcial y sumersión completa mostraron una biomasa de tallos que fue 21.7%, 33.5% y 64.3% menor que aquellas plantas crecidas bajo condiciones control, respectivamente ( $P < 0.05$  para todos los casos, Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Biomasa de plantas de *Lotus tenuis* sujetas a tratamientos crecientes de inundación. C: control a capacidad de campo; SS: suelo saturado; SP: sumersión parcial; SC: sumersión completa. Las cosechas se realizaron al comienzo y al final del experimento (días 0 y 30, respectivamente). Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos al día 30 basadas en el test de Tukey. Los valores son promedio de ocho plantas  $\pm$  el error estándar.

Los compartimentos de los tallos fueron afectados de manera diferente por los tratamientos, la biomasa foliar estuvo más afectada que la de los tallos a medida que la intensidad de inundación aumentó. Respecto a esto, la relación de biomasa entre hoja-tallo fue menor en las plantas parcial y completamente sumergidas que en las control y

en suelo saturado ( $P < 0.05$ ; Cuadro 3.2). Notablemente, las plantas completamente sumergidas tuvieron menor relación hoja-tallo y menor contenido de clorofila en las hojas, tal como revelaron las mediciones de SPAD (verdor, Cuadro 3.2). Ambos parámetros (tallos con menor proporción de hojas y hojas con menor contenido de clorofila) sugieren fuertemente que el potencial fotosintético de las plantas sumergidas estaría disminuido. La biomasa de las coronas al día 30 fue menor en los tratamientos de sumersión parcial y completa que en el resto de los tratamientos (33.3% y 81.3% menos biomasa, respectivamente;  $P < 0.05$  en todos los casos; Figura 3.4). Sin embargo, las diferencias más importantes fueron encontradas entre los dos tratamientos en relación a los valores registrados al inicio y al final del experimento: la biomasa de coronas fue la misma en las plantas parcialmente sumergidas mientras que fue significativamente inferior bajo sumersión completa (comparar día 0 vs. día 30 en Figura 3.4). A su vez, la reducción de la biomasa de coronas de las plantas completamente sumergidas fue más que proporcional a la reducción en la biomasa total, tal como lo indica la menor relación de biomasa corona-biomasa total (Cuadro 3.2). Es importante notar que la biomasa de la planta en el día 0 y en el día 30 en este tratamiento se mantuvo en rangos similares de tamaños, confirmando que la reducción de la corona se debió principalmente a efectos del tratamiento de sumersión. El consumo de las reservas de las coronas se relacionó con la supervivencia de estas plantas, una respuesta asociada a la quiescencia de *L. tenuis* bajo condiciones de sumersión completa. Al mismo tiempo, el crecimiento de las raíces estuvo diferencialmente afectado por los tratamientos: cesó en las plantas parcial y completamente sumergidas ( $P > 0.25$ ; comparar día 0 vs. día 30 en Figura 3.4), pero continuó en las de suelo saturado y control (Figura 3.4). Consecuentemente, al final del experimento, las plantas parcial y completamente sumergidas tuvieron una biomasa de raíces que fue un 42.8% y 63.0% menor (respectivamente) que las plantas control y de suelo saturado ( $P < 0.05$ ; Figura 3.4).

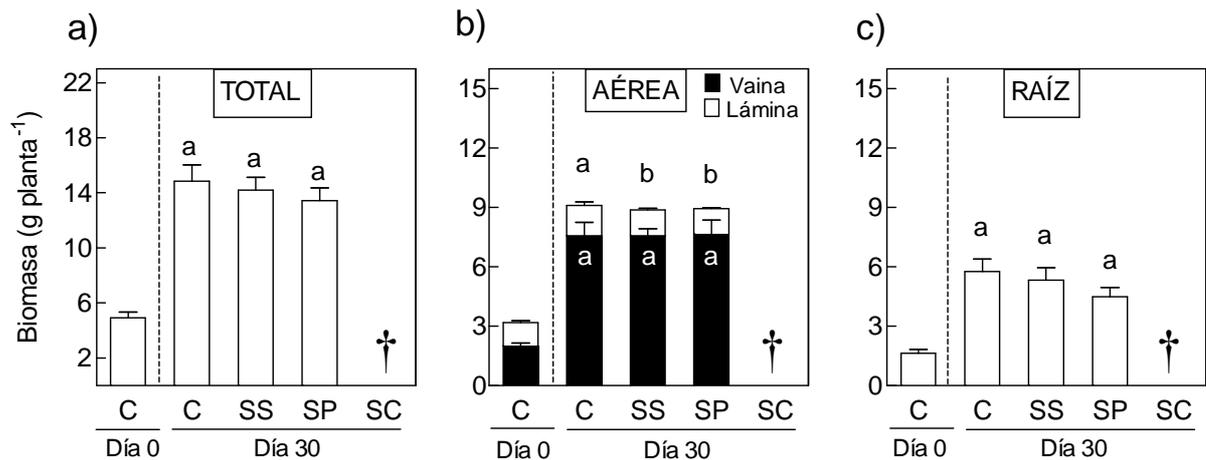
**Cuadro 3.2.** Relaciones de biomasa ( $\text{g g}^{-1}$ ) entre los diferentes compartimentos de plantas de *Lotus tenuis* e índice de verdor (unidades Spad). Las plantas estuvieron 30 días bajo intensidades crecientes de inundación.

	Día 0	Día 30			
	Control	Control	Suelo saturado	Sumersión parcial	Sumersión completa
Relación hoja:tallo ( $\text{g g}^{-1}$ )	0.41 ± 0.04	0.43 ± 0.04 a	0.38 ± 0.03ab	0.34 ± 0.02 b	0.25 ± 0.02 c
Relación corona:total ( $\text{g g}^{-1}$ )	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.01 a	0.20 ± 0.02 a	0.19 ± 0.02 a	0.10 ± 0.01 b
Verdor (unidades SPAD)	44.6 ± 1.2	46.3 ± 1.9 a	36.5 ± 2.6 b	33.0 ± 1.9 b	17.0 ± 3.3 c

Los valores representan el promedio de ocho plantas ± el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos, basadas en el test de Tukey.

En *Paspalum dilatatum*, el incremento en la intensidad de inundación afectó el crecimiento de las plantas sólo bajo condiciones de sumersión completa (Figura 3.5.a). Tanto la biomasa total, como la biomasa separada por compartimentos no se vio modificada por el aumento en la intensidad de inundación hasta niveles de sumersión parcial en relación a la condición control ( $P > 0.05$ ; Figura 3.5a, b y c). A los 30 días de

iniciado el experimento, la biomasa total de las plantas bajo sumersión completa fue un 70% menor que la biomasa total del resto de los tratamientos (Figura 3.5a). Al separar la biomasa por compartimentos, se vio que la biomasa de la vaina fue la más afectada por la sumersión completa, siendo 6 veces menor que en el resto de los tratamientos (si se comparan entre los valores promedios de todos los tratamientos y el de las plantas bajo SC: 7.6 g vs. 1.3 g, respectivamente). Siguiendo esta misma estructura de comparación, para el caso de la biomasa de láminas, fue 3 veces menor bajo SC y el compartimento menos afectado por este tratamiento fue la raíz, que sólo fue 2 veces menor que el resto de los tratamientos (Figura 3.5b).



**Figura 3.5.** Biomasa total **a)**, y separada por compartimentos: **b)** tallo y **c)** raíz, de plantas de *Paspalum dilatatum* sujetas a tratamientos crecientes de inundación. C: control a capacidad de campo; SS: suelo saturado; SP: sumersión parcial; SC: sumersión completa. Las cosechas se realizaron al comienzo y al final del experimento (día 0 y 30 respectivamente). Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos al día 30 basadas en el test de Tukey. † indica que las plantas murieron antes de finalizar el experimento. Los valores son promedio de ocho plantas  $\pm$  el error estándar.

El análisis de las relaciones de biomasa entre los compartimentos, permite tener una idea aproximada de los patrones de partición de biomasa dentro de la planta y relacionarlo con el tipo de respuesta frente a intensidades de inundación. Los resultados mostraron que la biomasa de láminas verdes disminuyó significativamente bajo sumersión completa ( $P < 0.05$ ), al igual que sus niveles de clorofila (36.6 vs. 18.1 unidades SPAD;  $P < 0.05$ ; Cuadro 3.3). Tales respuestas sumadas a la falta de elongación de vainas y láminas (previamente comentadas), y a la caída en la relación de biomasa aérea y biomasa total sugieren que, bajo este escenario, *P. dilatatum* sufre un importante estrés en su crecimiento (principalmente en la parte aérea), siendo incapaz de sustentar una estrategia para sobrevivir ante un evento de sumersión completa. Así, sus plantas murieron luego de 20 días bajo el agua.

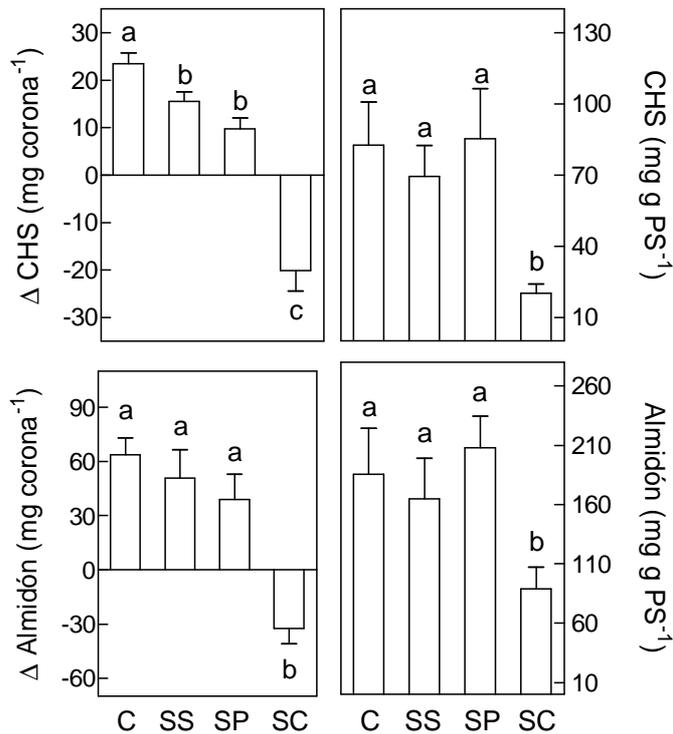
**Cuadro 3.3.** Relaciones de biomasa ( $\text{g g}^{-1}$ ) entre los diferentes compartimentos de plantas de *Paspalum dilatatum* e índice de verdor (unidades Spad). Las plantas estuvieron 30 días bajo intensidades crecientes de inundación.

	Día 0	Día 30			
	Control	Control	Suelo saturado	Sumersión parcial	Sumersión completa
Relación lámina:vaina ( $\text{g g}^{-1}$ )	0.20 ± 1.3	0.25 ± 1.1 a	0.25 ± 0.9 a	0.17 ± 1.0 a	
Relación aérea:total ( $\text{g g}^{-1}$ )	0.61 ± 0.5	0.61 ± 0.7 a	0.60 ± 1.0 a	0.61 ± 0.9 a	
Relación vaina:total ( $\text{g g}^{-1}$ )	0.51 ± 1.1	0.49 ± 0.7 a	0.48 ± 1.3 a	0.52 ± 1.0 a	†
Verdor (unidades SPAD)	42.1 ± 0.6	36.6 ± 0.9 a	36.8 ± 1.66 a	36.8 ± 1.9 a	

Los valores representan el promedio de ocho plantas ± el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos, basadas en el test de Tukey. † indica que las plantas murieron antes de finalizar el experimento.

#### *Carbohidratos solubles y almidón en coronas de L. tenuis*

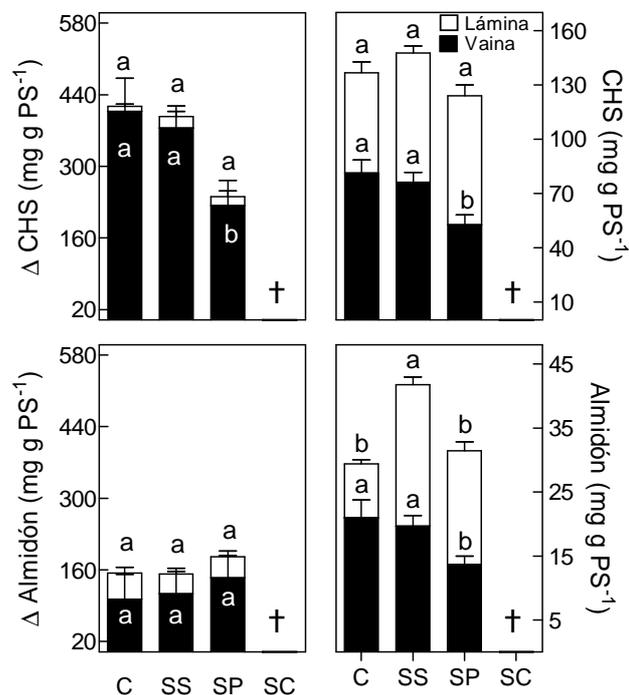
Los carbohidratos solubles y el almidón se acumularon en las coronas de las plantas durante el curso del experimento en las plantas crecidas bajo condiciones control, suelo saturado y sumersión parcial (Figura 3.6). La magnitud de la acumulación difirió entre los tratamientos para el contenido de carbohidratos solubles, pero no para el contenido de almidón (Figura 3.6). En este sentido, las plantas control acumularon el doble de carbohidratos solubles en sus coronas que aquellas crecidas en suelo saturado y en sumersión parcial ( $P < 0.01$ ; Figura 3.6). Por el contrario, las plantas completamente sumergidas mostraron una importante reducción en los contenidos de carbohidratos solubles y almidón con respecto a los valores registrados para el día 0 ( $P < 0.01$ ; Figura 3.6), indicando una alta tasa de consumo de carbohidratos solubles y de catabolismo del almidón bajo condiciones de anaerobiosis. Es importante destacar que, la sumersión completa fue el único tratamiento que provocó reducciones en las concentraciones de carbohidratos solubles y almidón (Figura 3.6). En este sentido, las plantas completamente sumergidas tuvieron menores concentraciones de carbohidratos solubles y de almidón (75% y 50% respectivamente) que las plantas sujetas a cualquier otro tratamiento ( $P < 0.05$ ; Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Variación en el contenido de carbohidratos solubles (CHS) y almidón (día 30- día 0) y concentración final en coronas de plantas de *Lotus tenuis*, sujetas a intensidades crecientes de inundación. C: control; SS: suelo saturado; SP: sumersión parcial; SC: sumersión completa. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos, basadas en el test de Tukey. Los valores corresponden al promedio de ocho plantas  $\pm$  el error estándar.

#### *Carbohidratos solubles y almidón en láminas y vainas de P. dilatatum*

Tanto el contenido de carbohidratos solubles (mg g PS<sup>-1</sup>) como el de almidón se incrementaron en todos los tratamientos respecto a los valores iniciales ( $P < 0.05$ ; Figura 3.7, paneles izquierdos). Sin embargo, la magnitud del cambio en el contenido de CHS fue significativamente inferior en aquellas plantas crecidas bajo sumersión parcial. Las plantas crecidas bajo sumersión completa senescieron y murieron a los 20 días de tratamiento, por lo que a los 30 días no se evaluó el contenido ni la concentración de carbohidratos solubles y almidón sobre el tejido muerto. La concentración en vainas y láminas de carbohidratos solubles (CHS) fue menor bajo condiciones de sumersión parcial con respecto al control (SP,  $P < 0.05$ ; Figura 3.7, panel superior derecho). La concentración de almidón en vainas también fue menor en las plantas de sumersión parcial, mientras que en las láminas las concentraciones se mantuvieron como en el control ( $P > 0.05$ ). Bajo suelo saturado las láminas foliares mostraron una mayor concentración de almidón (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** Variación en el contenido de carbohidratos solubles (CHS) y almidón (día 30- día 0) y concentración final en láminas y vainas de plantas de *Paspalum dilatatum*, sujetas a intensidades crecientes de inundación. C: control; SS: suelo saturado; SP: sumersión parcial; SC: sumersión completa. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos, basadas en el test de Tukey. † indica que las plantas sujetas a SC murieron antes de finalizar el experimento. Los valores corresponden al promedio de seis plantas  $\pm$  el error estándar.

En ambas especies se chequeó la supervivencia y rebrote (aunque no se cuantificó) de las plantas luego de finalizados los tratamientos, en especial el de sumersión completa. Al respecto, se observó que luego de dos semanas de concluido el experimento, ninguna planta de *P. dilatatum* que estuvo bajo sumersión completa rebrotó ni produjo hojas nuevas, confirmando la muerte de las mismas en dicho escenario estresante. Por el contrario, las plantas de *L. tenuis* sí lograron rebrotar luego de retirada el agua de sumersión, confirmando la supervivencia de las mismas desarrollando una estrategia de quiescencia.

## B.4 DISCUSIÓN

Los resultados revelaron que las plantas adultas de *L. tenuis* pueden adoptar una estrategia de “escape”, basada en promover la elongación del tallo sumergido o una estrategia de quiescencia, basada en suprimir la elongación y consumir las reservas almacenadas en las coronas. Adoptar una u otra estrategia depende de si el tallo está parcial o completamente sumergido por el agua. Este es el primer registro que muestra que individuos de una misma especie o ecotipo pueden responder con una u otra estrategia dependiendo de las condiciones de inundación. La especie es, por lo tanto, capaz de cambiar su estrategia de crecimiento dependiendo del nivel de sumersión. Por su parte, las plantas de *P. dilatatum* son capaces de desarrollar una estrategia de “escape” frente a una sumersión parcial, pero no pueden sobrevivir más de 20 días bajo condiciones de sumersión completa, dado que no desarrollan una estrategia de quiescencia e intentan “escapar” aún cuando la sumersión es completa y no logran alcanzar la superficie. El resultado de esta respuesta es la muerte de la planta en la tercera semana de tratamiento.

En condiciones de sumersión parcial, el crecimiento de las raíces se detuvo en las plantas de *L. tenuis*, y la partición de carbono se priorizó hacia el tallo sin consumir exhaustivamente las reservas de carbohidratos (solubles y almidón). En las plantas de *P. dilatatum* también cambió la partición de carbono hacia la parte aérea, mostrando vainas de mayor longitud y una leve caída en la concentración de carbohidratos solubles, aunque la biomasa no se modificó significativamente, pero el número de macollos fue menor que en los demás tratamientos. Resultados similares en relación a los cambios en la partición han sido descritos en otra gramínea crecida bajo condiciones de sumersión parcial, como *Echinochloa haplocada* (Oesterheld y McNaughton, 1991). Por el contrario, tanto las plantas de *L. tenuis* como las de *P. dilatatum* que estuvieron completamente sumergidas suspendieron su crecimiento, sin acumular biomasa, ni produjeron nuevos tallos/macollos, ni hubo elongación de los existentes, ni tampoco se observaron cambios en la porosidad de los tejidos. Sin embargo, después de aproximadamente 20 días de sumersión completa, las plantas de *P. dilatatum* comenzaron a senescer, por lo que no fueron capaces de sobrevivir hasta el día 30, momento en que finalizó el experimento. Este resultado indica que el cese del crecimiento en *P. dilatatum* no respondería a una estrategia de quiescencia, como sí se observó en *L. tenuis*, sino más bien fue producto del estrés generado bajo condiciones de sumersión completa. La estrategia adoptada por *L. tenuis* (i.e. el cese del crecimiento y sin cambios en la porosidad) implicó una mejora en las perspectivas de supervivencia, que se asocia al conspicuo consumo de las reservas de carbohidratos solubles y almidón almacenados en las coronas. Estas reservas le permitieron sostener los requerimientos metabólicos básicos en ausencia de cantidades presumiblemente significativas de fotosíntesis subacuática neta (menor relación hoja-tallo y menor cantidad de clorofila foliar). El cambio de estrategia que puede explorar *L. tenuis* entre escapar del agua y permanecer quiescente depende de la profundidad del agua. Esto permite explicar el éxito de *L. tenuis* en ambientes sujetos a eventos de inundación impredecibles y de intensidad variable. Sin embargo, *P. dilatatum* también es una especie exitosa en estos ambientes (Loreti y Oesterheld, 1996), condición que podría relacionarse con su capacidad de rebrote una vez reducida la altura de la inundación o bien con que en el pastizal las inundaciones por lo general no necesariamente producen la sumersión total de las plantas. La capacidad de rebrotar estaría relacionada con el desarrollo de los rizomas, donde almacena la mayor cantidad de reservas de carbohidratos, tal como sucede en otras especies de morfología similar (*Acorus calamus*, Schlüter y Crawford,

2001; *Potamogeton pectinatus*, Summers y Jackson, 1994). En el presente experimento, las plantas no contaron inicialmente con rizomas, dado que las plantas eran relativamente jóvenes, condición que posiblemente pudo condicionar su supervivencia bajo condiciones de sumersión completa.

