

**Estrés por inundación en leguminosas del género *Lotus*:
estudios morfológicos, anatómicos, fisiológicos, moleculares y
de su relación simbiótica con rizobios**

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

Cristian Javier Antonelli

Ingeniero Agrónomo - Universidad Nacional de La Plata - 2010

Lugar de trabajo:

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas – Instituto Tecnológico de Chascomús
CONICET / Universidad Nacional de General San Martín



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

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Oscar Adolfo Ruiz

Bioquímico (Universidad Nacional del Nordeste)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de estudios

Gustavo Gabriel Striker

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

JURADO

Orlando Mario Aguilar

Licenciado en Biología (Universidad Nacional de La Plata)

Doctor (Universidad Nacional de La Plata)

JURADO

Carlos Guillermo Bartoli

Licenciado en Biología (Universidad Nacional de La Plata)

Doctor (Universidad Nacional de La Plata)

JURADO

Edith Liliana Taleisnik

Bióloga (Universidad Nacional de Córdoba)

Doctora (Ben Gurion University of the Negev, Israel)

JURADO

Marina Omacini

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad CAECE)

Doctora (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 13 de marzo de 2017

Agradecimientos

A mi director Oscar Ruiz, que me brindó su apoyo a lo largo de todo el doctorado y que además siempre trató que yo encontrara lo mejor de mí para cumplir con los objetivos.

A todos los compañeros de la Unidad de Biotecnología N° 1 del IIB-INTECH en Chascomús, y en especial a aquellos que más cerca estuvieron en discusiones y colaboraciones a lo largo de mi trabajo de la tesis: Francisco Escaray, Pablo Calzadilla, María Paula Campestre, María Florencia Babuin, César Bordenave, Ana Perea García, Santiago Maiale, Rubén Rocco; y también a Matías Bailleres de la Chacra Experimental Integrada de Chascomús (CEICH-MAIBA-INTA).

A todos los demás integrantes del INTECH que en mayor o menor grado participaron en mi tarea de alcanzar el grado de doctor, en especial a María Marina por ayudarme en la revisión del manuscrito, a Julia Estrella por ayudarme con los ensayos con rizobios y a Patricia Uchiya por la ayuda en varios experimentos.

A Gustavo Striker por su tarea como consejero de estudios en la Escuela para Graduados “Ing. Agr. Alberto Soriano” de la FAUBA.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de Buenos Aires (CIC) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el financiamiento de las becas de doctorado.

Por último, y no por ello menos importante, a toda mi familia, principalmente a mis padres que me apoyaron en todo momento, aunque mi padre en la última etapa del doctorado no lo haya podido hacer “terrenalmente”, siempre sentí su apoyo.

Declaración

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.

Ing. Agr. Cristian Javier Antonelli

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. IMPORTANCIA MUNDIAL Y REGIONAL DE LAS INUNDACIONES	2
1.2. CONSECUENCIAS DEL ANEGAMIENTO DE LOS SUELOS	4
1.3. LEGUMINOSAS FRENTE AL ANEGAMIENTO DEL SUELO: IMPORTANCIA DEL GÉNERO <i>LOTUS</i>	5
1.4. ACLARACIÓN DE TÉRMINOS Y OBJETIVO GENERAL.....	7
2. CAPÍTULO 2. EFECTOS DE LA INUNDACIÓN (SUMERSIÓN PARCIAL) EN ESPECIES DEL GÉNERO <i>LOTUS</i>	9
2.1. INTRODUCCIÓN.....	10
2.2. HIPÓTESIS	11
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.3.1. <i>Sumersión parcial sobre plantas adultas de Lotus spp.</i>	11
2.3.1.1. Material vegetal.....	11
2.3.1.2. Sistema de cultivo y tratamientos	11
2.3.1.3. Cosecha y determinación de parámetros de crecimiento	12
2.3.1.4. Determinación del intercambio neto de gases.....	13
2.3.1.5. Determinación de parámetros de la eficiencia del fotosistema II	13
2.3.1.6. Estimación de estabilidad de membranas mediante la técnica de pérdida de electrolitos	14
2.3.1.7. Determinación de aerénquima.....	14
2.3.1.8. Diseño experimental y análisis de datos	14
2.3.2. <i>Germinación de Lotus spp. en inundación</i>	17
2.3.2.1. Material vegetal.....	17
2.3.2.2. Sistema de cultivo y tratamientos	17
2.3.2.3. Determinación de germinación	17
2.3.2.4. Diseño experimental y análisis de datos	17
2.4. RESULTADOS	17
2.4.1. <i>Incidencia de la sumersión parcial y de un período de recuperación en la acumulación de biomasa</i>	17
2.4.2. <i>Efecto de la sumersión parcial sobre el intercambio de gases, fotosistema II y pérdida de electrolitos</i>	22
2.4.3. <i>Efecto de la sumersión parcial en la formación de aerénquima y en el diámetro de la base de los tallos</i>	24
2.4.4. <i>Germinación de Lotus spp. en inundación</i>	25
2.5. DISCUSIÓN	26
2.5.1. <i>Efecto de la inundación sobre la producción de biomasa y variables asociadas</i>	26