La aireación interna de la planta es crítica para el crecimiento y la supervivencia bajo condiciones de suelo saturado y sumersión parcial (Armstrong, 1979; Vartapetian y Jackson, 1997; Colmer, 2003a). El suelo saturado, como consecuencia del encharcamiento, pareciera no comprometer la acumulación de biomasa en ambas especies, ya que la biomasa de los tallos y raíces fueron similares a aquellas plantas con un drenaje óptimo del suelo (Figuras 3.4 y 3.5). En este sentido, las plantas crecidas en suelo saturado tuvieron todas sus hojas sobre el nivel del agua, sin ver perjudicada potencialmente su fotosíntesis ni captura de oxígeno atmosférico (Laan *et al.*, 1990; Grimoldi *et al.*, 1999) para su transporte a través de raíces con mayor porosidad (tejido aerenquimático; Cuadro 3.1). Bajo condiciones de mayor profundidad de agua (*i.e.* sumersión parcial) parte del área foliar resultó sumergida y las plantas mostraron un incremento mayor en la porosidad de sus raíces, lo cuál facilitaría aún más el transporte longitudinal de los gases y la provisión de oxígeno al sistema radical inundado (Colmer, 2003a). Bajo estas condiciones, en *L. tenuis* la partición de carbono estuvo dirigida exclusivamente hacia los tallos a expensas del crecimiento radical (Figura 3.4), mientras que en *P. dilatatum* hubo cambios morfológicos pero sin modificaciones en la partición entre biomasa aérea y radical (Figura 3.5). Los cambios morfológicos desarrollados por *Paspalum* involucraron respuestas tendientes a incrementar la altura de las plantas y la exposición de las hojas por fuera del agua. Dichos cambios involucraron aumentos casi inmediatos en el ángulo de inserción de los macollos, seguidos por una mayor elongación de las vainas (Figura 3.3). En ambas especies, las respuestas descritas concuerdan con la estrategia de ‘escape’ a la sumersión parcial y con lo reportado previamente en trabajos relacionados (Grimoldi *et al.*, 1999; Insausti *et al.*, 2001; Mollard *et al.*, 2010). El disparador de la mayor elongación de tallos (*L. tenuis*) y vainas (*P. dilatatum*) podría estar asociado con el aumento en la acumulación de etileno dentro de las partes sumergidas, que promueve la extensión de los tejidos activando la síntesis de giberelinas e inhibiendo a su antagonista el ácido abscísico (Voeselek *et al.*, 1990, 2006; Fukao y Bailey-Serres, 2008; Jackson, 2008). Una alta tasa de elongación de los tallos y macollos mantiene una alta proporción de área foliar fuera del agua (Laan *et al.*, 1990; Grimoldi *et al.*, 1999; Striker *et al.*, 2005). Esto además, facilita la entrada de oxígeno atmosférico, el mantenimiento de la fotosíntesis (Insausti *et al.*, 2001; Striker *et al.*, 2005) y evita la senescencia foliar acelerada bajo el agua (amarillamiento) que se atribuye también a la acumulación de etileno en las hojas sumergidas (Jackson y Hall, 1987). En el caso de *L. tenuis*, la fotosíntesis aérea de las plantas parcialmente sumergidas parece contribuir de manera significativa con el crecimiento del tallo, tanto en longitud como en biomasa, evitando el consumo exhaustivo de las reservas de carbohidratos de las coronas (Figura 3.6). Esta idea se apoya en la relación hoja-tallo y el índice de verdor (*i.e.* clorofila) que tuvieron las hojas de las plantas parcialmente sumergidas, que fueron ligeramente inferiores a las de los controles pero muy superiores a las de las plantas completamente sumergidas (Cuadro 3.2). Trabajos anteriores de *L. tenuis* donde las plantas fueron sumergidas parcialmente por 25 días, mostraron que la fotosíntesis y la conductancia estomática se mantuvieron (Striker *et al.*, 2005). En *P. dilatatum*, la elongación de las vainas pudo haber estado relacionada en mayor medida con la fotosíntesis actual a nivel de planta y, en menor medida, con el consumo de carbohidratos solubles y almidón en dichos órganos. Esto se apoya en que las relaciones de biomasa aérea-biomasa total y el verdor de las hojas se mantuvieron inalterados con

respecto a los controles (Cuadro 3.3) y en que los niveles de almidón (y carbohidratos solubles) en las vainas de *P. dilatatum* se redujeron pero en baja proporción (Figura 3.7). En otras especies de ambientes inundables como *Potamogeton pectinatus* L., se vio que la tasa de degradación de almidón se mantiene constante cuando las plantas pasan de un suelo aeróbico a uno anaeróbico, lo que sería un factor clave para la supervivencia de las plantas bajo estas condiciones (Dixon *et al.*, 2006).

Las plantas sometidas a sumersión completa estuvieron intensamente estresadas. Todas las hojas permanecieron sumergidas y por lo tanto limitadas en la captura de dióxido de carbono y oxígeno necesario para sostener la fotosíntesis y el metabolismo aeróbico. En esta situación, las respuestas de *L. tenuis* estuvieron dirigidas a sobrevivir en lugar de crecer (Figura 3.2), como se vio previamente en *Rumex crispus* (Laan y Blom, 1990) y en los cultivares de *Oryza sativa* tolerantes a la sumersión (Setter y Laureles, 1996). En *L. tenuis* se observó también una falta de elongación de los tallos y una caída en la acumulación de biomasa bajo sumersión completa (Figuras 3.2 y 3.3). Se ha demostrado que ambas respuestas son beneficiosas para la supervivencia de las plantas bajo esta condición. Setter y Laureles (1996) evaluaron seis cultivares de *O. sativa* y demostraron que la supervivencia a 14 días de sumersión completa se correlacionó con la ausencia de elongación de los tallos. Además, los autores propusieron que durante un mayor periodo bajo el agua, las plantas utilizarían carbohidratos para sobrevivir y sostener la elongación de los tallos. La respuesta de *P. dilatatum* frente a la sumersión completa cuando pasa los 20 días, indica que esta especie no sería capaz de desarrollar una estrategia de quiescencia tal como lo hace *L. tenuis*. Los resultados sugieren que, independientemente del nivel de sumersión, la gramínea *P. dilatatum* siempre muestra una respuesta de escape. Respuestas similares se han observado en subespecies de arroz intolerantes a la sumersión completa, donde se produce una elongación de la parte aérea con un uso exhaustivo de reservas de carbohidratos sin que la planta logre alcanzar la superficie (Bailey-Serres *et al.*, 2010). Probablemente, el ecotipo de *P. dilatatum* utilizado en este experimento, a pesar de provenir de los bajos anegables (ver Mollard *et al.*, 2008; 2010), no posea los mecanismos de regulación necesarios (como factores de respuesta al etileno: *ERF*, Xu *et al.*, 2006) que le permitan entrar en estado de quiescencia ante sumersión completa como sí se observa en *L. tenuis*. En este sentido, el manejo de la energía sería crucial para la tolerancia a la sumersión completa (Fukao y Bailey-Serres, 2004). Es posible que, al igual que en arroz, *L. tenuis* también tenga un gen equivalente a *Sub1A* (Fukao y Bailey-Serres, 2008) que responde al etileno e induce quiescencia reprimiendo la acción de otros genes sensibles a etileno. Además, los resultados encontrados para *L. tenuis* sugieren que la energía utilizada por las plantas para sobrevivir 30 días de sumersión completa fue obtenida a partir del consumo de los carbohidratos solubles y la hidrólisis del almidón presentes en las coronas (Figura 3.4), tal como se vio para las raíces de plantas de *R. crispus* sumergidas (Laan y Blom, 1990) y tallos de plantas de arroz sumergidas (Ram *et al.*, 2002). Más aún, según los resultados aquí descritos para *L. tenuis*, la fotosíntesis subacuática pareciera ser incapaz de proveer cantidades significativas de energía bajo condiciones de sumersión (Mommer y Visser, 2005), ya que las plantas completamente sumergidas tuvieron la menor relación de biomasa hoja-tallo (Figura 3.4; para arroz ver Ella e Ismail, 2006) y las hojas mostraron un muy bajo contenido de clorofila con respecto a los otros tratamientos (Cuadro 3.2; para arroz ver Ella *et al.*, 2003). Adicionalmente, trabajos recientes hechos en seis especies de ambientes inundables mostraron que los valores de fotosíntesis subacuática de *Acorus calamus*, una especie que sobrevive largos periodos de sumersión a expensas del consumo de los carbohidratos almacenados en sus rizomas (Schlüter y Crawford, 2001),

fueron tres veces menores que en las otras especies (Colmer y Pedersen, 2008). Teniendo esto en cuenta, es posible especular que la capacidad para hacer fotosíntesis subacuática decrece en aquellas especies que basan su supervivencia en el consumo de carbohidratos cuando están bajo condiciones de sumersión completa. Esta hipótesis y sus implicancias ameritan futuras investigaciones.

Los carbohidratos se acumularon en las coronas de las plantas de *L. tenuis* en crecimiento (control, suelo saturado y sumersión parcial), y fueron consumidas solamente bajo sumersión completa, la condición más estresante del experimento. Estos resultados coinciden con trabajos previos acerca del uso de los carbohidratos de reserva en *L. tenuis* expuesto a condiciones extremas de privación de carbono: plantas que fueron sometidas simultáneamente a defoliación intensa y sumersión parcial (Striker *et al.*, 2008). Las plantas de *P. dilatatum* no tuvieron ni desarrollaron rizomas durante el transcurso del experimento, por lo que las reservas de carbohidratos solubles y almidón fueron limitadas y se encontraron principalmente en las vainas (Figura 3.7). Esto podría explicar en parte la senescencia a los 20 días de las plantas sometidas a sumersión completa, que no tuvieron reservas de carbohidratos y por lo tanto, fueron incapaces de mantener su metabolismo basal bajo estas condiciones. El uso de los carbohidratos solubles y del almidón de los órganos de almacenamiento, como fuente de energía para el mantenimiento de los procesos asociados con la supervivencia de la planta, parece ser crítico cuando el tiempo de sumersión es prolongado (Crawford, 1992; Bailey-Serres y Voesenek, 2008). La transformación del almidón en carbohidratos respirables bajo condiciones de anoxia sólo ocurrió en las coronas de *L. tenuis* (Figura 3.4) y también se sabe que ocurre en los rizomas de *A. calamus* (Schlüter y Crawford, 2001) y tubérculos de *Potamogeton pectinatus* (Dixon *et al.*, 2006). Probablemente, plantas de *P. dilatatum* con rizomas desarrollados al momento de la sumersión completa, podrían sobrevivir este período a expensas de las reservas de carbohidratos, una hipótesis plausible a ser sometida a prueba en futuras investigaciones. A pesar de que las reservas de las coronas le permitieron a *L. tenuis* sobrevivir a una sumersión completa prolongada, es necesario un tiempo considerable de recuperación para las reservas de la corona y para el desarrollo de nuevas hojas funcionales después de una sumersión al momento de pensar en estrategias de manejo de la especie en el pastizal. Adicionalmente, la producción de biomasa, el vigor y la persistencia de ambas especies en el pastizal podrían caer si las plantas son defoliadas durante o inmediatamente después de la inundación (ver Capítulo 4 de esta tesis).

Los resultados obtenidos en este experimento son relevantes para la ecofisiología y el manejo de estas especies forrajeras. Trabajos futuros que exploren las respuestas de otros genotipos de *L. tenuis* y *P. dilatatum* (*i.e.* poblaciones naturales) podrían ser interesantes para evaluar el grado de variación intraespecífica en la capacidad de las plantas de ajustar su estrategia en función de la profundidad de inundación demostrada aquí para *L. tenuis*, o de evaluar dicha capacidad en otras poblaciones de *P. dilatatum*. La estrategia de supervivencia óptima va a depender del régimen de inundación de un determinado ambiente en el que se desarrolle *P. dilatatum* y donde *L. tenuis* sea incorporada como parte del recurso forrajero. En áreas sujetas a inundaciones poco profundas, tal como las comunidades localizadas a lo largo de posiciones topográficas intermedias, las respuestas de las plantas están orientadas a mantener las hojas por encima del nivel del agua, de modo de permitir la captura de oxígeno y la fijación de carbono, lo que es suficiente para mantener el crecimiento y permitir la supervivencia de las plantas. Por el contrario, en áreas ubicadas en las posiciones topográficas más bajas, en las que las plantas pueden sufrir periódicamente condiciones que van desde suelo saturado hasta la sumersión completa, *L. tenuis* demostró la capacidad de ajustar su

respuesta, suprimiendo la elongación del tallo y adoptando una estrategia de quiescencia. Esta plasticidad no había sido reportada antes para plantas individuales. Estudios previos sólo demostraron cómo diferentes especies o ecotipos poseen estrategias contrastantes frente a niveles de inundación, el mismo genotipo presenta estrategia de escape o estrategia de quiescencia, pero nunca ambas (*e.g.* cultivares de *O. sativa*, Setter y Laureles, 1996; *R. crispus* vs. *R. palustris*, Laan y Blom, 1990; Voesenek *et al.*, 1990 y formas contrastantes de *Ranunculus repens*, Lynn y Waldren, 2003). El desarrollo de esta plasticidad de *L. tenuis*, donde plantas con el mismo *background* genético pueden presentar ambas estrategias, contribuiría a explicar su persistencia en ambientes con diferente intensidad de inundación, donde otras especies leguminosas no logran prosperar. Para *P. dilatatum*, si bien los resultados de este trabajo indicaron que no tolera la sumersión completa más de 20 días, cabe destacar que es una especie persistente y exitosa en los ambientes inundables de la Pampa Deprimida (Chaneton *et al.*, 1988; Insausti *et al.*, 1999; Rubio *et al.* 1997; Striker *et al.*, 2011). Esto podría deberse a varios factores que debieran analizarse en el futuro, como la duración y/o el régimen de sumersión (ver Chen *et al.*, 2011) que efectivamente enfrentan las plantas a campo (que quizás sea de menor magnitud), o también que su éxito esté relacionado con la capacidad de rebrotar una vez restablecidas las condiciones óptimas de crecimiento, a partir del uso de las reservas presentes en sus rizomas y que no se ha evaluado en esta tesis.

Capítulo 4

**EFFECTOS DE LA FRECUENCIA DE DEFOLIACIÓN SOBRE EL  
CRECIMIENTO DE PLANTAS INUNDADAS DE *Lotus tenuis* y *Paspalum  
dilatatum*. Morfología, crecimiento y uso de carbohidratos de reserva.**

## C.1 INTRODUCCIÓN

La capacidad de las plantas de cambiar su morfología en respuesta a la inundación puede verse afectada cuando se combina con eventos periódicos de defoliación, como consecuencia del pastoreo. La defoliación provoca en las plantas cambios morfológicos opuestos a los que genera la sumersión parcial (*cf.* plantas inundadas de porte erecto vs. plantas defoliadas de porte rastrero). Estos cambios incluyen la prioridad de partición de carbono y nutrientes hacia la parte aérea para la reposición de hojas, la movilización y utilización de reservas, y una reducción en altura, adoptando una forma de crecimiento rastrera (McNaughton, 1983; Gautier *et al.*, 1999). Como consecuencia, estas plantas presentan un alto número de macollos/tallos cortos y la biomasa se localiza en los estratos inferiores del canopeo (Gibson *et al.*, 1992; Gautier *et al.*, 1999). Estas respuestas constituirían una estrategia de evasión al pastoreo, ya que una ubicación próxima a la superficie del suelo de los órganos aéreos (*e.g.* hojas, macollos) reduce la biomasa que puede ser removida por los herbívoros (Westoby, 1980; Jaramillo y Detling, 1988; Matches, 1992) y disminuye la probabilidad de que sus meristemas apicales, laterales e intercalares (de gramíneas) sean pastoreados (Branson, 1953; Booysen *et al.*, 1963; Noy-Meir, 1978; Rosenthal y Kotanen, 1994; Lemaire y Chapman, 1996; Zheng *et al.*, 2010). Por el contrario, las plantas responden a la sumersión parcial incrementando su altura y la proporción de biomasa aérea ubicada en los estratos superiores del canopeo (Van der Sman *et al.*, 1991; Insausti *et al.*, 1999, 2001; Striker *et al.*, 2005; Pierik *et al.*, 2009), facilitando la captura de oxígeno atmosférico para la aireación de los tejidos sumergidos (Laan *et al.*, 1990; Grimoldi *et al.*, 1999; Colmer, 2003b; Colmer y Voesenek, 2009). De esta manera, se puede decir que la defoliación y la inundación desencadenan respuestas morfológicas opuestas en la determinación de la altura de las plantas que podrían afectar la proporción de tallos sumergidos/emergidos y, como consecuencia, su acumulación de biomasa (Striker *et al.*, 2008). En los pastizales de la Pampa Deprimida, la defoliación reiterada de la leguminosa *Lotus tenuis* y de la gramínea *Paspalum dilatatum* durante un período de inundación es un evento de ocurrencia, ya que se trata de especies muy preferidas por el ganado (Lemcoff *et al.*, 1978; Agnusdei y Mazzanti, 2001). Más aún, estas especies resultan de especial interés debido a que presentan características de rebrote diferentes. En las gramíneas el crecimiento post-corte está sostenido principalmente por la asimilación de carbono provista por el área foliar remanente (Schnyder y de Visser, 1999; Lattanzi *et al.*, 2005 para *P. dilatatum*) mientras que las leguminosas con coronas, como *Lotus*, cuentan con la posibilidad de utilizar sus carbohidratos de reserva para rebrotar (Smith, 1962; Striker *et al.*, 2008). En este capítulo se abordó el estudio de las respuestas morfológicas, de acumulación de biomasa y del uso de carbohidratos de reserva por parte de la leguminosa *Lotus tenuis* y de la gramínea *Paspalum dilatatum* bajo tratamientos que simulaban una baja y una alta frecuencia de defoliación durante un período de inundación de 40 días durante su etapa activa de crecimiento.

Los efectos de la frecuencia de defoliación en leguminosas se han estudiado principalmente en *Medicago sativa* (alfalfa), donde se ha visto que las reservas orgánicas son críticas para el rebrote de la planta (Avice *et al.*, 1997; Meuriot *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2007). En particular, las reservas de carbono (solubles y almidón) son las que están directamente involucradas en sostener el metabolismo respiratorio radical durante el inicio del rebrote (Avice *et al.*, 1996). Se ha demostrado que la contribución de las reservas para el rebrote de la planta depende de la biomasa remanente de hojas luego de la defoliación (Meuriot *et al.*, 2004). Defoliaciones intensas y/o frecuentes (*i.e.* baja altura de corte y un corto período de descanso entre

defoliaciones, respectivamente) determinan un área foliar remanente reducida y, en consecuencia, una mayor dependencia de las reservas para sostener el rebrote (Smith, 1962; Avice *et al.*, 1996; Sinclair *et al.*, 2007). También se ha visto que la capacidad de usar las reservas para el rebrote luego de la defoliación difiere entre las leguminosas (Smith, 1962; Li *et al.*, 1996). Al respecto, se ha sugerido que el rebrote de *Lotus tenuis* es menos dependiente de sus reservas de corona que la alfalfa (Smith, 1962; Kallenbach *et al.*, 2001). Sin embargo, esta presunción necesita ser cuidadosamente examinada, dado que la biomasa removida con una misma altura de corte no es la misma en ambas especies, ya que *L. tenuis* mantiene una morfología postrada en condiciones de pastoreo. Por lo tanto, el uso de reservas menos marcado que tiene *L. tenuis* puede simplemente estar relacionado con la mayor área foliar remanente que tiene para el rebrote. Incluso, se ha visto que *L. tenuis* es capaz de usar sus reservas de corona cuando la asimilación actual de carbono se restringe de manera marcada, como sucede en plantas bajo sumersión completa (Striker *et al.*, 2008). En gramíneas, el efecto de las altas frecuencias de defoliación se han estudiado principalmente en *Festuca arundinacea*, *Dactylis glomerata* y *Lolium perenne*, encontrándose diversas respuestas morfológicas entre las especies. Altas frecuencias de defoliación determinan plantas con un mayor número de macollos, con menores ángulos de inserción (*i.e.* plantas postradas/rastreras) y la posición más baja de los meristemas de rebrote (Chapman y Lemaire, 1993). Sin embargo, el presumible compromiso de respuesta por parte de las gramíneas cuando están sometidas a un evento de defoliación en presencia de suelo inundado ha sido un tópico escasamente estudiado (*Echinochloa haplocada*, *Hypertelia dissoluta* y *Panicum coloratum* en Oosterheld y McNaughton, 1991; *Deschampsia caespitosa* en Merrill y Colberg, 2003; *Bobloschoenus caldwelii*, *Schoenoplectus validus* y *Phragmites australis* en Hayball y Pearce, 2004), demostrando que esta combinación de estreses tiene un efecto más negativo sobre el crecimiento de las especies que el efecto de cada uno de los factores por separado. Actualmente, no existe ningún antecedente en la literatura, ya sea para especies gramíneas o leguminosas, que haya explorado los efectos de la defoliación reiterada (*i.e.* frecuencia de corte) sobre plantas inundadas, y menos aún haciendo foco en la dinámica de reservas bajo dicha combinación de factores de estrés. Por ello, en este capítulo se estudió la dinámica del uso de reservas de carbohidratos de *L. tenuis* y *P. dilatatum* ante el aumento en la frecuencia de defoliación. La comprensión y cuantificación del estado de las reservas bajo condiciones de estrés combinado en estas especies forrajeras, puede ser útil para definir una práctica de manejo adecuada, con el fin de mejorar la persistencia de estas especies de interés agronómico en el pastizal.

**Objetivo 3:** Evaluar los efectos del aumento en la frecuencia de defoliación sobre la morfología, acumulación de biomasa y uso de carbohidratos de reservas de plantas de *Lotus tenuis* y *Paspalum dilatatum* durante un período de inundación.

**Hipótesis C.1:** La tolerancia a la acción conjunta de la inundación y la defoliación está relacionada con la expresión simultánea de caracteres asociados con la oxigenación de los tejidos sumergidos y la exposición rápida de los órganos aéreos por encima del nivel del agua.

**Hipótesis C.2:** El aumento en la frecuencia de defoliación en plantas inundadas (de mayor altura) genera un marcado compromiso en su crecimiento debido a la mayor remoción de los tejidos aéreos. En tales condiciones, se afecta marcadamente el rebrote de las plantas defoliadas e inundadas.

**Hipótesis C.3:** La caída en el crecimiento de plantas inundadas frecuentemente defoliadas, (debido a la mayor remoción de tejidos aéreos, mencionada en la Hipótesis C.2), estaría condicionada al uso de carbohidratos de reservas para sostener el rebrote.

## C.2 METODOLOGÍA

### *Material vegetal*

Las dos especies forrajeras utilizadas en este experimento son conspicuas de los pastizales inundables de la Pampa Deprimida, que crecen sujetas a eventos periódicos de inundación. La especie *Lotus tenuis* Waldst. & Kit. (sin. *Lotus glaber* Mill.) es una leguminosa perenne naturalizada en estos pastizales. Su estación de crecimiento es primavera-estivo-otoñal. Usualmente presenta una corona bien desarrollada y una raíz principal con numerosas raíces laterales. Las hojas son pentafoliadas, con dos estipulas en la base del pecíolo. La segunda especie *Paspalum dilatatum* Poir. es una gramínea perenne nativa, con la misma estación de crecimiento que *L. tenuis*. Las plantas adultas pueden desarrollar rizomas, que funcionan como órgano de reserva de carbohidratos para el rebrote primaveral (Kavanová y Gloser, 2005). Las vainas y la base de las láminas foliares también pueden acumular este tipo de reservas que resultan rápidamente utilizables para el rebrote dentro de la estación de crecimiento. Ambas especies son capaces de cambiar su hábito de crecimiento en respuesta a condiciones ambientales: crecen de forma postrada (orientación plagiotrópica de los macollos/tallos) bajo condiciones de ausencia de señales de sombreado en ambientes pastoreados (alta relación de luz roja:rojo lejano lateral), y pueden volverse erectas cambiando sus tallos hacia una posición ortotrópica bajo canopeos cerrados o en condiciones de inundación (Gibson *et al.*, 1992; Clúa *et al.*, 1996; Insausti *et al.*, 2001; Striker *et al.*, 2005; 2008).

Para llevar a cabo el experimento, se extrajeron plantas adultas de *L. tenuis* y *P. dilatatum* del pastizal en momentos en los que no estuvo inundado, se transplantaron a macetas de plástico de 4 L con un sustrato de arena y suelo (1:1) del pastizal de la Pampa Deprimida de manera similar a la descrita en el experimento correspondiente al Capítulo 3.

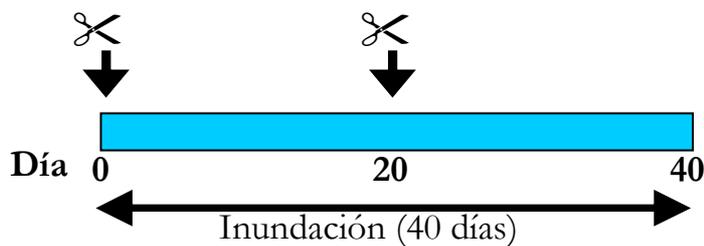
### *Tratamientos de inundación y frecuencias de defoliación*

Luego de 6 meses de aclimatación, las plantas se sometieron a tratamientos combinados de inundación (dos niveles) y defoliación (tres niveles): (i) Inundación artificial por 40 días con una altura del nivel del agua de 4 cm (Cuadro 4.1; Figura 4.1), que es un nivel frecuente a campo (Paruelo y Sala, 1990) y usado en experimentos de simulación de inundación en mesocosmos (Insausti *et al.*, 1999; Striker *et al.*, 2011); (ii) Defoliación: corte de la biomasa con tijera por encima de 4 cm (nivel de inundación). Para simular una baja frecuencia de defoliación se realizó un solo corte al inicio del experimento (día 0) y para simular una alta frecuencia de defoliación se realizaron dos cortes, al inicio (día 0) y en la mitad del período de inundación (día 20). El intervalo de corte elegido para representar una alta frecuencia de defoliación resulta consistente con lo observado para plantas frecuentemente defoliadas a nivel de pastizal (Deregibus *et al.*, 1982; Agnusdei y Mazzanti, 2001). En cada caso la fracción removida por defoliación se secó y se pesó para luego agregarla a la biomasa de las plantas correspondientes. El ambiente anaeróbico edáfico debido a la inundación se caracterizó a través la medición de la tasa

de difusión de oxígeno en el suelo (5 cm prof.) utilizando microelectrodos de platino con referencia a calomel (Letey y Stolzy, 1964; Fiedler *et al.*, 2007).

**Cuadro 4.1.** Combinación de tratamientos de inundación y defoliación y sus niveles.

Tratamientos	No inundado (NI)	Inundado (I)
No defoliado (ND)	ND-NI	ND-I
1 Defoliación (1 Def)	1Def-NI	1Def-I
2 Defoliaciones (2Def)	2Def-NI	2Def-I



**Figura 4.1.** Esquema donde se ilustra la secuencia de aplicación de los tratamientos de inundación por 40 días y defoliación en plantas de *Lotus tenuis* y *Paspalum dilatatum*. Las flechas indican los momentos donde se realizó la defoliación.

#### *Porosidad, altura y biomasa*

La porosidad de las raíces se midió al final del experimento (día 40), utilizando técnicas picnométricas (Jensen *et al.*, 1969), como se describió en el capítulo 3. Se registró la altura de las plantas periódicamente para monitorear la capacidad de de-sumersión de las plantas defoliadas e inundadas, y el incremento marcado en altura esperado en las plantas sólo inundadas. La biomasa se cosechó al inicio del experimento (día 0 sobre 10 individuos adicionales), a la mitad del período de inundación (día 20) y al final del experimento (día 40). La cosecha del día 20 fue crucial para poner a prueba la hipótesis C.2 (menor crecimiento de plantas frecuentemente defoliadas bajo inundación por mayor remoción de hojas en plantas inundadas de mayor altura). La biomasa aérea se cosechó en dos estratos, por encima (> 4 cm) y por debajo del nivel de inundación (0-4 cm) y se la separó en los siguientes compartimentos: hojas, tallos y coronas para *L. tenuis*; láminas, vainas y raíces para *P. dilatatum*. Cabe mencionar que las plantas de *P. dilatatum* no poseían rizomas ni los desarrollaron durante el experimento. La biomasa cosechada se secó en estufa a 80° C por 72 horas y se pesó.

#### *Análisis de carbohidratos*

Se analizó el contenido de carbohidratos solubles y almidón en las estructuras de reserva de cada especie: coronas en *L. tenuis* y en vainas en *P. dilatatum*, al inicio del experimento, a los 20 y a los 40 días de iniciado el experimento. Se utilizó el procedimiento de anthrona descrito para el experimento correspondiente al capítulo 3 (Yemm y Willis, 1954).

### *Análisis estadístico*

La evolución de la altura de las plantas para cada especie se evaluó mediante un ANOVA de mediciones repetidas de dos vías, con defoliación e inundación como factores principales (Von Ende, 1993). Adicionalmente, se realizaron contrastes ortogonales para comparar la altura de la planta entre inundadas y no inundadas dentro de cada fecha y nivel de defoliación. La biomasa, los carbohidratos solubles y el almidón se analizaron mediante una ANOVA de dos vías para cada fecha de cosecha (días 0, 20 y 40). En el caso de haber interacción entre factores, se realizó posteriormente un test de Tukey para determinar el efecto de los tratamientos. La normalidad y homogeneidad de varianzas fueron previamente verificadas. Las variables que involucraron proporciones fueron transformadas ( $\arcsen\sqrt{x}$ ) antes de realizar los análisis. Los análisis se realizaron con el software estadístico InfoStat versión 2010 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Los resultados se presentan como valores promedio  $\pm$  el error estándar.

## **C.3 RESULTADOS**

### *Efectos de la inundación sobre la aireación del suelo*

La tasa de difusión de oxígeno (ODR) en el tratamiento control permaneció entre 72.4 y  $82.3 \times 10^{-8} \text{ g cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ , indicando una óptima oxigenación del suelo. En el suelo inundado, la tasa de difusión decreció rápidamente de  $78.3 \pm 3.7$  a  $4.5 \pm 1.1 \times 10^{-8} \text{ g cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$  durante los primeros 4 días, y permaneció cerca de cero hasta el final del experimento, indicando condiciones de anaerobiosis en el suelo.

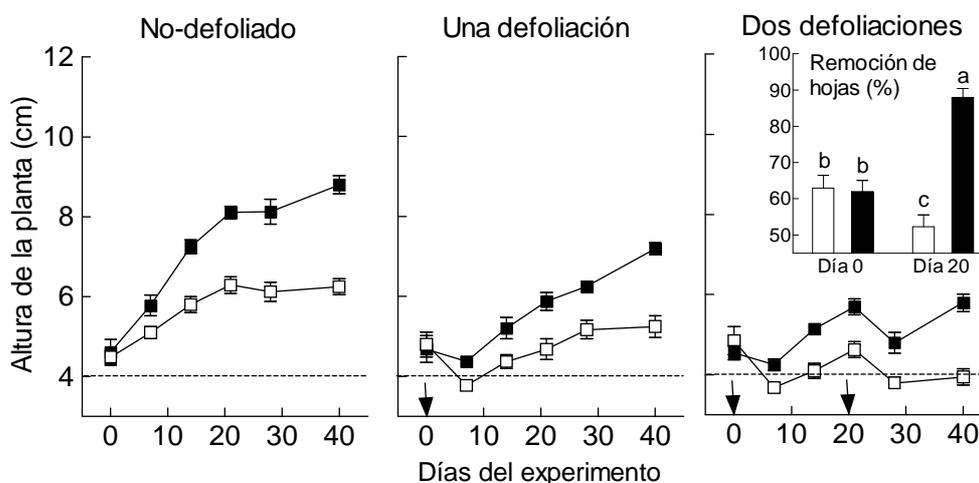
### *Porosidad de las raíces*

La porosidad constitutiva de las raíces tanto de *L. tenuis* como de *P. dilatatum* fue menor en las plantas no inundadas (13.4% y 21.1%, respectivamente) y mayor bajo condiciones de inundación cuando fueron medidas al final del experimento (31.8% y 45.9%;  $P < 0.001$ ). Tales respuestas de aumento en la porosidad radical son comunes en plantas tolerantes al anegamiento del suelo y se corresponden con la generación de tejido aerenquimático en las raíces (ver Capítulo 2).

### *Altura de las plantas y remoción de hojas*

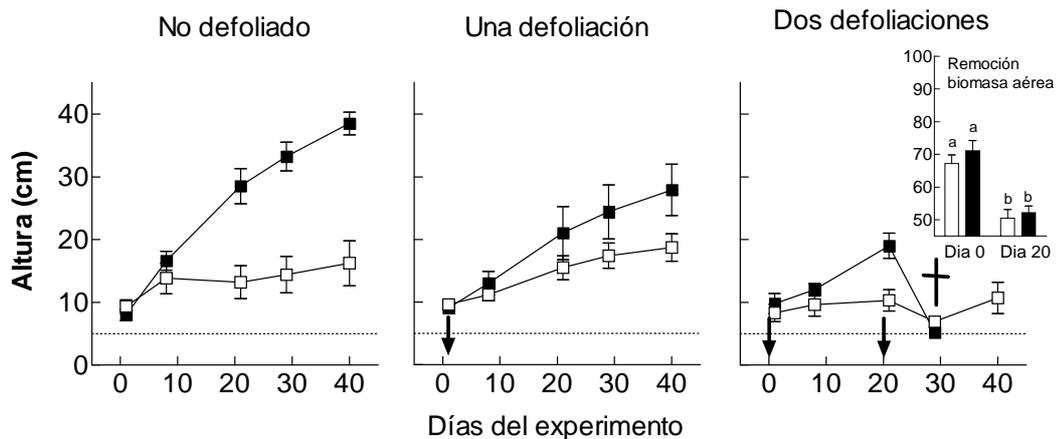
La altura inicial de las plantas de *L. tenuis* fue similar entre los diferentes tratamientos ( $P = 0.73$ ). Consecuentemente, la proporción de biomasa foliar removida por defoliación al día 0 fue la misma entre las plantas asignadas a ambos tratamientos (inundado y no inundado) ( $62 \pm 3.5\%$ ;  $P = 0.64$ ). Durante el curso del experimento, la altura de las plantas dependió de la combinación de los tratamientos de inundación y defoliación (rmAnova, inundación  $\times$  defoliación  $\times$  tiempo:  $P < 0.05$ , Figura 4.2). El incremento en la frecuencia de defoliación redujo la altura de las plantas, especialmente bajo condiciones de no inundación, mientras que la inundación incrementó la altura de las plantas (F  $\times$  D:  $P < 0.01$ ). Por lo tanto, para la misma frecuencia de defoliación, las plantas inundadas fueron siempre más altas que las no inundadas ( $P < 0.01$  en todos los casos, Figura 4.2).

Este incremento en la altura de las plantas bajo condiciones de inundación trajo aparejado una alta proporción de biomasa aérea por encima del nivel del agua, inclusive en aquellas plantas que fueron defoliadas al inicio (51.7–59.7%;  $F \times D$ :  $P < 0.01$ ; Figura 4.2). Como resultado, la segunda defoliación (día 20) provocó una mayor remoción de hojas en aquellas plantas inundadas que en las que no lo estuvieron ( $88.9 \pm 2.5\%$  vs.  $51.1 \pm 3.2\%$  de hojas removidas, respectivamente;  $P < 0.001$ ; ver inserto en Figura 4.2). Por esta razón, las plantas inundadas bajo tratamiento de alta frecuencia de defoliación (AF) comenzaron su período de recuperación luego del segundo evento de corte con mucho menos biomasa foliar remanente con respecto a aquellas plantas no inundadas (biomasa remanente de hojas del 10% en plantas inundadas bajo doble corte vs. ca. 48% en plantas no inundadas bajo doble corte).



**Figura 4.2.** Altura de las plantas de *Lotus tenuis* sujetas a tratamientos combinados de inundación y defoliación. □: No inundado; ■: Inundado. Las flechas indican cada evento de defoliación. La línea de puntos indica el nivel del agua (4 cm). El gráfico inserto muestra la proporción de biomasa de hoja removida por la defoliación (con respecto a la biomasa total de hojas de la planta) en el día 0 y 20 bajo condiciones de inundación y no inundación. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos (fecha e inundación). Los valores son promedio de seis repeticiones  $\pm$  el error estándar.

La altura de las plantas de *Paspalum* fue similar entre los tratamientos al inicio del experimento ( $P > 0.05$ ). La biomasa removida por efecto del corte inicial en las plantas sujetas a tratamientos de defoliación fue de  $67-71 \pm 3.1\%$  para ambos tratamientos de inundación ( $P > 0.05$ ; inserto Figura 4.3). El efecto de la inundación sobre la altura sólo se observó a partir de los 20 días de tratamiento en las plantas que no fueron defoliadas (inundación  $\times$  defoliación  $\times$  tiempo:  $P < 0.05$ ; Figura 4.3). La defoliación determinó que las plantas sean de menor altura que las nunca defoliadas, encontrándose diferencias significativas en la altura de las plantas inundadas vs. las no inundadas a lo largo del experimento cuando fueron defoliadas solo una vez ( $P = 0.009$ ; Figura 4.3). Como resultado, una segunda defoliación removió la misma cantidad de biomasa ( $50-52 \pm 2.6\%$ ) en plantas inundadas que en aquellas creciendo bajo condiciones control ( $P > 0.05$ ; inserto Figura 4.3). Sin embargo, con alta frecuencia de defoliación (corte al día 0 y 20), las plantas que estuvieron inundadas no sobrevivieron a la combinación de tratamientos y murieron, mientras que las no inundadas rebrotaron y continuaron la elongación de los macollos (Figura 4.3).



**Figura 4.3.** Altura de plantas de *Paspalum dilatatum* sujetas a tratamientos combinados de inundación y defoliación. □: No inundado; ■: Inundado. Las flechas indican cada evento de defoliación. † indica el momento de muerte de las plantas. La línea de puntos indica el nivel del agua (4 cm). El grafico inserto muestra la proporción de biomasa aérea removida por la defoliación (con respecto a la biomasa total aérea de la planta) en el día 0 y 20 bajo condiciones de inundación y no inundación. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos (fecha e inundación). Los valores son promedio de seis repeticiones  $\pm$  el error estándar.

#### *Efecto sobre la biomasa en Lotus tenuis*

En el tratamiento de suelo sin inundar, un evento de defoliación inicial (BF; Figura 4.4) no alteró la acumulación de biomasa en relación a aquellas plantas no defoliadas. Sin embargo, una alta frecuencia de defoliación (AF) afectó negativamente el crecimiento de las plantas reduciendo su biomasa final un 27.9% con respecto a las no defoliadas o aquellas defoliadas una vez (BF; Figura 4.4). Esta baja biomasa fue el resultado de una baja acumulación de biomasa en tallos y raíces (Figura 4.4). Por el contrario, en el tratamiento de inundación, la defoliación inicial fue suficiente para generar un efecto negativo sobre la acumulación de biomasa ya evidente al día 20 del experimento ( $F \times D$ :  $P < 0.05$ ; Figura 4.4). En esa fecha (día 20), la biomasa total de plantas defoliadas e inundadas fue 22.3% menor que en el resto de los tratamientos, como resultado de una menor biomasa de tallos y de coronas (ver panel izquierdo en Figura 4.4). Durante los siguientes 20 días, las plantas sometidas a una sola defoliación (BF; Figura 4.4) continuaron creciendo a una tasa que les permitió mantener las diferencias en biomasa generadas en los primeros 20 días con respecto a las plantas no inundadas (25.6% menor biomasa que las control al día 40, ver panel derecho en Figura 4.4).

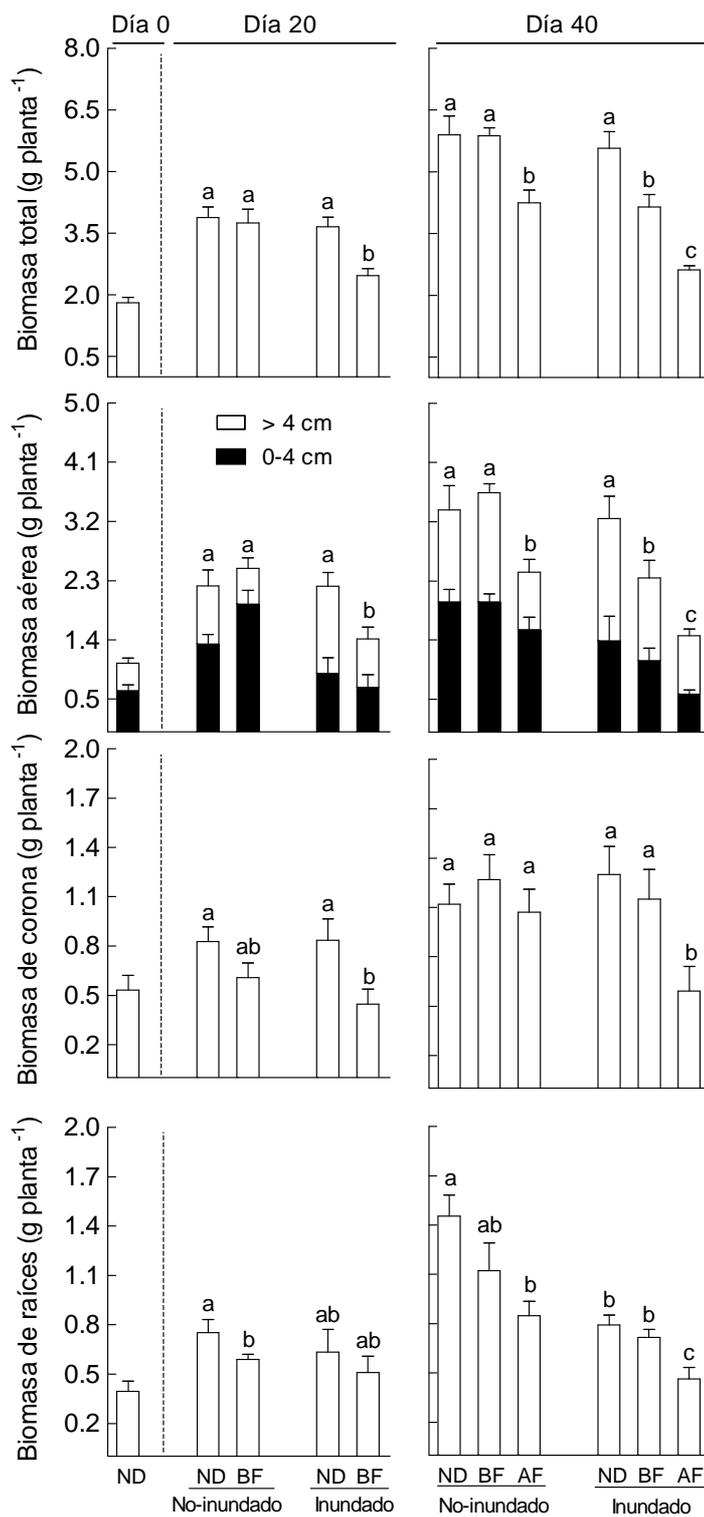
Bajo condiciones de inundación, una segunda defoliación intensificó el efecto negativo sobre el crecimiento de las plantas ( $F \times D$ :  $P < 0.05$ ; Figura 4.4). Por lo tanto, las plantas inundadas sujetas a alta frecuencia de defoliación (AF) registraron la menor acumulación de biomasa: 56.6% menos que las plantas no defoliadas ( $P < 0.05$ ; Figura 4.4). Esta respuesta fue producto de la reducida biomasa de tallos, coronas y raíces con una mínima tasa de crecimiento de cada compartimento a lo largo de todo el experimento (comparar día 0 vs. día 40 en la Figura 4.4). Estas respuestas coinciden con los que se esperaría encontrar en plantas con una mínima proporción de hojas remanentes (ca. 10% hojas remanentes, ver inserto en Figura 4.2) y con escasas reservas en sus coronas (Figura 4.4). Cabe destacar que, en ausencia de defoliación, la inundación no provocó reducciones significativas en la biomasa final de las plantas,

aunque la partición de biomasa cambió favoreciendo el crecimiento de la parte aérea en detrimento de las raíces, como una respuesta típica a la inundación (Figura 4.4).

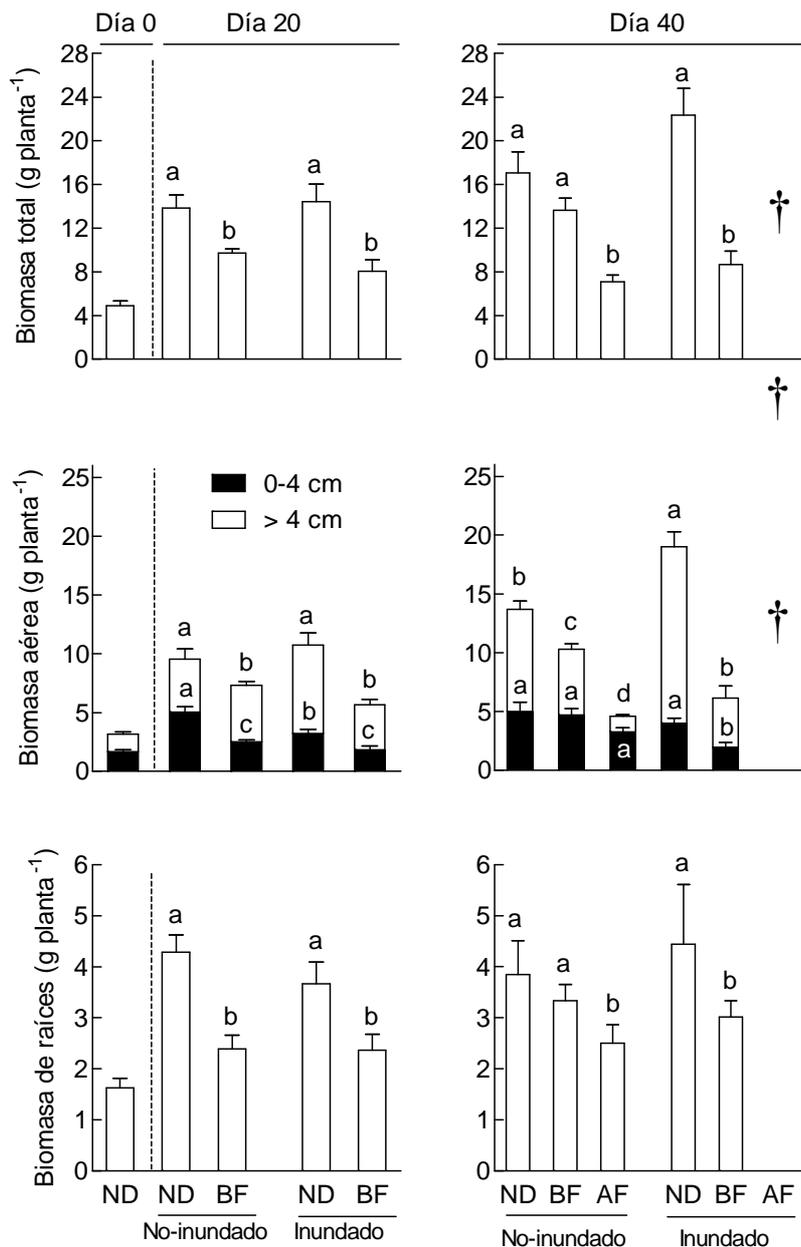
#### *Efecto sobre la biomasa en P. dilatatum*

Al día 20 de iniciado los tratamientos, hubo una reducción en la acumulación de biomasa total en aquellas plantas de *Paspalum* que fueron defoliadas al inicio del experimento (BF, día 0), tanto en las inundadas como en las no inundadas ( $P < 0.05$ ; Figura 4.5). Dicha reducción estuvo asociada a una baja acumulación de biomasa en macollos y en raíces. Durante los siguientes 20 días que duraron los tratamientos, las plantas que sólo fueron defoliadas una vez (BF) y que no estuvieron inundadas, se recuperaron logrando una acumulación de biomasa similar a las plantas control (ND; Figura 4.5). Por el contrario, aquellas plantas inundadas y defoliadas inicialmente (BF) no lograron equiparar la biomasa de los controles hacia el final del experimento (Figura 4.5) registrando una reducción del 55% de biomasa total, explicada por una menor biomasa principalmente de macollos y en menor medida de raíces.

Un segundo evento de defoliación al día 20 (AF), provocó una marcada reducción en la biomasa total, siendo el efecto más pronunciado en aquellas plantas inundadas, quienes no sobrevivieron a la doble defoliación bajo inundación ( $P < 0.05$ ; Figura 4.5). Al igual que lo observado para *Lotus*, una baja frecuencia de defoliación no afecta la acumulación de biomasa de la planta si no hay inundación (Figura 4.5). Sin embargo, cuando las plantas son inundadas y no son defoliadas (ND), tienden a acumular más biomasa aérea por encima de los 4 cm que aquellas no inundadas (Figura 4.5), aunque no se observó un cambio en la partición de biomasa en la planta hacia menor biomasa de raíces, como si sucedió en *Lotus* (Figura 4.4).



**Figura 4.4.** Biomasa de plantas de *Lotus tenuis* sujetas a una combinación de tratamientos de inundación y defoliación. Las cosechas se realizaron al comienzo (día 0), en el medio (día 20) y al final del experimento (día 40). La biomasa removida en cada momento fue sumada a su correspondiente fracción de tallo de la capa superior. Abreviaturas: ND, no defoliado; BF, baja frecuencia de defoliación (remoción solo al día 0); AF, alta frecuencia de defoliación (remoción al día 0 y al día 20). Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos dentro de cada fecha basadas en el test de Tukey. Los valores son el promedio de seis repeticiones  $\pm$  el error estándar.



**Figura 4.5.** Biomasa de plantas de *Paspalum dilatatum* sujetas a una combinación de tratamientos de inundación y defoliación. Las cosechas se realizaron al comienzo (día 0), en el medio (día 20) y al final del experimento (día 40). La biomasa removida en cada momento fue sumada a su correspondiente fracción de biomasa aérea de la capa superior. Abreviaturas: ND, no defoliado; BF, baja frecuencia de defoliación (remoción solo al día 0); AF, alta frecuencia de defoliación (remoción al día 0 y al día 20). Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos dentro de cada fecha basadas en el test de Tukey. † indica que las plantas de ese tratamiento estaban muertas al momento de determinar la biomasa. Los valores son el promedio de seis repeticiones  $\pm$  el error estándar.

### Número de tallos

Al comienzo del experimento, las plantas de *Lotus* asignadas a los diferentes tratamientos presentaron similar número de tallos ( $P > 0.72$ ; Cuadro 4.2). Luego de 20 días de experimento, la defoliación inicial incrementó el número de tallos un 20.4% en plantas crecidas bajo condiciones de no inundación; mientras que la inundación, ya sea

como un factor simple o combinado con defoliación, no modificó este parámetro (interacción F × D:  $P < 0.05$ ). Cuando este parámetro fue evaluado al final del experimento, las plantas sujetas a una alta frecuencia de defoliación sin inundación (AF; Cuadro 4.2) mostraron un incremento significativo en el número de tallos (28.6% más que las plantas no defoliadas;  $P = 0.035$ ), una respuesta que no se observó bajo condiciones de inundación (interacción F × D:  $P < 0.05$ ). Como resultado, en el escenario más estresante (una alta frecuencia de defoliación en suelo inundado), se observó el menor número de tallos por planta. Aquí, las plantas alcanzaron un número final de tallos que no difirió del observado para el día 0 ( $P = 0.24$ ).

**Cuadro 4.2.** Número de tallos de plantas de *Lotus tenuis* sujetas una combinación de tratamientos de inundación y defoliación al comienzo (día 0), a la mitad (día 20) y al final del experimento (día 40). Abreviaturas: ND, no defoliado; BF, baja frecuencia de defoliación (día 0); AF, alta frecuencia de defoliación (día 0 y 20).

Número de tallos (planta <sup>-1</sup> )	No inundado			Inundado		
	ND	BF	AF	ND	BF	AF
Día 0	31.4 ± 1.9 a	32.9 ± 2.2 a	32.0 ± 2.1 a	32.3 ± 2.2 a	32.1 ± 1.8 a	32.9 ± 1.8 a
Día 20	37.6 ± 2.2 b	44.9 ± 1.9 a	45.7 ± 2.1 a	35.6 ± 2.3 b	34.9 ± 2.0 b	34.7 ± 1.7 b
Día 40	42.9 ± 2.1 c	49.9 ± 2.7 b	55.2 ± 1.9 a	41.6 ± 1.9 c	38.6 ± 2.1 c	28.5 ± 3.0 d

Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos dentro de cada fecha, basadas en el test de Tukey. Los valores son el promedio de seis plantas ± el error estándar.

#### Número de macollos

El número de macollos no se afectó con el aumento en la frecuencia de defoliación en condiciones de controles no inundados, no respondiendo como típicamente podría preverse frente al corte ( $P > 0.05$ ; Cuadro 4.3). En condiciones de inundación, tanto en baja (BF) como en alta frecuencia (AF) de defoliación, el número de macollos se redujo significativamente ( $P < 0.05$ ; Cuadro 4.3). Interesantemente, la inundación como único factor de estrés (sin defoliación) no afectó el macollaje, de manera que las plantas solo inundadas tuvieron la misma cantidad de macollos que las plantas control (no inundadas ni defoliadas, Cuadro 4.3), tal como se podía esperar para una especie tolerante a la inundación como *P. dilatatum*.

**Cuadro 4.3.** Número de macollos de plantas de *Paspalum dilatatum* sujetas una combinación de tratamientos de inundación y defoliación al comienzo (día 0), a la mitad (día 20) y al final del experimento (día 40). Abreviaturas: ND, no defoliado; BF, baja frecuencia de defoliación (día 0); AF, alta frecuencia de defoliación (día 0 y 20).

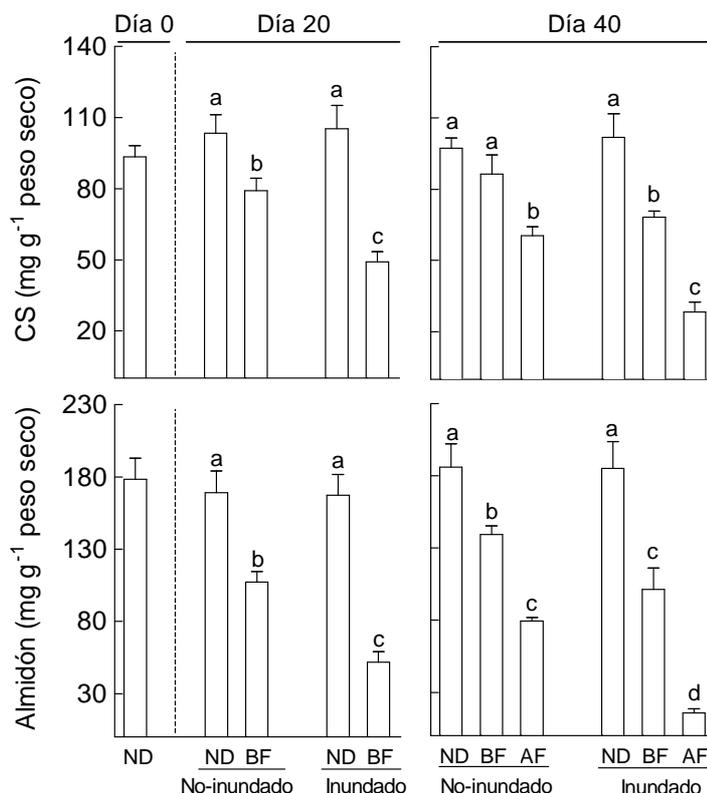
Número de macollos (planta <sup>-1</sup> )	No inundado			Inundado		
	ND	BF	AF	ND	BF	AF
Día 0	12.0 ± 1.8 a	10.2 ± 1.1 a	11.0 ± 1.3 a	12.5 ± 0.9 a	10.3 ± 1.0 a	10.2 ± 1.0 a
Día 20	16.0 ± 2.6 a	14.7 ± 0.8 a	13.5 ± 1.4 a	16.7 ± 1.6 a	10.0 ± 1.4 b	9.2 ± 1.4 b
Día 40	18.3 ± 2.9 a	16.0 ± 1.0 a	17.3 ± 2.4 a	15.7 ± 1.3 a	8.7 ± 1.0 b	†

Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos dentro de cada fecha, basadas en el test de Tukey. Los valores son el promedio de seis plantas ± error estándar. † indica que las plantas de ese tratamiento estaban muertas al momento de determinar el número de macollos.

### *Carbohidratos solubles y almidón en las coronas de Lotus tenuis*

En el tratamiento de suelo no inundado, la defoliación inicial determinó una reducción en los carbohidratos solubles y almidón de las coronas, ya evidente a los 20 días del experimento. En esa fecha, las plantas defoliadas mostraron una caída en las concentraciones de carbohidratos solubles y de almidón, equivalentes a un 23.4% y 35.5% menos que las no defoliadas, respectivamente. Cuarenta días después de la defoliación, las plantas que solo estuvieron sujetas a una defoliación (BF; Figura 4.6) recuperaron los niveles de carbohidratos solubles pero no los de almidón. En las plantas sujetas a una segunda defoliación (AF; Figura 4.6), el consumo de las reservas persistió de manera que las concentraciones finales de carbohidratos solubles y almidón fueron un 37.8% y 57.3% menores que en las plantas no defoliadas, respectivamente (Figura 4.6). Es importante destacar que, después de cada evento de defoliación, las plantas consumieron progresivamente sus reservas de almidón, pero nunca recuperaron sus niveles iniciales.

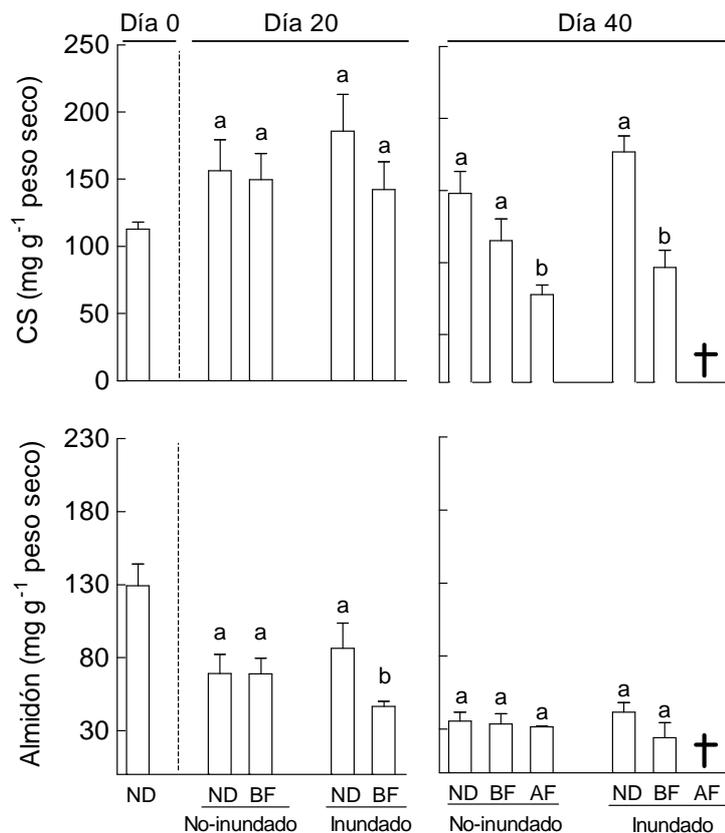
En el suelo inundado, el uso de las reservas de las plantas defoliadas fue significativamente mayor que en aquellas creciendo en suelo no inundado ( $F \times D$ :  $P < 0.05$ ; Figura 4.6). Al día 20, las plantas defoliadas crecidas bajo inundación tuvieron una menor concentración de carbohidratos solubles y almidón que las plantas no defoliadas (52.7% y 69.1%, respectivamente). Las plantas inundadas sujetas a un segundo evento de defoliación (AF; Figura 4.6) mostraron una drástica caída en las reservas de las coronas, tal como lo reflejaron las bajas concentraciones de carbohidratos solubles y almidón en la medición final. Consecuentemente, las plantas sujetas a una alta frecuencia de defoliación tuvieron una concentración de carbohidratos solubles un 72.2% menor y una concentración de almidón un 90.9% menor que las plantas no defoliadas (Figura 4.6). Cabe destacar que la inundación sin defoliación no provocó cambios en la concentración de carbohidratos solubles ni de almidón, en ninguno de los momentos en que se realizaron las mediciones, tal como era esperable para una especie tolerante a la inundación como *L. tenuis* (Figura 4.6).



**Figura 4.6.** Concentración de carbohidratos solubles y almidón en coronas de plantas de *Lotus tenuis* sujetas a tratamientos combinados de inundación y defoliación. Las mediciones se llevaron a cabo al comienzo (día 0), en el medio (día 20) y al final del experimento (día 40). Abreviaturas: ND, no defoliado; BF, baja frecuencia de defoliación (remoción solo al día 0); AF, alta frecuencia de defoliación (remoción al día 0 y al día 20). Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos dentro de cada fecha basadas en el test de Tukey. Los valores son el promedio de seis repeticiones  $\pm$  el error estándar.

#### *Carbohidratos solubles y almidón en vainas de Paspalum dilatatum*

A los 20 días de iniciados los tratamientos, no se detectaron efectos de la defoliación ni de la inundación sobre la concentración de los carbohidratos solubles (CS) presentes en las vainas. Por el contrario, la concentración de almidón disminuyó ( $P < 0.05$ ) en aquellas plantas inundadas que fueron defoliadas al día 0 (Figura 4.7). Hacia el final del experimento (día 40), se observó una caída significativa ( $P < 0.05$ ) en la concentración de carbohidratos solubles en aquellas plantas no inundadas con alta frecuencia de defoliación, mientras que en las inundadas hubo una reducción de ca. el 50% en las plantas con una sola defoliación. Si bien los niveles de almidón no se mantuvieron hacia el final del experimento, no hubo un efecto significativo de los tratamientos ( $P > 0.05$ ; Figura 4.7). En las plantas inundadas y sujetas a dos defoliaciones no se determinó la concentración de carbohidratos solubles ni almidón, dado que no sobrevivieron hasta el final del experimento. Aquí, al igual que en *Lotus*, la inundación en ausencia de defoliación no provocó cambios en las concentraciones de los carbohidratos solubles como así tampoco en los niveles de almidón (Figura 4.7).



**Figura 4.7.** Concentración de carbohidratos solubles (CS) y almidón en vainas de plantas de *Paspalum dilatatum*, sujetas a tratamientos de inundación y defoliación durante 40 días. Las mediciones se realizaron al comienzo (día 0), en el medio (día 20) y al final del experimento (día 40). Abreviaturas: ND, no defoliado; BF, baja frecuencia de defoliación (remoción solo al día 0); AF, alta frecuencia de defoliación (remoción al día 0 y al día 20). † indica que las plantas estaban muertas al momento de tomar las muestras. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos dentro de cada fecha basadas en el test de Tukey. Los valores corresponden al promedio de seis repeticiones  $\pm$  el error estándar.

#### C.4 DISCUSIÓN

*El rebrote de las plantas está condicionado por los eventos repetidos de defoliación bajo condiciones de inundación*

Este capítulo aporta evidencias novedosas que indican la existencia de una relación de compromiso entre incrementar la altura – lo que le permite a las plantas emerger del agua – versus reducir la parte aérea expuesta a los herbívoros para minimizar así los efectos de subsecuentes defoliaciones. Bajo condiciones de inundación, el incremento en la altura de las plantas les permite exponer más hojas sobre el nivel del agua (ver Striker *et al.*, 2005; 2008; Colmer y Voesenek, 2009 y referencias allí citadas). En cambio, cuando las plantas son defoliadas bajo condiciones de no inundación, una baja proporción de hojas están localizadas sobre el nivel de corte, como resultado de la reducida altura y número de tallos que la planta alcanza, dos respuestas asociadas a

evadir el pastoreo (McNaughton, 1983; Briske y Richards, 1995; Lemaire y Chapman, 1996; Zheng *et al.*, 2011). Cuando estos dos factores fueron combinados en la leguminosa *Lotus tenuis*, prevaleció la respuesta inducida por la inundación; y la de-sumersión de los tallos (aumento de altura de las plantas) continuó a expensas del consumo de reservas de las coronas sin aumentar el número de tallos (Figuras 4.2 y 4.6). Como consecuencia, debido a que las plantas inundadas fueron más altas, la mayoría de las hojas fueron removidas por el segundo evento de defoliación (Inserto Figura 4.2). De este modo, cuando la frecuencia de defoliación se incrementó, el rebrote de las plantas de *Lotus* bajo condiciones de inundación estuvo limitado tanto en términos de acumulación de biomasa (Figura 4.3) como en la aparición de nuevos tallos (Cuadro 4.2). Hasta el momento, este es el primer antecedente que demuestra dicha relación de compromiso en una leguminosa, que utiliza las reservas de las coronas para el rebrote. Esta idea había sido establecida previamente sólo para especies gramíneas con rebrote dependiente de la asimilación actual, y sujetas a un único evento de defoliación bajo inundación (ver Oosterheld y McNaughton, 1991 para *Echinochloa haplocada*, *Hypertelia dissoluta* y *Panicum coloratum*; Merrill y Colberg, 2003 para *Deschampsia caespitose*; Hayball y Pearce, 2004 para *Bolboschoenus caldwelii* y Striker *et al.*, 2008 para *Paspalum dilatatum*).

Por su parte, las plantas de *Paspalum dilatatum* no lograron incrementar su altura, ni su número de macollos, ni acumular biomasa en condiciones de defoliación reiterada combinada con inundación (Figura 4.3; ver también Figura 5.2), de manera similar a lo observado para esta misma especie en condiciones de sumersión completa (sin defoliación) ya discutido en el Capítulo 3 de esta tesis. En ambos casos, la sumersión completa de las plantas, ya sea por una alta frecuencia de corte o por una inundación intensa, determinó la muerte de los individuos sin rebrote posterior. En esta especie dicho resultado fue el producto de efectos propios de estrés marcado para las plantas y no de una estrategia de quiescencia como la descrita en el Capítulo 3 para *L. tenuis* bajo sumersión completa (ver también Manzur *et al.*, 2009). Bajo condiciones de no inundación la defoliación no afectó la generación de nuevos macollos (comparar días 0, 20 y 40 en Cuadro 4.2) pero tampoco promovió el macollaje, una respuesta común al pastoreo (Deregibus *et al.*, 1983; Skalová y Krahulec, 1992; Kebrom *et al.*, 2010). Esta falta de respuesta al corte podría estar relacionada con una dificultad en la llegada de la señal lumínica – alta relación de luz roja:rojo lejano (R:RL) – a la base de las plantas que desencadena el macollaje (Casal *et al.*, 1990; Gibson *et al.*, 1992). Tal dificultad en la percepción de la señal de R:RL pudo deberse a la morfología inicial de las plantas, ya que presentaban macollos grandes de porte relativamente erectos y ‘apretados’ en la base de las plantas. Por otro lado, es importante remarcar que en el tratamiento de defoliación única inicial sobre plantas creciendo en suelo inundado se registraron resultados similares a los registrados previamente por Striker *et al.*, (2008) para esta gramínea en cuanto a la dificultad para emerger fuera del agua y a la consecuente caída en la acumulación de biomasa (aérea y radical) de las plantas. A pesar de ello, se debe notar que *P. dilatatum* es capaz de tolerar un evento de defoliación bajo anegamiento (Loreti *et al.*, 1994; Striker *et al.*, 2008).

En todos los tratamientos de defoliación, la continua emergencia del agua de los tallos de *Lotus* le permitió a sus plantas restablecer rápidamente el contacto con el oxígeno atmosférico (Laan *et al.*, 1990; Grimoldi *et al.*, 1999; Striker *et al.*, 2005; Bailey-Serres y Voesenek, 2008; Colmer y Voesenek, 2009), permitiéndole capturar y (presumiblemente) transportar el oxígeno desde la parte aérea hacia las raíces de alta porosidad (*i.e.* alto porcentaje de tejido aerenquimático) a través de difusión pasiva (Colmer, 2003a). Esta respuesta de de-sumersión de los tallos, que es una respuesta

relevante en determinar la tolerancia a la inundación en plantas que han sido defoliadas una sola vez (ver Striker *et al.*, 2008 para *L. tenuis*), tuvo un impacto muy negativo en las plantas de *Lotus* sujetas a una alta frecuencia de defoliación (Figura 4.4). En esta situación, la fotosíntesis aérea a nivel de planta pareció limitar el rebrote de las plantas bajo condiciones de inundación y doble defoliación, ya que las plantas tuvieron una mínima biomasa residual de hojas (10% del peso seco) después del segundo evento de defoliación, que además estaban completamente sumergidas. Además, es conocido que el rebrote de *L. tenuis* luego de una defoliación se circunscribe principalmente a las yemas axilares de los tallos más viejos (Smith, 1962). Por consiguiente, plantas con una pequeña cantidad de biomasa foliar rebrotando (la mayoría sumergidas) desde las yemas basales, parecieran haber sido incapaces de capturar el dióxido de carbono y el oxígeno suficientes para sostener una tasa fotosintética y un metabolismo aeróbico que favorezca la refoliación rápida luego del corte (Kozlowski y Pallardy, 1984). Por ello, el uso intensivo de las reservas (que se discute en la siguiente sección) pareció ser la principal fuente de carbono para iniciar el proceso de refoliación y de-sumersión de los tallos luego de cada defoliación (Figura 4.6). En esta especie, la fuente alternativa de provisión de energía bajo sumersión completa, que es la fotosíntesis subacuática (Mommer y Visser, 2005; Pedersen y Colmer, 2008), parece no tener mayor relevancia. Esta idea se basa en la reducida biomasa residual de hojas sumergidas en las plantas sujetas a una alta frecuencia de defoliación y en el acelerado amarillamiento de las hojas sumergidas (probablemente mediado por etileno, Jackson, 2008), registrado en el capítulo anterior.

La acumulación de biomasa en las plantas de *P. dilatatum* disminuyó como consecuencia de la defoliación, tanto en plantas inundadas como en las no inundadas, efecto que se pudo observar ya a los 20 días de transcurridos los tratamientos (Figura 4.5, paneles izquierdos). Al día 40, aquellas plantas defoliadas que no estuvieron inundadas recuperaron su biomasa a valores similares al control no defoliado probablemente asociado a la generación de nuevos macollos (Cuadro 4.3). Esta alta capacidad de recuperación de *Paspalum* frente a una defoliación única, cuando se le otorga un tiempo de descanso superior al mes de duración y bajo óptimas condiciones de drenaje del suelo, es coincidente con lo previamente reportado para esta gramínea por Loreti *et al.*, (1994), Loreti y Oesterheld, (1996) y por Striker *et al.*, (2008). Sin embargo, cuando la defoliación inicial se realizó en suelo inundado, las plantas registraron una reducción en la biomasa final equivalente al 50% de los controles (Figura 4.5), la cuál casi duplica la caída en biomasa informada para esta especie en un trabajo previo (25-30% menor biomasa; Striker *et al.*, 2008). Dicha menor biomasa final estaría explicada en este experimento por la muerte de macollos resultante del estrés combinado por corte e inundación (ver reducción temporal de esta variable bajo este tratamiento en Cuadro 4.3), una respuesta que difiere de lo reportado en el citado trabajo y que estaría relacionada con la mayor duración del período de estrés por inundación en el presente experimento (40 días vs. 15 días de inundación en Striker *et al.*, 2008). Más aún, un segundo evento de defoliación en las plantas inundadas fue crucial y suficiente para generar la senescencia y muerte de los macollos remanentes de la primera defoliación, dado que las plantas no tenían rizomas (potenciales estructuras de reservas de carbohidratos) y se quedaron sin biomasa aérea emergente capaz de fijar carbono atmosférico por fotosíntesis. Como resultado, las plantas sujetas a alta frecuencia de defoliación e inundadas por 40 días no lograron sobrevivir. Este hecho debiera ser tenido en cuenta para el manejo del pastoreo del pastizal inundado, ya que puede trasladarse a una disminución de la población de plantas de esta especie, que es deseable como forrajera en el pastizal (Quinos *et al.*, 1998; Couso *et al.*, 2010), tal como se discute en la última sección de la discusión de este Capítulo.

Cabe destacar que *L. tenuis* responde diferente a la sumersión completa si ésta es debida a un aumento en la profundidad del agua (*i.e.* alta intensidad de inundación, Capítulo 3 de esta tesis) o si es causada por defoliación (como los resultados que aquí se muestran). Las plantas completamente sumergidas como resultado de un aumento en la profundidad del agua, adoptan una estrategia de quiescencia (sin crecimiento del tallo) (Manzur *et al.*, 2009), mientras que las plantas sumergidas debido a la defoliación muestran una respuesta de escape a la sumersión (como los resultados que aquí se muestran), similar a la estrategia desarrollada por plantas que crecen bajo sumersión parcial (Manzur *et al.*, 2009). Existen dos razones, no mutuamente excluyentes, que permitirían explicar esta respuesta diferencial: (i) las señales del ambiente y la energía necesaria disponible para sostener la elongación de los tallos y (ii) los cambios hormonales que pueden ocurrir en respuesta a la combinación de inundación-defoliación. Primero, es esperable que el ambiente sea más estresante para el crecimiento de la planta con niveles elevados de agua (*i.e.* plantas sumergidas a más de 20 cm) que a niveles superficiales (*i.e.* plantas sumergidas a causa de una defoliación a una profundidad de 4 cm). Esto se debe a que en niveles muy profundos de agua, la disponibilidad de luz (y en menor grado la disponibilidad de oxígeno disuelto) es significativamente menor (Jackson y Ram, 2003). Así, podría esperarse que el escape de la planta mediante la elongación de los tallos ocurra más fácilmente en condiciones de poca profundidad de agua (Colmer y Voesenek, 2009). Segundo, la defoliación podría elevar los niveles de giberelinas bioactivas (ver Morvan-Bertrand *et al.*, 2001) que, en combinación con una caída en los niveles endógenos de ácido abscísico debido a la acumulación de etileno en los tejidos sumergidos (Visser y Voesenek, 2004; Jackson, 2008; Chen *et al.*, 2010), podrían promover la elongación de los tallos. Estas hipótesis merecen futuras investigaciones, dado que pueden revelar los mecanismos involucrados en las respuestas de escape de las plantas inundadas y defoliadas por acción del pastoreo.

#### *Reservas de carbohidratos y rebrote de las plantas bajo condiciones de inundación y defoliación*

En condiciones de no inundación y con baja frecuencia de defoliación, *L. tenuis* fue capaz de recuperar su producción de biomasa hasta el final del experimento usando los carbohidratos solubles y el almidón almacenado en las coronas (Figuras 4.3 y 4.4), resultado que coincide con trabajos anteriores (Smith, 1962; Kallenbach *et al.*, 2001; Striker *et al.*, 2008). Este resultado indica que el uso de las reservas de carbono de las coronas le permitió a las plantas compensar la pérdida de las hojas por la defoliación como se vio en *Medicago sativa* cv. Lodi con baja frecuencia de defoliación (45 días entre defoliaciones; Avice *et al.*, 1997). Por el contrario, en el tratamiento de alta frecuencia de defoliación, las plantas no fueron capaces de mantener su acumulación de biomasa a pesar del uso persistente de las reservas de las coronas. En este caso, la biomasa remanente de hojas luego de la segunda defoliación (inserto en la Figura 4.2) no fue suficiente para compensar los dos eventos de defoliación durante los 40 días. El segundo evento de defoliación, hecho sobre plantas que estuvieron más postradas (Figura 4.2) y con una mayor proporción de biomasa aérea debajo de la línea de corte, provocó la remoción de las hojas jóvenes (en los estratos superiores del canopeo), mientras que la biomasa de hojas remanentes estuvo compuesta principalmente por hojas más viejas y con menor potencial fotosintético para el rebrote (ver Boller y Nösberger, 1985; Lemaire *et al.*, 2009). Por lo tanto, la acumulación de biomasa

decreció ligeramente bajo alta frecuencia de defoliación, aun bajo condiciones de no inundación (Figura 4.4). En todos los casos, debe destacarse que tanto las plantas defoliadas una vez como aquellas defoliadas dos veces, no pudieron recuperar totalmente sus niveles de almidón (*i.e.* periodos de descanso de 40 y 20 días, respectivamente). Estos resultados están en línea con las características conocidas sobre la dinámica estacional de las reservas de corona de *Lotus*, que luego del rebrote primaveral y cuando está sujeta a pastoreo, mantiene bajos los niveles de carbohidratos en coronas durante la estación de crecimiento hasta que vuelve a recuperarlos hacia fines del otoño siguiente (Smith, 1962; Li *et al.*, 1996).

En el caso de *Paspalum*, la inundación *per se* no determinó una reducción en la concentración de carbohidratos solubles (CS) ni de almidón, lo cual indica su tolerancia al anegamiento, en términos de biomasa y fijación de carbono, probada en experimentos anteriores sobre individuos procedentes de poblaciones del mismo sitio y bajo similar duración del período de exceso hídrico (30-45 días; Insausti *et al.*, 2001; Mollard *et al.*, 2008; 2010). Sin embargo, las plantas sí utilizaron las reservas de carbohidratos en vainas foliares (tendencia en CS y reducción en concentración de almidón) para sostener su metabolismo cuando fueron inicialmente defoliadas en combinación con inundación (Figura 4.7). Esta respuesta estaría relacionada con la reducción del abastecimiento de carbono por fotosíntesis (McNaughton, 1983; Oosterheld y McNaughton, 1991; Oosterheld, 1992; Agnusdei, 1999) como consecuencia de la pérdida del 50-55% del área foliar producto del tratamiento de corte (Inserto en Figura 4.3). De manera similar, es decir una reducción en la concentración de carbohidratos de reserva en hojas, fue observada en trabajos recientes en la gramínea *C<sub>4</sub> Hemarthria altissima* sujeta a estrés de carbono, no por corte sino por sombreado de las plantas combinado con inundación del suelo (Luo *et al.*, 2009; 2011). Además, cabe recordar que cuando las plantas de *Paspalum* fueron sometidas a una segunda defoliación en presencia de inundación y que además no tuvieron ni generaron estructuras de almacenamiento de reservas de carbono (rizomas), no pudieron sobrevivir por más de 20 días. En este sentido, la supervivencia que pudieron haber desarrollado plantas de *P. dilatatum* con rizomas bien provistos de reservas de carbohidratos no puede ser respondida por los resultados de este experimento. Sin embargo, se podría especular que los resultados no serían necesariamente demasiado distintos a los obtenidos si se tiene en cuenta que *P. dilatatum* presenta una alta dependencia de fotosíntesis actual del área foliar remanente para sostener el rebrote luego de cada corte (Lattanzi *et al.*, 2005); y que los rizomas serían más importantes en proveer carbohidratos y nitrógeno para sostener el primer rebrote de la estación de crecimiento (a la salida del invierno) y menos importantes para la refoliación luego de eventos de defoliación (ver Kavanová y Gloser, 2005 para la gramínea rizomatosa *Calamagrostis epigejos*).

La respuesta de *L. tenuis* ante las reiteradas remociones de hojas (*i.e.* alta frecuencia de defoliación) que derivó en ciclos de sumersión/de-sumersión de las plantas involucró un intenso estrés para esta especie. En este caso, la ganancia de biomasa fue mínima (*cf.* día 0 vs. día 40 en Figura 4.3), y la elongación de los tallos estuvo destinada principalmente a la supervivencia. Los resultados que aquí se presentan sugieren que la energía usada por las plantas para sostener la respiración y la elongación de los tallos bajo este tratamiento se obtuvo del consumo de las reservas de carbohidratos solubles y almidón presentes en las coronas (Figura 4.6), tal como se vio en las raíces de plantas sumergidas (no defoliadas) de *Rumex crispus* (Laan y Bloom, 1990) y en los tallos de plantas de *Oryza sativa* (Ram *et al.*, 2002). Estas respuestas no han sido reportadas previamente para una leguminosa forrajera capaz de tolerar largos períodos de inundación como *L. tenuis*. Los resultados también demuestran que la

privación extrema de carbono atribuible a la repetida defoliación bajo inundación, lleva a las plantas a utilizar más reservas que las esperadas simplemente por la adición de cada uno de los factores (Figura 4.2; Interacción F x D:  $P < 0.05$ ). Curiosamente, cabe señalar que la inundación *per se* no indujo a las plantas a utilizar sus reservas, sugiriendo que este factor no provoca un estrés importante para esta especie tolerante a la inundación, tal como se corrobora con la biomasa de las plantas y el número de tallos (Figura 4.3 y Cuadro 4.2; ver también Striker *et al.*, 2005, 2008). Por lo tanto, la defoliación repetida pareciera provocar una deprivación importante de carbono cuando la planta está sumergida (Figura 4.2), obligándola a consumir sus reservas de carbohidratos y almidón de sus coronas, tal como lo reveló la caída de las reservas luego de cada evento de defoliación (Figura 4.4). La capacidad de *L. tenuis* de usar las reservas almacenadas en situaciones extremas (cuando la ganancia de carbono por fotosíntesis es despreciable) ya se demostró en el Capítulo 3 de esta tesis, para plantas creciendo bajo sumersión completa por 30 días. Además de las reservas de carbono analizadas en este Capítulo, se sabe que las reservas de nitrógeno también tienen un rol importante en el rebrote de las leguminosas (Avicé *et al.*, 1996; Meuriot *et al.*, 2004). Por consiguiente, la dinámica del uso de reservas de nitrógeno en plantas sometidas a estrés combinado de inundación y defoliación sería un tema interesante para ser explorado en futuras investigaciones.

#### *Consideraciones para el manejo del pastoreo sobre Lotus tenuis y Paspalum dilatatum en áreas de pastizal sujetas a inundaciones*

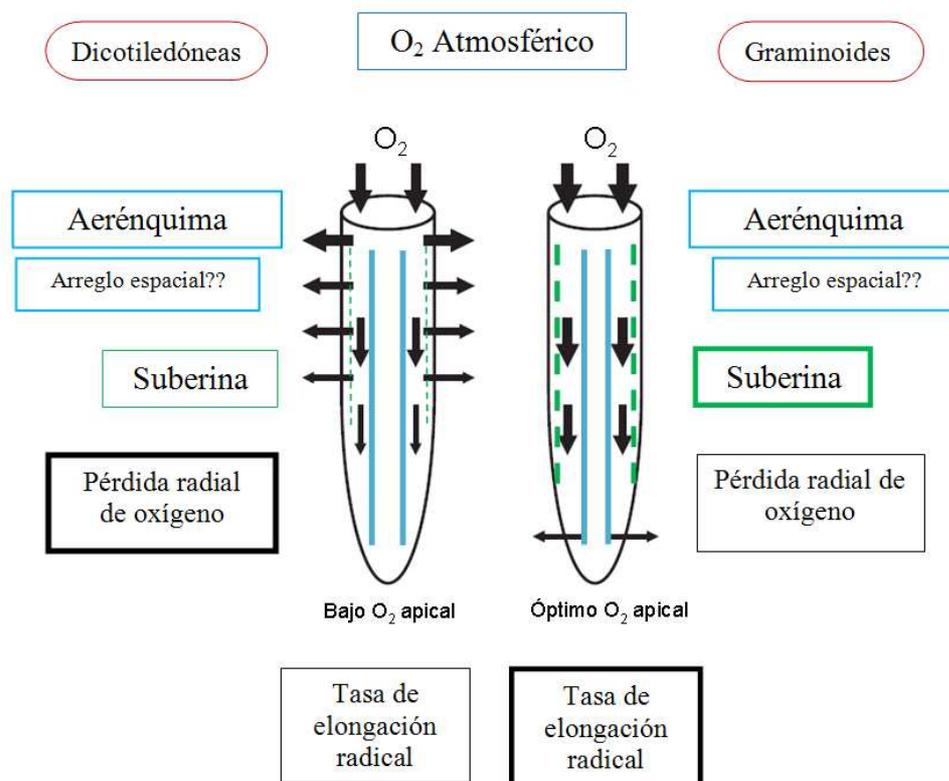
Los resultados obtenidos en este capítulo proveen información significativa en términos de la ecofisiología y el manejo de estas especies forrajeras. La estrategia óptima de pastoreo dependería del régimen de inundación del ambiente específico en que *L. tenuis* y *P. dilatatum* forman parte del recurso forrajero. En áreas que raramente se inundan, *Lotus* pareciera ser capaz de tolerar frecuentes defoliaciones razonablemente bien, disminuyendo su altura e incrementando el número de tallos, dos respuestas típicas al pastoreo. Por el contrario, en áreas más bajas, donde las plantas periódicamente se enfrentan a eventos de inundación, los resultados que aquí se muestran, sugieren que la defoliación podría estar limitando el crecimiento de las plantas durante/después de la inundación y que es necesario un período más extenso para que las plantas recuperen sus reservas. En el caso de *Paspalum* y según los resultados aquí encontrados, sería capaz de tolerar sólo un evento de defoliación en presencia de inundación. Sin embargo, en un escenario de defoliaciones frecuentes, si las plantas de esta gramínea son jóvenes y aún no han desarrollado rizomas, un segundo evento de defoliación bajo estas condiciones, condicionaría la supervivencia de las plantas en el pastizal, según los resultados encontrados en esta tesis. Por lo tanto, y al igual que en *Lotus*, sería prudente extender el período de descanso entre defoliaciones en el caso de haber inundaciones más prolongadas. Consecuentemente, estos resultados que describen el efecto a corto plazo de la alta frecuencia de defoliación bajo condiciones de inundación deberían tenerse en cuenta para el manejo de los regímenes de pastoreo ya que pueden tener efectos de largo plazo sobre la productividad y la persistencia de estas especies forrajeras deseables en los pastizales anegables de la Pampa Deprimida. Cabe destacar también que los resultados de este capítulo experimental están limitados a estas dos especies y que para planificar el manejo de los recursos forrajeros de todo el pastizal es necesario tener en cuenta los demás factores que afectan su funcionamiento y la interacción con las demás especies que allí habitan.

## **DISCUSIÓN GENERAL**

Esta tesis tuvo tres objetivos principales que sirvieron de guía a cada uno de los capítulos experimentales. El primer objetivo fue estudiar el crecimiento de raíces, en términos de longitud, en medio anaeróbico de especies graminoides (*Paspalidium geminatum* y *Cyperus eragrostis*) y dicotiledóneas (*Lotus tenuis* y *Rumex crispus*) herbáceas de pastizal con relación a su capacidad de generar aerénquima, la pérdida radial de oxígeno, y las características de las capas externas de la corteza (*i.e.* deposición de suberina). Los resultados obtenidos apoyaron las hipótesis planteadas para todas las especies estudiadas, mediante las cuales se propuso que (i) ante aumentos en la proporción de tejido aerénquimático, las especies graminoides aquí estudiadas mantienen su tasa de elongación en sus raíces adventicias bajo condiciones anaeróbicas de crecimiento, mientras que en las especies dicotiledóneas se reduce. Esto se debe a la menor pérdida radial de oxígeno (ROL) que tienen las graminoides con respecto a las dicotiledóneas; y que (ii) las especies capaces de mantener su tasa de elongación radical bajo condiciones anaeróbicas de crecimiento (las graminoides) son aquellas que tienen mayor deposición de suberina en la exodermis, y por lo tanto, limitan la pérdida radial de oxígeno hacia la rizósfera [Capítulo experimental 2]. El segundo objetivo de la tesis fue estudiar las estrategias de crecimiento (elongación *vs.* quiescencia) que pueden presentar plantas de una misma especie frente a intensidades crecientes de inundación (desde suelo saturado hasta la sumersión completa de las plantas. Para ello se utilizaron dos especies conspicuas forrajeras del pastizal: la gramínea *Paspalum dilatatum* y la dicotiledónea leguminosa *L. tenuis*. La hipótesis planteada propuso que plantas de una misma especie son capaces de cambiar su estrategia de crecimiento dependiendo de la intensidad de inundación (*i.e.* grado de sumersión de la planta). Se postuló que frente a estrés por sumersión parcial las plantas crecen elongando activamente sus tallos (vainas y láminas en gramíneas) con un mínimo uso de carbohidratos de reservas, mientras que bajo sumersión completa permanecen quiescentes, sin acumular biomasa ni generar nuevos tallos, sobreviviendo a expensas del consumo intenso de los carbohidratos de reserva. Los resultados a los que se arribó sustentan la hipótesis planteada sólo para *Lotus tenuis* y no así para *P. dilatatum*, quien no sobrevivió a la sumersión completa y siempre intentó utilizar la estrategia de elongación para emerger del agua. El tercer objetivo de la tesis fue examinar los efectos del aumento en la frecuencia de defoliación sobre la morfología, acumulación de biomasa y uso de carbohidratos de reservas de plantas de *L. tenuis* y *P. dilatatum* durante un período de inundación. Aquí, los resultados obtenidos apoyan las hipótesis, mediante la cual se argumentó que el aumento en la frecuencia de defoliación en plantas inundadas (de mayor altura) genera un marcado compromiso en su crecimiento debido a la mayor remoción de los tejidos aéreos. En tales condiciones, se afecta marcadamente el rebrote de las plantas defoliadas e inundadas. En el caso de *L. tenuis* el compromiso fue menor que en el caso de la gramínea *P. dilatatum*, la que no sobrevivió a los eventos de defoliación sucesiva bajo suelo inundado, por lo que se comprometió su supervivencia.

A continuación se comentan brevemente los principales resultados obtenidos, presentando para ello dos esquemas que ilustran las principales respuestas encontradas en los experimentos realizados. Luego se presentan los aportes originales derivados de esta tesis y finalmente una sección en la cual se formulan nuevos interrogantes que surgen a partir de esta tesis. Cabe destacar en este punto que las conclusiones obtenidas a partir del estudio de las especies aquí utilizadas no son extrapolables de una manera directa a lo que podría observarse en la población del pastizal en su conjunto. El alcance de los resultados es limitado y debe ser tenido en cuenta para el futuro manejo del pastizal como recurso forrajero.

La figura 5.1 resume gráficamente los principales resultados obtenidos en el Capítulo 2 de la tesis. Allí se encontró que la tasa de elongación de las raíces bajo condiciones de inundación difirió entre las especies gramíneas y dicotiledóneas estudiadas. El esquema propone que las especies gramíneas logran mantener la tasa de elongación de las raíces adventicias y que en las dicotiledóneas la tasa de elongación disminuye. Esto estaría relacionado con que las gramíneas poseen una menor pérdida radial de oxígeno (ROL) con respecto a las dicotiledóneas y, en consecuencia, tienen una conducción longitudinal del oxígeno más eficiente, logrando (presumiblemente) una mayor disponibilidad de oxígeno en el ápice de las raíces. A su vez, dicho menor ROL estaría asociado en las gramíneas con una mayor proporción de suberina en las capas externas de la corteza radical con respecto a las dicotiledóneas, funcionando como una barrera física a la pérdida radial de oxígeno desde las raíces hacia la rizósfera. Las dicotiledóneas presentarían una baja proporción de suberina en la corteza externa a lo largo de toda la raíz y por lo tanto presentarían una pérdida de oxígeno (ROL) significativa desde la base hacia el ápice de las raíces, a los que le llegaría poco oxígeno. En las gramíneas la pérdida de oxígeno sólo sería de magnitud considerable en el ápice, manteniendo una rizósfera oxidada alrededor de dicho meristema sensible a iones potencialmente tóxicos. En ningún caso se propone en este esquema que la generación de aerénquima es un limitante para la conducción de oxígeno, ya que todas las especies (gramíneas y dicotiledóneas) generaron alta proporción de aerénquima en sus raíces. Resta aún dilucidar qué papel puede tener el diferente arreglo espacial del aerénquima entre las especies con distinta topología (ver sección de nuevos interrogantes más adelante).



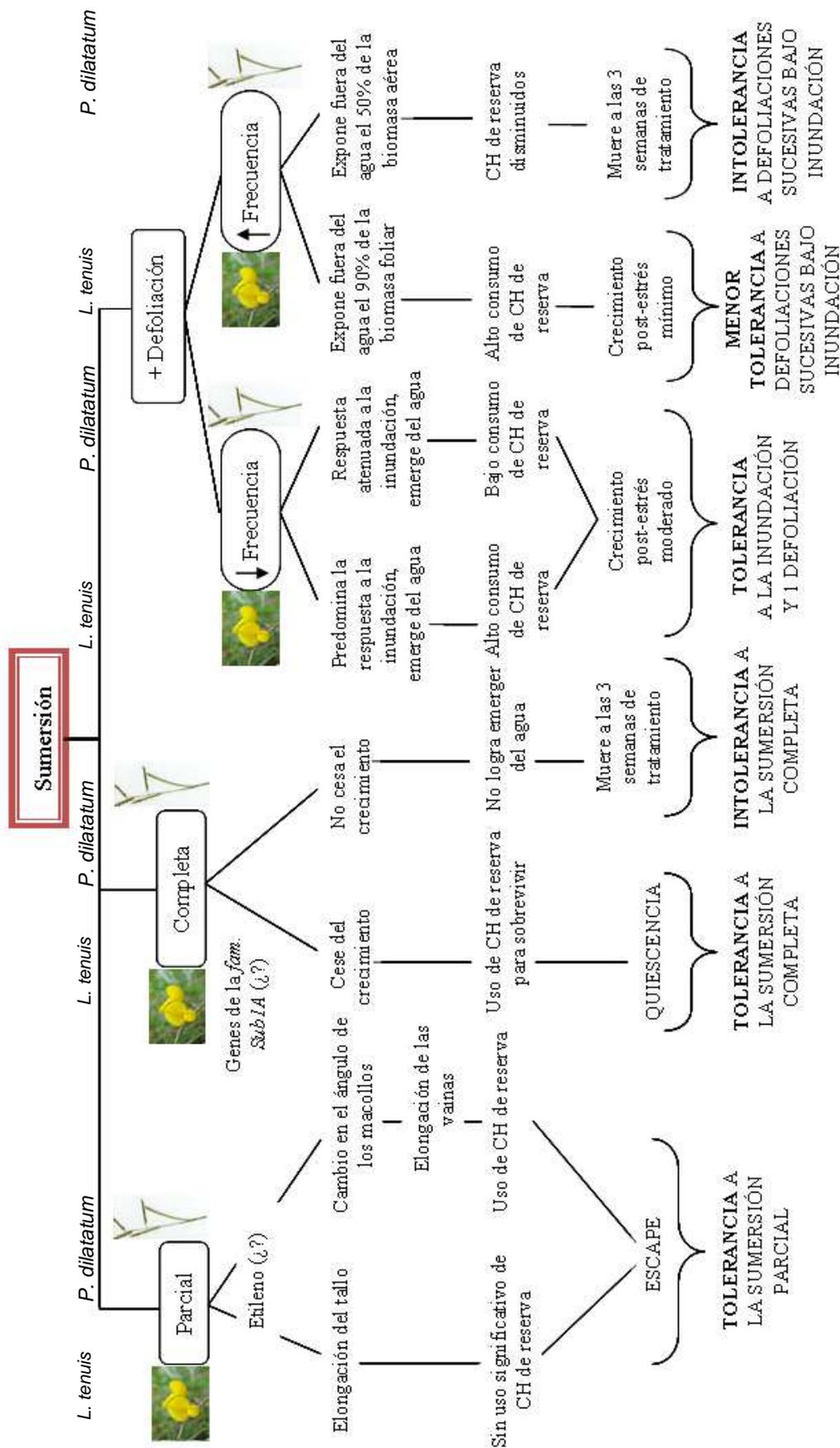
**Figura 5.1.** Esquema del raíces adventicias de una especie dicotiledónea y una gramínoide. Se indica con flechas negras el movimiento del  $O_2$  desde la parte aérea dentro de la raíz y hacia la rizósfera y los factores que están condicionando la llegada de este gas al ápice de las raíces. El espesor de cada cuadro de texto/flecha está indicando la magnitud del efecto.

El segundo esquema presentado (Figura 5.2) pretende ilustrar de manera combinada los principales resultados de los experimentos correspondientes a los Capítulos 3 y 4 de la tesis. Los resultados mostraron que las especies difirieron en las estrategias de crecimiento luego del estrés provocado por las diferentes intensidades de inundación. La dicotiledónea leguminosa *L. tenuis* fue capaz de desarrollar dos estrategias de crecimiento en función de la intensidad de inundación. Desarrolló una estrategia de “escape”, sin utilizar los carbohidratos de reserva, elongando los tallos cuando la sumersión fue parcial. Por el contrario, cuando la sumersión fue completa, adoptó una estrategia de “quiescencia”, con consumo de los carbohidratos de reserva, cesando el crecimiento de toda la planta. A pesar de que las reservas de las coronas le permitieron a *L. tenuis* sobrevivir a una sumersión completa prolongada, sería necesario un tiempo considerable para la recuperación de dichas reservas y el desarrollo de nuevas hojas funcionales al momento de pensar en estrategias de manejo de esta especie en el pastizal. En cambio, la estrategia de *P. dilatatum* fue siempre la misma: bajo cualquier intensidad de inundación aumentó el ángulo de inserción de los macollos y elongó las vainas intentando “escapar” de la sumersión. Bajo condiciones de sumersión parcial, esta respuesta es beneficiosa para la planta, ya que le permite exponer mayor biomasa foliar por encima del nivel del agua (Laan *et al.*, 1990, Grimoldi *et al.*, 1999; Striker *et al.*, 2005), y por ende presumiblemente aumentar la captura de O<sub>2</sub> (aireación de tejidos sumergidos) y la fijación de CO<sub>2</sub> (crecimiento de las plantas) (Koslowski y Pallardy, 1984; Colmer y Voeselek, 2009). Sin embargo, tener este tipo de respuesta cuando la sumersión es completa y el nivel del agua se encuentra muy por encima de la altura de la planta, no sería una estrategia apropiada, según los resultados encontrados en esta tesis. En este caso, las plantas de *Paspalum* no lograron alcanzar la superficie y murieron a los 20 días de aplicados los tratamientos. Sabiendo que el crecimiento en las gramíneas depende mayormente de la fijación actual de carbono (Lattanzi *et al.*, 2005), es posible que las plantas de *Paspalum* no hayan podido satisfacer las demandas energéticas bajo estas condiciones de estrés, dado que hubo baja biomasa de las láminas foliares y que a su vez, estaban cloróticas. Esto se vio reflejado en el amarillamiento significativo de las láminas foliares hacia la tercera semana de crecimiento y una relativa baja disponibilidad de radiación fotosintéticamente activa (PAR) para una especie C<sub>4</sub> a medida que la columna de agua se incrementó.

Seguidamente se abordaron las respuestas de estas especies frente a la combinación de dos factores de estrés: inundación y defoliación reiterada simulando el pastoreo, como otro disturbio típico de los pastizales inundables de la Pampa Deprimida (Soriano, 1991). Brevemente, se vio que *Lotus* bajo inundación priorizó siempre la exposición de los órganos aéreos por encima del nivel del agua y que cada vez que fue defoliado emergió utilizando progresivamente sus reservas en coronas (carbohidratos solubles y almidón), lo que significaría un compromiso en el rebrote post-estrés en las plantas de esta leguminosa a nivel de pastizal. En cambio, en el caso de *P. dilatatum* la respuesta, si bien es en el mismo sentido (emerger del agua), es de diferente magnitud ya que no compromete tanto su biomasa aérea ante un segundo evento de defoliación (dado que expone fuera del agua un 40% menos que *L. tenuis*, ver también Striker *et al.*, 2008). A pesar de ello, un segundo corte bajo anegamiento produce la sumersión (artificial por defoliación) de las plantas condicionando su supervivencia y el rebrote luego de retirado el estrés. Finalmente, ambas especies pueden tolerar por separado la inundación y la defoliación tal como se conocía de trabajos previos (Rubio *et al.*, 1995; Loreti y Oesterheld, 1996; Vignolio *et al.*, 1999; Insausti *et al.*, 2001; Striker *et al.* 2005; 2008). Para el caso de *Paspalum* se desea aclarar que es una especie frecuente y exitosa

en los pastizales inundables de la Pampa Deprimida, lo cual no concuerda con los resultados encontrados en esta tesis para un escenario de inundación profunda (Capítulo 3) y para la combinación de alta frecuencia de defoliación e inundación (Capítulo 4). Probablemente esto esté relacionado con que las inundaciones más frecuentes en el pastizal no sean necesariamente tan severas (en intensidad y duración) y que la mayoría de las veces esta especie cuenta con estructuras de almacenamiento de reservas (rizomas) que le permiten rebrotar luego de eventos de defoliación. Esto podría explicar por qué *Paspalum* es una especie exitosa en el pastizal, aún cuando en los experimentos llevados a cabo en esta tesis no sobrevive más de 20 días de estar sumergida completamente (por altura de la inundación o por corte reiterado de la biomasa aérea).

↓ **Figura 5.2.** Esquema donde se muestran las principales respuestas observadas en plantas de *Lotus tenuis* y *Paspalum dilatatum* cuando son sometidas a intensidades crecientes de inundación y a la combinación de estrés por defoliaciones sucesivas en presencia de inundación.



### Aportes originales derivados de esta tesis

El desarrollo de los capítulos de esta tesis aportó información novedosa relacionada con las respuestas de las plantas que habitan el pastizal inundable frente a factores de estrés a los que están habitualmente sujetas en el ambiente donde crecen y se desarrollan. Estos factores son la inundación y la defoliación reiterada, principalmente (Sala *et al.*, 1986; Soriano, 1991; Insausti *et al.*, 1999; Escaray *et al.*, 2011; Striker *et al.*, 2011).

En una primera aproximación (Capítulo 2), a nivel de órgano y con un relativo buen nivel de detalle, se investigaron las respuestas anatómicas (deposición de suberina, porcentaje de aerénquima a lo largo de la raíz) y fisiológicas (pérdida radial de oxígeno hacia la rizósfera) relacionadas con la elongación de raíces adventicias de graminoides y dicotiledóneas en condiciones anaeróbicas que simulaban un suelo anegado. Hasta el momento, los estudios relacionados con estos aspectos habían estado circunscriptos en su gran mayoría a especies graminoides, especialmente a variedades del cultivo de arroz (*Oryza sativa*) y a las especies silvestres *Phragmites australis* y *Typha latifolia* (Colmer *et al.*, 1998; McDonald *et al.*, 2002; Colmer, 2003b; Soukup *et al.*, 2007; Kotula *et al.*, 2009; Shiono *et al.*, 2011). En esta tesis se pudo establecer una comparación en la capacidad de crecimiento bajo anaerobiosis de raíces de graminoides y de dicotiledóneas herbáceas del pastizal representativas de los cuatro tipos principales de aerénquima reconocidos en la literatura internacional (Justin y Armstrong, 1987; Seago *et al.*, 2005; Striker *et al.*, 2007). Es la primera vez que se realiza una caracterización de la mayor tolerancia al anegamiento, en términos de la tasa de elongación radical, de las graminoides con respecto a las dicotiledóneas, utilizando una aproximación que involucró la integración de parámetros anatómicos específicos y fisiológicos (medición de ROL con microelectrodos de O<sub>2</sub> de alta capacidad de detección y resolución espacial y temporal). Esto permitió caracterizar e identificar a la suberina como uno de los componentes presumiblemente principales de la barrera a la pérdida radial de oxígeno (*i.e.* suberina) en un análisis semi-cuantitativo. Quedan a su vez, interrogantes abiertos que ameritan ser investigados y que se plantean explícitamente en la próxima sección.

En un segundo experimento (Capítulo 3), se abordó el análisis de las estrategias de crecimiento que podían desarrollar *Lotus tenuis* y *Paspalum dilatatum* frente a intensidades crecientes de inundación, que provocan sumersión parcial o sumersión total de las plantas. En este sentido, se conocía la existencia de dos estrategias, al parecer mutuamente excluyentes, frente a la sumersión de plantas: ‘escape’ del agua mediante la elongación de los órganos aéreos (pecíolos, vainas, tallos) y ‘quiescencia’ con consumo de carbohidratos para sobrevivir la sumersión, y luego retomar el crecimiento (Bailey-Serres y Voesenek, 2008; 2010; Manzur *et al.*, 2009-capítulo 3 de esta tesis; Hattori *et al.*, 2010). Plantas con genotipo similar reaccionaban frente a la sumersión, ya sea parcial o completa, siempre de una manera (‘escape’) o de la otra (‘quiescencia’). Al respecto, se había informado acerca de cultivares/accesiones de arroz capaces de elongar sus entrenudos frente a sumersión completa (accesiones Liaogeng, IR42 y M202) y otros que realizan quiescencia (accesión FR13) (ver Fukao *et al.*, 2006; Fukao y Bailey-Serres, 2008), ecotipos silvestres de *Rumex crispus* (Laan y Blom, 1990; Voesenek *et al.*, 1990) y de *Ranunculus repens* que hacen elongación (*i.e.* escape) o, por el contrario, quiescencia (Lynn y Waldren, 2003) y especies como *Alternanthera phyloxeroides* que utiliza la estrategia de escape, mientras que *Hemarthria altissima* permanece en estado de quiescencia cuando está completamente sumergida (Luo *et al.* 2010). En esta tesis se encontró por primera vez que plantas con un mismo *background* genético, en este caso de la especie *L. tenuis* cv Pampa INTA, eran capaces de desarrollar una u otra estrategia dependiendo del nivel de sumersión de las plantas (Manzur *et al.*, 2009). En este caso,

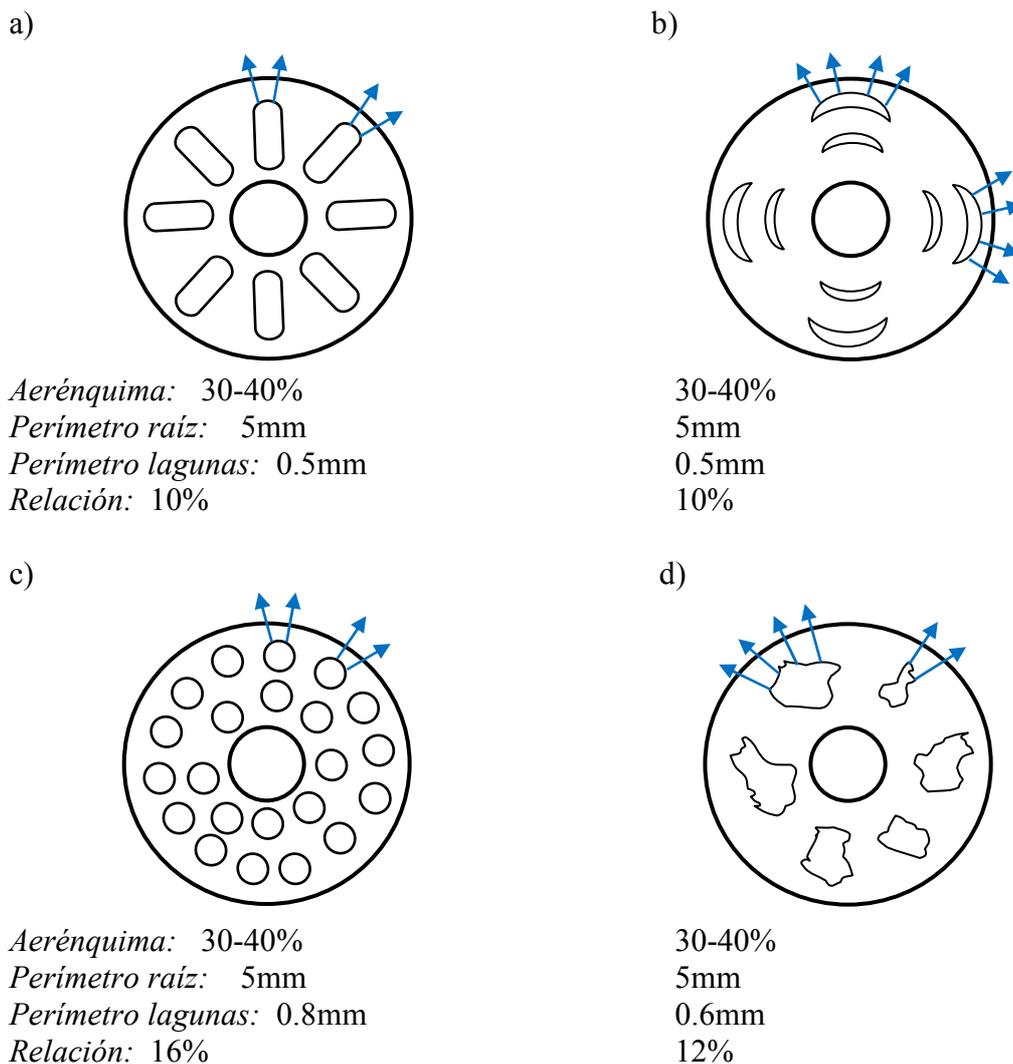
plantas similares de *Lotus* utilizaron la estrategia de ‘escape’ frente a sumersión parcial (presumiblemente para evitar quedar totalmente sumergidas si el nivel del agua se incrementara), o estuvieron quiescentes cuando estuvieron completamente sumergidas. Estos resultados constituyen el primer reporte internacional en la literatura acerca de que las estrategias no son necesariamente excluyentes en plantas con un mismo *background* genético (*L. tenuis* cv. Pampa INTA). Más aún, sobre la base de estos resultados se abren nuevos interrogantes que seguramente traten de dilucidar de qué manera *L. tenuis* es capaz de sensar la profundidad de sumersión de las plantas, y así, desarrollar una u otra estrategia (ver hipótesis citadas por Bailey-Serres y Voesenek, 2010 sobre la base de lo reportado en esta tesis y en Manzur *et al.*, 2009).

En una tercera aproximación experimental (Capítulo 4) se abordó el estudio de la interacción entre la inundación y la frecuencia de defoliación sobre plantas de *L. tenuis* y *P. dilatatum*, haciendo especial énfasis en el rol de los carbohidratos de reserva para sostener el rebrote. Esta combinación de factores (inundación y defoliación) había sido abordada en no más de 4-5 trabajos en la literatura, en su mayoría para especies gramínoideas y sujetas a un único evento de corte durante la inundación (*Echinochloa haploclada*, *Hypertelia dissoluta* y *Panicum coloratum* en Oosterheld y McNaughton, 1991a; *Deschampsia caespitosa* en Merrill y Colberg, 2003; *Bolboschoenus caldwelii* en Hayball y Pearce, 2004 y *L. tenuis* y *P. dilatatum* en Striker *et al.*, 2008). En la mayoría de los estudios citados, se había encontrado un compromiso en el crecimiento de las plantas debido a la caída en la acumulación de biomasa de plantas defoliadas al inicio de los experimentos y que luego debían crecer en condiciones de anegamiento (exceptuando en Oosterheld y McNaughton, [1991a] donde defoliaron a la mitad del período de anegamiento). En un trabajo reciente del grupo de trabajo en el que se enmarca esta tesis, se encontró por un lado que *L. tenuis* tuvo la capacidad de tolerar un evento inicial de defoliación bajo inundación, sin disminuir marcadamente su rebrote en concomitancia con una caída en la biomasa de coronas presuntamente asociada al uso de reservas (no se midieron en esa oportunidad carbohidratos de reserva). Por otro lado, se vio que *P. dilatatum* disminuyó un 32% la acumulación de biomasa de las plantas que crecieron inundadas luego de una defoliación inicial (Striker *et al.*, 2008). Este capítulo aporta nueva información que complementa lo informado anteriormente y pone de manifiesto la importancia del tiempo de recuperación luego del estrés por eventos de defoliación en las plantas (ver Oosterheld y McNaughton, 1991b “*Effect of stress and time for recovery on the amount of compensatory growth after grazing*”). En particular, se encontró que la presunta tolerancia de *L. tenuis* a la combinación de defoliación e inundación no lo es tal si se reitera la defoliación sobre plantas inundadas (de mayor altura por efecto de la inundación). Esto se debe a que el agotamiento de las reservas de corona, para emerger del agua y tolerar así el primer evento de corte, implica una muy pobre capacidad de recuperación si se aplica un segundo corte sobre ellas (ya con pocas reservas en coronas). Más aún, en el caso de la gramínea *P. dilatatum* un segundo evento de defoliación en la mitad del período de inundación determinó la muerte de las plantas (sin rebrote posterior observada dos semanas posteriores de retirada el agua). Por lo tanto, esta nueva información podría ser tenida en cuenta a fines prácticos de manejo del pastoreo en el pastizal inundado, ya que sería factible la pérdida de plantas de la gramínea *Paspalum* y una pobre recuperación de la dicotiledónea leguminosa *Lotus*, ambas preferidas y frecuentemente defoliadas por el ganado (Lemcoff *et al.*, 1978; Agnusdei y Mazzanti, 2001), y por ello, con alta probabilidad de sufrir dicha combinación de corte y anegamiento.

### **Nuevos interrogantes que surgen a partir de la tesis**

A partir de los resultados de cada uno de los capítulos experimentales que componen esta tesis, surgen nuevas preguntas que ameritan futuras investigaciones.

Del primer capítulo experimental, relacionado con el crecimiento radical, la oxigenación de las raíces y la anatomía, sería interesante determinar ¿Cuál es el efecto de la tipología del aerénquima (arreglo espacial del aerénquima), que se desarrolla bajo condiciones de anaerobiosis, sobre la pérdida radial de oxígeno (ROL)? Esta idea se basa en que la superficie de intercambio de oxígeno de la raíz con la rizósfera podría variar según la disposición espacial de las lagunas aerenquimáticas en la corteza radical de las raíces adventicias, ante igual porcentaje de aerénquima. En la Figura 5.4 se muestran diagramas con los distintos arreglos espaciales de aerénquima y valores aproximados relacionados con el área de contacto entre las lagunas aerenquimáticas y el medio externo de la raíz. Dicho valor puede obtenerse a partir del cálculo (en porcentaje) de cuántos milímetros del perímetro total de la raíz estarían interrumpidos por diferentes porciones de lagunas aerenquimáticas (perímetro de la porción de laguna aerenquimática que estaría en contacto con la exodermis). Cuanto mayor sea esta relación, mayor va a ser la superficie de contacto y de intercambio de oxígeno con el medio externo de la raíz. Sin embargo, este intercambio va a estar condicionado por la barrera física a la pérdida radial de oxígeno, constituida principalmente por la deposición de suberina en la exodermis.



**Figura 5.3.** Esquemas de los cuatro tipos de arreglo aerenquimático de las especies estudiadas en esta tesis. (a) *Paspalidium geminatum*: raíz tipo graminácea; (b) *Cyperus eragrostis*: raíz tipo ciperácea; (c) *Rumex crispus*: raíz tipo *Rumex* y (d) *Lotus tenuis*: raíz tipo *Apium*. Se muestra el porcentaje de aerénquima, el perímetro de las raíces, el perímetro de todas las lagunas aerenquimáticas que estaría en contacto con exodermis (indicado con flechas) y el porcentaje de la relación, calculado como el porcentaje del perímetro de la raíz que se encuentra interrumpido por las lagunas aerenquimáticas.

Otro interrogante está relacionado con los cambios que generan en la rizósfera las especies que liberan oxígeno (alto ROL), y cuál es el valor umbral de pérdida radial de oxígeno a partir del cual se inducen cambios en el potencial redox suficientes para mantener los compuestos potencialmente tóxicos reducidos como el  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+4}$  y  $\text{H}_2\text{S}$  en sus formas oxidadas (no tóxicas) alrededor de las raíces. A nivel de planta (y tal vez de población), y teniendo en cuenta el funcionamiento de las especies dentro del Pastizal, sería interesante estudiar el efecto de tener una u otra estrategia (perder más o menos ROL hacia la rizósfera) y cómo condicionaría al funcionamiento del pastizal cuando las especies gramíneas y dicotiledóneas coexisten bajo condiciones de suelo anóxico.

Del segundo capítulo experimental relacionado con las estrategias de las especies tolerantes a la inundación cuando éstas son sometidas a inundaciones de distinta intensidad, desde la sumersión parcial hasta la completa, surgen saber ¿Cómo sería la respuesta frente a distintas intensidades de inundación de ecotipos de *Paspalum dilatatum* y *Lotus tenuis* provenientes de regiones topográficamente distintas? ¿Cómo se afectan estas respuestas según el estadio ontogénico en que se encuentran las plantas? ¿En qué medida la fotosíntesis aérea y subacuática aportan a los requerimientos energéticos de las distintas especies cuando se encuentran bajo las distintas intensidades de inundación? ¿Está condicionado dicho aporte por la presencia de estructuras de reserva de carbohidratos?

Del tercer capítulo experimental, donde se combinaron dos factores de estrés de ocurrencia frecuente en el pastizal inundable, las preguntas que surgen están relacionadas principalmente con lo que ocurre a nivel de planta, como por ejemplo: ¿Cuáles son los mecanismos fisiológicos involucrados en las respuestas que desarrollan las distintas especies frente a la ocurrencia de defoliaciones sucesivas en presencia de las inundaciones? ¿Cómo sería la respuesta de las plantas si además de someterlas a altas frecuencias de defoliación e inundación, la columna de agua donde en la que se encuentran sumergidas es significativamente más alta que las plantas? ¿Qué variabilidad de respuestas existe dentro de las especies tolerantes a cada uno de estos factores por separado?

El diseño de experimentos que permitan responder a estos interrogantes, sería un paso importante a seguir, dado que aportarían más resultados para poder mejorar la comprensión de las respuestas de las especies que viven en estos sistemas, que periódicamente están sujetos a estrés por inundación y pastoreo frecuente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agnusdei MG, Mazzanti A. 2001. Frequency of defoliation of native and naturalized species of the Flooding Pampas (Argentina). *Grass and Forage Science* **56**: 344–351.
- Agnusdei M. 1999. Analyse de la dynamique de la morphogenèse foliaire et de la défoliation de plusieurs espèces de graminées soumises à un pâturage continu dans une communauté végétale de la Pampa Humide (Argentine). *Thèse (Doctorat-Agronomie)* - Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy.
- Altesor AI, Piñeiro G, Lezama F, Jackson RD, Sarasola M, Paruelo JM. 2006. Ecosystem changes associated with grazing removal in sub-humid grasslands of South America. *Journal of Vegetation Science* **17**: 323–332.
- Arikado H, Adachi Y. 1955. Anatomical and ecological responses of barley and some forage crops to the flooding treatment. *Bulletin of the Faculty of Agriculture - Mie University* **11**: 1–27.
- Armstrong W. 1979. Aeration in higher plants. *Advances in Botanical Research* **7**: 225–332.
- Armstrong J, Armstrong W. 2005. Rice: sulphide-induced barriers to root radial oxygen loss, Fe<sup>2+</sup> and water uptake, and lateral root emergence. *Annals of Botany* **96**: 625–638.
- Armstrong W, Beckett PM. 1985. Root aeration in unsaturated soil: A multi-shelled model of oxygen distribution and diffusion with and without sectoral blocking of the diffusion path. *New Phytologist* **100**: 293–311.
- Armstrong W, Beckett PM, Justin SHFW, Lythe S. 1991. Modelling and other aspects of root aeration. En: Jackson MB, Davies DD, Lambers H, eds. *Plant life under oxygen deprivation*. The Hague: SPB Academic Publishing bv, 267–282.
- Armstrong W, Cousins D, Armstrong J, Turner DW, Beckett PM. 2000. Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany* **86**: 687–703.
- Armstrong J, Jones RE, Armstrong W. 2006. Rhizome phyllosphere oxygenation in *Phragmites* and other species in relation to redox potential, convective gas flow, submergence and aeration pathways. *New Phytologist* **172**: 719–731.
- Auld JR, Agrawal AA, Relyea RA. 2010. Re-evaluating the costs and limits of adaptive phenotypic plasticity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **277**: 503–511.
- Avice JC, Ourry A, Lemaire G, Boucaud J. 1996. Nitrogen and Carbon Flows Estimated by <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C Pulse-Chase Labeling during Regrowth of Alfalfa. *Plant Physiology* **112**: 281–290.
- Avice JC, Ourry A, Lemaire G, Volenec JJ, Boucaud J. 1997. Root protein and vegetative storage protein are key organic nutrients for alfalfa shoot regrowth. *Crop Science* **37**: 1187–1193.
- Bailey-Serres J, Voisenek LACJ. 2008. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 313–339.
- Bailey-Serres J, Fukao T, Ronald P, Ismail A, Heuer S, Mackill D. 2010. Submergence tolerant rice: *SUB1*'s journey from landrace to modern cultivar. *Rice* **3**: 138–147.
- Bailey-Serres J, Voisenek LACJ. 2010. Life in the balance: a signaling network controlling survival of flooding. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 489–494.

- Barta AL. 1988. Response of field grown alfalfa to root waterlogging and shoot removal. I. Plant injury and carbohydrate and mineral content of roots. *Agronomy Journal* **80**: 889–892.
- Blom CWPM, Voesenek LACJ, Banga M. 1994. Physiological ecology of riverside species: adaptive responses of plants to submergence. *Annals of Botany* **74**: 253–263.
- Boller BC, Nösberger J. 1985. Photosynthesis of white clover leaves as influenced by canopy position, leaf age, and temperature. *Annals of Botany* **56**: 19–27.
- Booyesen PDeV, Tainton NM, Scott JD. 1963. Shoot-apex development in grasses and its importance in grassland management. *Herbage Abstract* **33**: 209–213.
- Bradshaw AD. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics* **13**: 115–155.
- Branson FA. 1953. Two new factors affecting resistance of grasses to grazing. *Journal of Range Management* **6**: 165–171.
- Briske DD, Richards JH. 1995. Plant responses to defoliation: A physiological, morphological, and demographic evaluation. In *Wildland Plants: Physiological Ecology and Developmental Morphology*. Eds. D J Bedunah and R E Sosebee. Society for Range Management, Denver, CO, pp 635–710.
- Burkart SE, León RJC, Movia CP. 1990. Inventario fitosociológico del pastizal de la Depresión del Salado (Prov. de Bs. As.) en un área representativa de sus principales ambientes. *Darwiniana* **30**: 27–69.
- Canziani O, Giménez JC, De Zubiría M. 2001. Impacts study of change on climate during the 20<sup>th</sup> Century in Argentina. *Hydrology*.
- Casal JJ, Sánchez RA, Gibson D. 1990. The significance of changes in the red/far-red ratio, associated with either neighbor plants or twilight, for tillering in *Lolium multiflorum* Lam. *New Phytologist* **116**: 565–572.
- Castonguay Y, Nadeau P, Simard RR. 1993. Effects of flooding on carbohydrate and ABA levels in roots and shoots of alfalfa. *Plant, Cell and Environment* **16**: 695–702.
- Chaneton EJ, Facelli JM, León RJC. 1988. Floristic changes induced by flooding on grazed and ungrazed lowland grasslands in Argentina. *Journal of Range Management* **41**: 495–499.
- Chapman DF, Lemaire G. 1993. Morphogenetic and structural determinants of plant regrowth after defoliation. *Proceedings XVII International Grassland Congress*, p. 95–104.
- Chen X, Huber H, de Kroon H, Peeters AJM, Poorter H, Voesenek LACJ, Visser EJW. 2009. Intraspecific variation in the magnitude and pattern of flooding-induced shoot elongation in *Rumex palustris*. *Annals of Botany* **104**: 1057–1067.
- Chen X, Pierik R, Peeters AJM, Poorter H, Visser EJW, Huber H, de Kroon H, Voesenek LACJ. 2010. Endogenous ABA as a key switch for natural variation in flooding-induced shoot elongation. *Plant Physiology* **154**: 969–977.
- Chen X, Visser EJW, de Kroon H, Pierik R, Voesenek LACJ, Huber H. 2011. Fitness consequences of natural variation in flooding-induced shoot elongation in *Rumex palustris*. *New Phytologist* **190**: 409–420.
- Clúa A, Bottini R, Brocchi GN, Bogino J, Luna V, Montaldi ER. 1996. Growth habit of *Lotus tenuis* shoots and the influence of photosynthetic photon flux density, sucrose and endogenous levels of gibberellins A1 and A3. *Physiologia Plantarum* **98**: 381–388.
- Colmer TD. 2003a. Aerenchyma and an inducible barrier to radial oxygen loss facilitate root aeration in upland, paddy and deepwater rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany* **91**: 301–309.

- Colmer TD. 2003b. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant, Cell and Environment* **26**: 17–36.
- Colmer TD, Gibberd MR, Wiengweera A, Tinh TK. 1998. The barrier to radial oxygen loss from roots of rice (*Oryza sativa* L.) is induced by growth in stagnant solution. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1431–1436.
- Colmer TD, Greenway H. 2005. Oxygen transport, respiration, and anaerobic carbohydrate catabolism in roots in flooded soils. In: *Plant respiration: from cell to ecosystem*. Lambers H, Rivas-Carbo M. eds. Springer, The Netherlands, pp. 137–158.
- Colmer TD, Greenway H. 2011. Ion transport in seminal and adventitious roots of cereals during O<sub>2</sub> deficiency. *Journal of Experimental Botany* **62**: 39–57.
- Colmer TD, Pedersen O. 2008. Underwater photosynthesis and respiration in leaves of submerged wetland plants: gas films improve CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> exchange. *New Phytologist* **177**: 918–926.
- Colmer TD, Voesenek LACJ. 2009. Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Functional Plant Biology* **36**: 665–681.
- Couso LL, Gatti ML, Cornaglia PS, Schrauf GE, Fernández RJ. 2010. Are more productive varieties of *Paspalum dilatatum* less tolerant to drought? *Grass and Forage Science* **65**: 296–303.
- Crawford RMM. 1992. Oxygen availability as an ecological limit to plant distribution. *Advances in Ecological Research* **23**: 93–185.
- Deregibus VA, Doll U, D'Angela E, Kropfl A, Frascina A. 1982. Aspectos ecofisiológicos de dos forrajeras estivales de los pastizales de la Depresión del Salado. *Revista de la Facultad de Agronomía* **3**: 57-74.
- Deregibus VA, Sánchez RA, Casal JJ. 1983. Effects of light quality on tiller production in *Lolium* spp. *Plant Physiology* **72**: 900–902.
- De Simone O, Haase K, Müller E, Junk W, Hartmann K, Schreiber L, Schmidt W. 2003. Apoplasmic barriers and oxygen transport properties of hypodermal cell walls in roots from four Amazonian tree species. *Plant Physiology* **132**: 206–217.
- Detling JK, Painter EL. 1983. Defoliation responses of western wheatgrass populations with diverse histories of prairie dog grazing. *Oecologia* **57**: 65–71.
- Dixon MH, Hill SA, Jackson MB, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ. 2006. Physiological and metabolic adaptations of *Potamogeton pectinatus* L. tubers support rapid elongation of stem tissue in the absence of oxygen. *Plant and Cell Physiology* **47**: 128–140.
- Drew MC, Lynch JM. 1980. Soil anaerobiosis, microorganisms and root function. *Annual Review of Phytopathology* **18**: 37–66.
- Drew MC. 1997. Oxygen deficiency and root metabolism. Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 223–250.
- Ella ES, Ismail AM. 2006. Seedling nutrient status before submergence affects survival after submergence in rice. *Crop Science* **46**: 1673–1681.
- Ella ES, Kawano N, Yamauchi Y, Tanaka K, Ismail AM. 2003. Blocking ethylene perception enhances flooding tolerance in rice seedlings. *Functional Plant Biology* **30**: 813–819.
- Enstone DE, Peterson CA. 2005. Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. *Plant, Cell and Environment* **28**: 444–455.
- Escaray FJ, Menendez AB, Gárriz A, Pieckenstein FL, Estrella MJ, Castagno LN, Carrasco P, Sanjuán J, Ruíz OA. 2012. Ecological and agronomic importance of the plant genus *Lotus*. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant Science* **182**: 121–133.

- Fiedler S, Vepraskas MJ, Richardson JL. 2007. Soil redox potential: importance, field measurements, and observations. *Advances in Agronomy* **94**: 2–56.
- Fukao T, Bailey–Serres J. 2004. Plant responses to hypoxia. Is survival a balancing act? *Trends in Plant Science* **9**: 1403–1409.
- Fukao T, Bailey–Serres JA. 2008. Submergence tolerance conferred by *Sub1A* is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **105**: 16814–16819.
- Fukao T, Xu K, Ronald PC, Bailey–Serres JA. 2006. Variable cluster of ethylene response factor–like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *Plant Cell* **18**: 2021–2034.
- Garthwaite AJ, von Bothmer R, Colmer TD. 2003. Diversity in root aeration traits associated with waterlogging tolerance in the genus *Hordeum*. *Functional Plant Biology* **30**: 875–889.
- Gautier H, Varlet-Grancher C, Hazard L. 1999. Tillering responses to the light environment and to defoliation in populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) selected for contrasting leaf length. *Annals of Botany* **83**: 423–429.
- Gibberd MR, Colmer TD, Cocks PS. 1999. Root porosity and oxygen movement in waterlogging-tolerant *Trifolium tomentosum* and -intolerant *Trifolium glomeratum*. *Plant, Cell and Environment* **22**: 1161–1168.
- Gibberd MR, Gray JD, Cocks PS, Colmer TD. 2001. Waterlogging tolerance among a diverse range of *Trifolium* accessions is related to root porosity, lateral root formation, and aerotrophic rooting. *Annals of Botany* **88**: 579–589.
- Gibbs J, Greenway H. 2003. Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Functional Plant Biology* **30**: 1–47.
- Gibson D, Casal JJ, Deregibus VA. 1992. The effects of plant density on shoot and leaf lamina angles in *Lolium multiflorum* and *Paspalum dilatatum*. *Annals of Botany* **70**: 69–73.
- Grimoldi AA, Insausti P, Roitman GG, Soriano A. 1999. Responses to flooding intensity in *Leontodon taraxacoides*. *New Phytologist* **141**: 119–128.
- Grimoldi AA, Insausti P, Vasellati V, Striker GG. 2005. Constitutive and plastic root traits and their role in differential tolerance to soil flooding among co-existing species of lowland grassland. *International Journal of Plant Sciences* **166**: 805–813.
- Hattori Y, Nagai K, Ashikari M. 2010. Rice growth adapting to deep water. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 1–6.
- Hayball N, Pearce M. 2004. Influences of simulated grazing and water-depth on the growth of juvenile *Bolboschoenus caldwellii*, *Phragmites australis* and *Schoenoplectus validus* plants. *Aquatic Botany* **78**: 233–242.
- Henriksen GH, Raman DR, Walker LP, Spanswick RM. 1992. Measurement of net fluxes of ammonium and nitrate at the surface of barley roots using ion-selective microelectrodes: II. Patterns of uptake along the root axis and evaluation of the microelectrode flux estimation technique. *Plant Physiology* **99**: 734–747.
- Hsiao AI, Huang WZ. 1989. Effects of flooding on rooting and sprouting of isolated stem segments and on plant growth of *Paspalum distichum* L. *Weed Research* **29**: 335–344.
- Insausti P, Chaneton EJ, Soriano A. 1999. Flooding reverted grazing effects on plant community structure in Mesocosms of lowland grassland. *Oikos* **84**: 266–276.
- Insausti P, Grimoldi AA, Chaneton EJ, Vasellati V. 2001. Flooding induces a suite of adaptive plastic responses in the grass *Paspalum dilatatum*. *New Phytologist* **152**: 291–300.

- Jackson MB. 1989. Regulation of aerenchyma formation in roots and shoots by oxygen and ethylene. In *Cell Separation in Plants: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (eds D.J. Osborne & M.B. Jackson) NATO ASI Series Springer-Verlag, Berlin, Germany, **35**: 263–274.
- Jackson MB. 2008. Ethylene-promoted elongation: an adaptation to submergence stress. *Annals of Botany* **101**: 229–248.
- Jackson MB, Armstrong W. 1999. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. *Plant Biology* **1**: 274–287.
- Jackson MB, Drew M. 1984. Effects of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants. In: *Flooding and plant growth*. T.T. Koslowski (ed). *Academic Press Inc.*, Orlando, Florida, pp. 47–128.
- Jackson MB, Hall KC. 1987. Early stomatal closure in flooded pea plants is mediated by abscisic acid in the absence of foliar water deficits. *Plant, Cell and Environment* **10**: 121–130.
- Jackson MB, Ram PC. 2003. Physiological and molecular basis of susceptibility and tolerance of rice plants to complete submergence. *Annals of Botany* **91**: 227–241.
- Jaramillo VJ, Detling JK. 1988. Grazing history, defoliation and competition: effects on short grass production and nitrogen accumulation. *Ecology* **69**: 1599–1608.
- Jensen CR, Luxmoore RJ, Van Gundy SD, Stolzy LH. 1969. Root air space measurements by a pycnometer method. *Agronomy Journal* **61**: 474–475.
- Justin SHFW, Armstrong W. 1987. The anatomical characteristics of roots and plant responses to soil flooding. *New Phytologist* **106**: 465–495.
- Justin SHFW, Armstrong W. 1991. Evidence for the involvement of ethylene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice. *New Phytologist* **118**: 49–62.
- Kallenbach RL, McGraw RL, Beauselinck PR, Roberts CA. 2001. Summer and autumn growth of rhizomatous birdsfoot trefoil. *Crop Science* **41**: 149–156.
- Kavanová M, Gloser V. 2005. The use of internal nitrogen stores in the rhizomatous grass *Calamagrostis epigejos* during regrowth after defoliation. *Annals of Botany* **95**: 457–463.
- Kawai M, Samarajeewa PK, Barrero RA, Nishiguchi M, Uchimiya H. 1998. Cellular dissection of the degradative pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice roots. *Planta* **204**: 277–287.
- Kebrom TH, Brutnell TP, Finlayson SA. 2010. Suppression of sorghum auxiliary bud outgrowth by shade, *phyB* and defoliation signaling pathways. *Plant, Cell and Environment* **33**: 48–58.
- Kohler F, Gillet F, Gobat JM, Buttler A. 2004. Seasonal vegetation changes in mountain pastures due to simulated effects of cattle grazing. *Journal of Vegetation Science* **15**: 143–150.
- Kotula L, Steudle E. 2009. Measurements of oxygen permeability coefficient of rice (*Oryza sativa* L.) roots using a new perfusion technique. *Journal of Experimental Botany* **60**: 567–580.
- Kotula L, Ranathunge K, Steudle E. 2009. Apoplastic barriers effectively block oxygen permeability across outer cell layers of rice roots under deoxygenated conditions: roles of apoplastic pores and of respiration. *New Phytologist* **184**: 909–917.
- Kozlowski TT, Pallardy SG. 1984. Effects of flooding on water, carbohydrate and mineral relations. In *Flooding and plant growth*. T.T. Koslowski (ed). *Academic Press Inc.*, Orlando, Florida, pp. 165–193.
- Krishnamurthy P, Ranathunge K, Franke R, Prakash HS, Schreiber L, Mathew MK. 2009. The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* **230**: 119–134.

- Laan P, Berrevoets MJ, Lythe S, Armstrong W, Blom C. 1989a. Root morphology and aerenchyma formation as indicators of the flood tolerance of *Rumex* species. *Journal of Ecology* **77**: 693–703.
- Laan P, Smolders A, Blom CWPM, Armstrong W. 1989b. The relative roles of internal aeration radial oxygen losses, iron exclusion and nutrient balances in flood-tolerance of *Rumex* species. *Acta Botanica Neerlandica* **38**: 131–145.
- Laan P, Blom CWPM. 1990. Growth and survival responses of *Rumex* species to flooded and submerged conditions: The importance of shoot elongation, underwater photosynthesis and reserve carbohydrates. *Journal of Experimental Botany* **41**: 775–783.
- Laan P, Tosserams M, Blom CWPM, Veen BW. 1990. Internal oxygen transport in *Rumex* species and its significance for respiration under hypoxic conditions. *Plant and Soil* **122**: 39–46.
- Lattanzi FA, Schnyder H, Thornton B. 2005. The sources of carbon and nitrogen supplying leaf growth – assessment of the role of stores with compartmental models. *Plant Physiology* **137**: 383–395.
- Lavado RS, Taboada MA. 1987. Soil salinization fluxes as an effect of grazing in a native grassland soil in the Flooding Pampa in Argentina. *Soil, Use and Management* **4**: 143–148.
- Lemaire G, Da Silva SC, Agnusdei M, Wade M, Hodgson J. 2009. Interactions between leaf lifespan and defoliation frequency in temperate and tropical pastures: a review. *Grass and Forage Science* **64**: 341–353.
- Lemaire G, Chapman D. 1996. Tissue flows in grazed plant communities. In: Hodgson, J. and Illius, A.W. (eds) *The Ecology and Management of Grazing Systems*. pp. 3–36.
- Lemcoff JH, Sala OE, Deregibus VA, León RJC, Schlichter T. 1978. Preferencia de los vacunos por los distintos componentes de un pastizal de la Depresión del Salado. *Monografías* 8, CIC-La Plata (Argentina).
- Letey J, Stolzy LH. 1964. Measurement of oxygen diffusion rates with a platinum microelectrode. I. Theory and equipment. *Hilgardia* **35**: 545–554.
- Li R, Volenec JJ, Joern BC, Cunningham SM. 1996. Seasonal changes in nonstructural carbohydrates, protein, and macronutrients in roots of alfalfa, red clover, sweetclover, and birdsfoot trefoil. *Crop Science* **36**: 617–623.
- Loreti J, Oesterheld M, León RJC. 1994. Efectos de la interacción del pastoreo y la inundación sobre *Paspalum dilatatum*, un pasto nativo de la Pampa Deprimida. *Ecología Austral* **4**: 49–58.
- Loreti J, Oesterheld M. 1996. Intraspecific variation in the resistance to flooding and drought in populations of *Paspalum dilatatum* from different topographic positions. *Oecologia* **108**: 279–284.
- Luo F-L, Nagel KA, Zeng B, Schurr U, Matsubara S. 2009. Photosynthetic acclimation is important for post-submergence recovery of photosynthesis and growth in two riparian species. *Annals of Botany* **104**: 1435–1444.
- Luo F-L, Nagel KA, Scharr H, Zeng B, Schurr U, Matsubara S. 2011. Recovery dynamics of growth, photosynthesis and carbohydrate accumulation after de-submergence: a comparison between two wetland plants showing escape and quiescence strategies. *Annals of Botany* **107**: 49–63.
- Lynn DE, Waldren S. 2003. Survival of *Ranunculus repens* L. (creeping buttercup) in an amphibious habitat. *Annals of Botany* **91**: 75–84.
- Luxmore RJ, Stolzy LH, Letey J. 1970 Oxygen diffusion in the soil plant system. *Agronomy Journal* **62**: 322–332.

- Manzur ME, Grimoldi AA, Insausti P, Striker GG. 2009. Escape from water or remain quiescent? *Lotus tenuis* changes its strategy depending on depth of submergence. *Annals of Botany* **104**: 1163–1169.
- Matches GA. 1992. Plant response to grazing: A review. *Journal of Production Agriculture* **5**: 1–7.
- McDonald MP, Galwey NW, Colmer TD. 2001. Waterlogging tolerance in the tribe Triticeae: the adventitious roots of *Critesion marimum* have a relatively high porosity and a barrier to radial oxygen loss. *Plant, Cell and Environment* **24**: 585–596.
- McDonald MP, Galwey NW, Colmer TD. 2002. Similarity and diversity in adventitious root anatomy as related to root aeration among a range of wet- and dry-land grass species. *Plant, Cell and Environment* **25**: 441–451.
- McNaughton SJ. 1983. Compensatory plant growth as a response to herbivory. *Oikos* **40**: 329–336.
- Merrill P, Colberg JS. 2003. Defoliation, waterlogging and dung influences allocation patterns of *Deschampsia caespitosa*. *Journal of Range Management* **56**: 634–639.
- Metraux JP, Kende H. 1983. The role of ethylene in the growth-response of submerged deep-water rice. *Plant Physiology* **72**: 441–446.
- Meuriot F, Avice JC, Simon JC, Laine P, Decau LM, Ourry A. 2004. Influence of initial organic N reserves and residual leaf area on growth, N uptake, N partitioning and N storage in alfalfa (*Medicago sativa*) during post-cutting regrowth. *Annals of Botany* **94**: 311–321.
- Meuriot F, Decau ML, Bertrand AM, Homme MP, Gastal F, Simon JC, Volenec JJ, Avice JC. 2005. Contribution of initial C and N reserves in *Medicago sativa* recovering from defoliation: impact of cutting height and residual leaf area. *Functional Plant Biology* **32**: 321–334.
- Milchunas DG, Sala OE, Lauenroth WK. 1988. A generalized model of effects of grazing by large herbivores on grassland community structure. *The American Naturalist* **132**: 87–106.
- Milchunas DG, Lauenroth WK. 1993. Quantitative effects of grazing on vegetation and soils over a global range of environments. *Ecological Monographs* **63**: 327–366.
- Mollard FPO, Striker GG, Ploschuk EL, Vega AS, Insausti P. 2008. Flooding tolerance of *Paspalum dilatatum* (Poaceae: Paniceae) from upland and lowland positions in a natural grassland. *Flora* **203**: 548–556.
- Mollard FPO, Striker GG, Ploschuk EL, Insausti P. 2010. Subtle topographical differences along a floodplain promote different plant strategies among *Paspalum dilatatum* subspecies and populations. *Austral Ecology* **35**: 189–196.
- Mommer L, Visser EJW. 2005. Underwater photosynthesis in flooded terrestrial plants: a matter of leaf plasticity. *Annals of Botany* **96**: 581–589.
- Mommer L, Pons TL, Visser EJW. 2006. Photosynthetic consequences of phenotypic plasticity in response to submergence: *Rumex palustris* as a case study. *Journal of Experimental Botany* **57**: 283–290.
- Morvan-Bertrand A, Boucaud J, Le Saos J, Prud'homme MP. 2001. Roles of the fructans from leaf sheaths and from the elongating leaf bases in the regrowth following defoliation of *Lolium perenne*. L. *Planta* **213**: 109–120.
- Mustrup A, Albrecht G. 2003. Tolerance of crop plants to oxygen deficiency stress: fermentative activity and photosynthetic capacity of entire seedlings under hypoxia and anoxia. *Physiologia Plantarum* **117**: 508–520.
- Naidoo G, Mundree SG. 1993. Relationship between morphological and physiological responses to waterlogging and salinity in *Sporobolus virginicus* (L) Kunth. *Oecologia* **93**: 360–366.

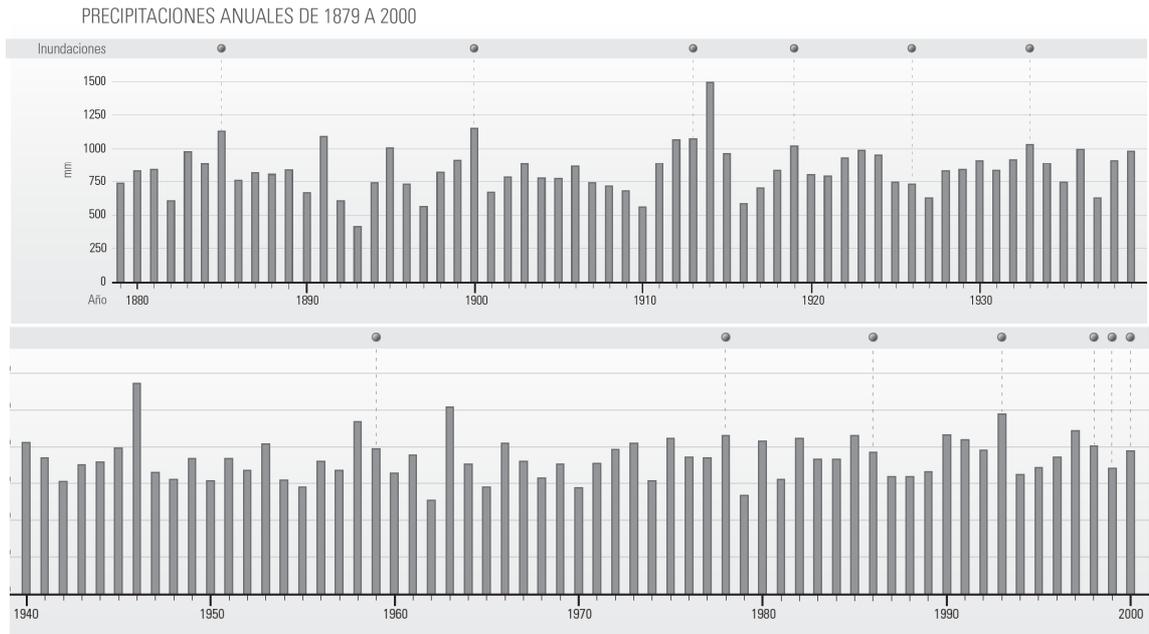
- Noy-Meir I. 1978. Grazing and production in seasonal pastures: analysis of a simple model. *Journal of Applied Ecology* **15**: 809–835.
- Oosterheld M. 1992. Effect of defoliation intensity on aboveground and belowground relative growth rates. *Oecologia* **92**: 313–316.
- Oosterheld M, Loreti J, Semmartin M, Paruelo JM. 1999. Grazing, fire and climate effects on primary productivity of grasslands and savannas. En: *Ecosystems of Disturbed Ground*, (Ed. L.R. Walker), Elsevier, New York, pp. 287-306.
- Oosterheld M, McNaughton SJ. 1991a. Interactive effect of flooding and grazing on the growth of Serengeti grasses. *Oecologia* **88**: 153–156.
- Oosterheld M, McNaughton SJ. 1991b. Effect of stress and time for recovery on the amount of compensatory growth after grazing. *Oecologia* **85**: 305–313.
- Parolin P. 2009. Submerged in darkness: adaptations to prolonged submergence by woody species of the Amazonian floodplains. *Annals of Botany* **103**: 359–376.
- Paruelo JM, Sala OE. 1990. Caracterización de las inundaciones en la Depresión del Salado: dinámica de la capa freática. *Turrialba* **40**: 5–11.
- Pedersen O, Binzer T, Borum J. 2004. Sulfide intrusion in eelgrass (*Zostera marina* L.). *Plant, Cell and Environment* **27**: 595–602.
- Perata P, Pozueta-Romero J, Akazawa T, Yamaguchi J. 1992. Effect of anoxia on starch breakdown in rice and wheat seeds. *Planta* **188**: 611–618.
- Perelman SB, León RJC, Oosterheld M. 2001. Cross-scale vegetation patterns of flooding Pampa grasslands. *Journal of Ecology* **89**: 562–577.
- Pierik R, van Aken JM, Voeselek LACJ. 2009. Is elongation-induced leaf emergence beneficial for submerged *Rumex* species? *Annals of Botany* **103**: 353–357.
- Ponnampetuma FN. 1984. Effects of flooding on soils. In *Flooding and Plant Growth*. T.T. Kozlowski (ed). pp 9–45. *Academic Press*, Orlando, Florida.
- Quinos PM, Insausti P, Soriano A. 1998. Facilitative effect of *Lotus tenuis* on *Paspalum dilatatum* in a lowland grassland of Argentina. *Oecologia* **114**: 427–431.
- Ram PC, Singh BB, Singh AK, Ram P, Singh PN, Singh HP, Boamfa I, Harren F, Santosa E, Jackson MB, Setter TL, Reuss J, Wade LJ, Pal Singh V, Singh RK. 2002. Submergence tolerance in rainfed lowland rice: Physiological basis and prospects for cultivar improvement through marker-aided breeding. *Field Crops Research* **76**: 131–152.
- Revenga C, Murray S, Abramowitz J, Hammond A. 1998. Watersheds of the world: ecological value and vulnerability. *World Resources Institute and Worldwatch Institute*, Washington, DC.
- Rosenthal JP, Kotanen PM. 1994. Terrestrial plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution* **9**: 117–157.
- Rubio G, Casasola G, Lavado RS. 1995. Adaptations and biomass production of two grasses in response to waterlogging and soil nutrient enrichment. *Oecologia* **102**: 102–105.
- Rubio G, Oosterheld M, Álvarez CR, Lavado RS. 1997. Mechanisms for the increase in phosphorus uptake of waterlogged plants: soil phosphorus availability, root morphology and uptake kinetics. *Oecologia* **112**: 150–155.
- Sala OE, Oosterheld M, León RJC, Soriano A. 1986. Grazing effects upon plant community structure in subhumid grasslands of Argentina. *Vegetatio* **67**: 27–32.
- Schlüter U, Crawford RMM. 2001. Long-term anoxia tolerance in leaves of *Acorus calamus* L. and *Iris pseudacorus* L. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2213–2225.
- Schnyder H, de Visser R. 1999. Fluxes of reserve-derived and currently assimilated carbon and nitrogen in perennial ryegrass recovering from defoliation. The regrowing tiller and its component functionally distinct zones. *Plant Physiology* **119**: 1423–1435.

- Seago JL Jr, Marsh LC, Stevens KJ, Soukup A, Votrubová O, Enstone DE. 2005. A reexamination of the root cortex in wetland flowering plants with respect to aerenchyma. *Annals of Botany* **96**: 565–579.
- Setter TL, Laureles EV. 1996. The beneficial effect of reduced elongation growth on submergence tolerance of rice. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1551–1559.
- Shimamura S, Yoshida S, Mochizuki T. 2007. Cortical aerenchyma formation in hypocotyl and adventitious roots of *Luffa cylindrica* subjected to soil flooding. *Annals of Botany* **100**: 1431–1439.
- Schreiber L, Franke R, Hartmann K, Ranathunge K, Steudle E. 2005. The chemical composition of suberin in apoplastic barriers affects radial hydraulic conductivity differently in the roots of rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64) and corn (*Zea mays* L. cv. Helix). *Journal of Experimental Botany* **56**: 1427–1436.
- Schussler EE, Longstreth DJ. 2000. Changes in cell structure during the formation of root aerenchyma in *Sagittaria lancifolia* (Alismataceae). *American Journal of Botany* **87**: 12–19.
- Shiono K, Ogawa S, Yamazaki S, Isoda H, Fujimura T, Nakazono M, Colmer TD. 2011. Contrasting dynamics of radial O<sub>2</sub> loss barrier induction and aerenchyma formation in rice roots of two lengths. *Annals of Botany* **107**: 89–99.
- Sinclair K, Lowe KF, Pembleton KG. 2007. Effect of defoliation interval and height on the growth and quality of *Arachis pintoii* cv. Amarillo. *Tropical Grasslands* **41**: 260–268.
- Skálová H, Krahulec F. 1992. The response of three *Festuca rubra* clones to changes in light quality and plant density. *Functional Ecology* **6**: 282–290.
- Smith D. 1962. Carbohydrate root reserves in alfalfa, red clover, and birdsfoot trefoil under several management schedules. *Crop Science* **2**: 75–78.
- Soriano A. 1991. Río de la Plata Grasslands. In: Coupland RT, ed. *Ecosystems of the world 8A. Natural grasslands. Introduction and Western Hemisphere*. Amsterdam: Elsevier, 367–407.
- Soukup A, Votrubová O, Cizkova H. 2002. Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. *New Phytologist* **153**: 277–287.
- Soukup A, Seago JL Jr, Votrubová O. 2005. The developmental anatomy of the root cortex of the basal monocotyledon, *Acorus calamus* (Acorales, Acoraceae). *Annals of Botany* **96**: 379–385.
- Soukup A, Armstrong W, Schreiber L, Franke R, Votrubová O. 2007. Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: a chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *New Phytologist* **173**: 264–278.
- Striker GG, Insausti P, Grimoldi AA, Ploschuk EL, Vasellati V. 2005. Physiological and anatomical basis of differential tolerance to soil flooding of *Lotus corniculatus* L. and *Lotus glaber* L. *Plant and Soil* **276**: 301–311.
- Striker GG, Insausti P, Grimoldi AA, Vega AS. 2007. Trade-off between root porosity and mechanical strength in species with different types of aerenchyma. *Plant, Cell and Environment* **30**: 580–589.
- Striker GG, Insausti P, Grimoldi AA. 2008. Flooding effects on plant recovery from defoliation in the grass *Paspalum dilatatum* and the legume *Lotus tenuis*. *Annals of Botany* **102**: 247–254.
- Striker GG, Mollard FPO, Grimoldi AA, León RJC, Insausti P. 2010. “Trampling enhances the dominance of graminoids over forbs in flooded grassland mesocosms”. *Applied Vegetation Science* **14**: 95–106.

- Striker GG, Manzur ME, Grimoldi AA. 2011. Increasing defoliation frequency constrains regrowth of *Lotus tenuis* under flooding. The role of crown reserves. *Plant and Soil* **343**: 261–272.
- Summers JE, Jackson MB. 1994. Anaerobic conditions strongly promote extension by stems of overwintering tubers of *Potamogeton pectinatus* L. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1309–1318.
- Suralta RR, Yamauchi A. 2008. Root growth, aerenchyma development, and oxygen transport in rice genotypes subjected to drought and waterlogging. *Environmental and Experimental Botany* **64**: 75–82.
- Taboada MA, Lavado RS. 1986. Características del régimen ácuico de un Natracuol de la Pampa Deprimida. *Ciencia del Suelo* **4**: 66–71.
- Teixeira EI, Moot DJ, Brown HE, Pollock KM. 2007. How does defoliation management impact on yield, canopy forming processes and light interception of lucerne (*Medicago sativa* L.) crops? *European Journal of Agronomy* **27**: 154–164.
- Trought MCT, Drew MC. 1980. The development of waterlogging damage in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) i. shoot and root growth in relation to changes in the concentrations of dissolved gases and solutes in the soil solution. *Plant and Soil* **54**: 77–94.
- Van der Sman AJM, Voeselek LACJ, Blom CWPM, Harren FJM, Reuss J. 1991. The role of ethylene in shoots elongation with respect to survival and seed output of flooded *Rumex maritimus* L. plants. *Functional Ecology* **5**: 304–313.
- Van Eck WHJM, Lenssen JPM, Van de Steeg HM, Blom CWPM, De Kroon H. 2006. Seasonal dependent effects of flooding on plant species survival and zonation: A comparative study of 10 terrestrial grassland species. *Hydrobiologia* **565**: 59–69.
- Vartapetian BB, Jackson MB. 1997. Plant adaptations to anaerobic stress. *Annals of Botany* **79**: 3–20.
- Visser EJW, Cohen JD, Barendse GWM, Blom CWPM, Voeselek LACJ. 1996. An ethylene-mediated increase in sensitivity to auxin induces adventitious root formation in flooded *Rumex palustris* Sm. *Plant Physiology* **112**: 1687–1692.
- Visser EJW, Colmer TD, Blom CWPM, Voeselek LACJ. 2000. Changes in growth, porosity and radial oxygen loss from adventitious roots of selected mono- and dicotyledonous wetland species with contrasting types of aerenchyma. *Plant, Cell and Environment* **23**: 1237–1245.
- Visser EJW, Voeselek LACJ. 2004. Acclimation to soil flooding –sensing and signal–transduction. *Plant and Soil* **254**: 197–214.
- Voeselek LACJ, Harren FJ, Bögemann GM, Blom CWPM, Reuss J. 1990. Ethylene production and petiole growth in *Rumex* plants induced by soil waterlogging: The application of a continuous flow system and a laser driven intracavity photoacoustic detection system. *Plant Physiology* **94**: 1071–1077.
- Voeselek LACJ, Rijnders J, Peeters AJM, Vande Steeg HMV, De Kroon H. 2004. Plant hormones regulate fast shoot elongation under water: from genes to communities. *Ecology* **85**: 16–27.
- Voeselek LACJ, Colmer TD, Pierik R, Millenaar FF, Peeters AJM. 2006. How plants cope with complete submergence. *New Phytologist* **170**: 213–226.
- Westoby M, 1980. Relation between genet and tiller populations dynamics; survival of *Phalaris tuberosa* tillers after clipping. *Journal of Ecology* **68**: 863–869.
- Wiengweera A, Greenway H, Thomson C. 1997. The use of agar nutrient solution to simulate lack of convection in waterlogged soils. *Annals of Botany* **80**: 115–123.

- Wilcox CD, Done SB, McDavid WD, Greer DB. 2002. Image tool for Windows ver. 3.0. The *University of Texas, Health Science Center, Department of Dental Diagnostic Science*, San Antonio, Texas, U.S.A.
- Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Marghirang-Rodríguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, Mackill DJ. 2006. *Sub1A* is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* **442**: 705–708.
- Yemm EW, Willis AJ. 1954. The estimation of carbohydrates in plants extracts by Anthrone. *Biochemistry Journal* **57**: 508–514.
- Zheng S, Lan Z, Li W, Shao R, Shan Y, Wan H, Taube F, Bai Y. 2011. Differential responses of plant functional trait to grazing between two contrasting dominant C3 and C4 species in a typical steppe of Inner Mongolia, China. *Plant and Soil* **340**: 141–155.

## **ANEXO**



**Figura 6.1.** Valores promedio de precipitaciones anuales en la Depresión del Salado. Los círculos indican los años en que se registraron inundaciones. Tomado de Canziani *et al.*, 2001

#### *Evolución de las estrategias en plantas vasculares (sensu Grime, 1977)*

Los factores externos que limitan la biomasa de la planta en un ambiente determinado pueden ser clasificados en dos categorías. La primera, llamada estrés, se refiere a las condiciones que restringen la producción (*e.g.* baja disponibilidad de luz, agua, nutrientes y temperaturas subóptimas). La segunda, llamada disturbio, está asociada con la destrucción total o parcial de la biomasa de la planta y proviene de la acción de los herbívoros, patógenos, antrópica, y de otros fenómenos como el daño por el viento, congelamiento, desecación, erosión del suelo y fuego.

De la combinación de los niveles de estas dos categorías, es evidente que sólo tres de ellas son ambientes viables para las plantas (Cuadro 6.1). Esto es así, ya que en un ambiente altamente disturbado, un estrés severo impide la recuperación o el restablecimiento de la vegetación. Esto sugiere que cada una de las tres combinaciones restantes ha estado asociada con la evolución de un tipo distinto de estrategia, es decir, bajo estrés con bajo disturbio (plantas competitivas), alto estrés con bajo disturbio (plantas tolerantes al estrés), y bajo estrés y alto disturbio (plantas ruderales). Estas tres estrategias son, por supuesto, ‘extremos’ dentro de un gradiente de posibilidades/combinaciones. Los genotipos de la mayoría de las plantas representan compromisos entre las presiones de selección resultantes de las combinaciones particulares de competencia, estrés y disturbio.

**Cuadro 6.1.** Bases de la evolución de las tres estrategias en plantas vasculares

<b>Intensidad del disturbio</b>	<b>Intensidad del estrés</b>	
	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>
<i>Bajo</i>	Estrategia Competitiva	Estrategia Tolerante al Estrés
<i>Alto</i>	Estrategia Ruderal	Estrategia No Viable

**Cuadro 6.2.** Concentraciones de carbohidratos solubles y almidón ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ )  $\pm$  EE, en láminas, vainas y raíces de plantas de *Paspalum dilatatum*.

<b>Compartimento</b>	<b>Carbohidratos solubles (<math>\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}</math>)</b>	<b>Almidón (<math>\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}</math>)</b>
<b>Lámina</b>	$53.9 \pm 6.9$ a	$55.5 \pm 11.2$ b
<b>Vaina</b>	$57.2 \pm 2.5$ a	$91.2 \pm 11.9$ a
<b>Raíz</b>	$27.0 \pm 1.3$ b	$22.0 \pm 4.3$ c

Los valores representan el promedio de seis plantas  $\pm$  el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre compartimentos, basadas en el test de Tukey.