2.5.2. Efecto de la inundación sobre la fijación de CO ₂ , el estado del PSII y la estabilidad de membrana	29
2.5.3. Generación de aerénquima en inundación	30
2.5.4. Período de recuperación.....	31
2.5.5. Efecto de la inundación sobre la germinación	32
2.6. CONCLUSIONES	33
3. CAPÍTULO 3. EFECTOS DEL ESTRÉS MIXTO DE INUNDACIÓN Y SALINIDAD EN LOTUS SPP.....	34
3.1. INTRODUCCIÓN.....	35
3.1.1. La salinidad y las plantas	35
3.1.2. Salinidad e inundación.....	36
3.1.3. Lotus spp. para ambientes salinos con inundaciones frecuentes.....	37
3.2. HIPÓTESIS	38
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.3.1. Material vegetal	38
3.3.2. Sistema de cultivo y tratamientos.....	38
3.3.3. Cosecha de biomasa.....	39
3.3.4. Determinación del intercambio neto de gases.....	40
3.3.5. Determinación de parámetros de la eficiencia del fotosistema II	40
3.3.6. Determinación de la concentración de iones.....	40
3.3.7. Expresión relativa de genes de compartimentalización subcelular de los iones Cl ⁻ y Na ⁺	41
3.3.8. Diseño experimental y análisis de datos.....	42
3.4. RESULTADOS	43
3.4.1. Efecto del estrés mixto de inundación y salinidad sobre la acumulación de biomasa y sus componentes	43
3.4.2. Efecto del estrés mixto de inundación y salinidad sobre la concentración de iones en las diferentes fracciones de la biomasa	46
3.4.3. Efecto del estrés mixto de inundación y salinidad sobre la expresión relativa de genes vinculados a la compartimentalización subcelular de iones Na ⁺ y Cl ⁻ ...	50
3.4.4. Efecto del estrés mixto de inundación y salinidad sobre la fotosíntesis neta y parámetros del fotosistema II	51
3.5. DISCUSIÓN	52
3.5.1. Efecto del estrés mixto de inundación y salinidad sobre la acumulación de biomasa y fotosíntesis neta	52
3.5.2. Efecto del estrés mixto de inundación y salinidad sobre la concentración de iones en la biomasa de las plantas.....	54
3.5.3. Regulación de genes vinculados a la compartimentalización subcelular de iones Na ⁺ y Cl ⁻	56
3.6. CONCLUSIONES	58
4. CAPÍTULO 4. EFECTOS DE LA INUNDACIÓN SOBRE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO DE LA SIMBIOSIS MUTUALISTA ENTRE LOTUS SPP. - MESORHIZOBIUM LOTI	59
4.1. INTRODUCCIÓN.....	60
4.2. HIPÓTESIS	61
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS	61
4.3.1. Material vegetal	61
4.3.2. Sistema de cultivo y tratamientos.....	61

4.3.3. <i>Evaluación de biomasa</i>	62
4.3.4. <i>Determinación de nitrógeno</i>	62
4.3.5. <i>Determinación de parámetros de la eficiencia del fotosistema II</i>	63
4.3.6. <i>Expresión relativa de genes</i>	63
4.3.7. <i>Diseño experimental y análisis de datos</i>	64
4.4. RESULTADOS	64
4.4.1. <i>Parámetros de crecimiento y formación de nódulos</i>	64
4.4.2. <i>Concentración de nitrógeno en la planta</i>	66
4.4.3. <i>Expresión relativa de genes vinculados a la FBN y a la hipoxia en raíces</i> ..	67
4.4.4. <i>Parámetros de la eficiencia del fotosistema II</i>	68
4.5. DISCUSIÓN	69
4.6. CONCLUSIONES	71
5. CAPÍTULO 5. CONSIDERACIONES FINALES	72
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
7. ANEXO	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Inundaciones a nivel mundial en las últimas 6 décadas.	2
Figura 1.2. Región pampeana argentina.....	3
Figura 1.3. Densidad (carga) bovina en Argentina mostrada por partido o departamento	4
Figura 2.1. Esquema del diseño y los momentos de cosecha del experimento para una accesión dada.	16
Figura 2.2. Efecto de 55 días de sumersión parcial (Inundado) sobre plantas adultas de 5 accesiones de <i>Lotus</i> spp.	19
Figura 2.3. Efecto de 54 días de sumersión parcial (Inundado) sobre el intercambio de gases de plantas adultas de 5 accesiones de <i>Lotus</i> spp.	23
Figura 2.4. Índice de performance (PIabs) de plantas de <i>Lotus</i> spp. de 5 meses de edad	23
Figura 2.5. Integridad de membranas.....	24
Figura 2.6. Formación de tejido aerenquimático en secciones transversales de raíces y diámetro de tallos primarios de plantas de <i>Lotus</i> spp. de 5 meses de edad.....	25
Figura 2.7. Efecto de la inundación (5cm) sobre la germinación de 5 accesiones de <i>Lotus</i> spp.	26
Figura 3.1. Biomasa seca (en g de MS) de plantas de 4 accesiones del género <i>Lotus</i> sometidas a 21 días de tratamientos de sumersión parcial (Inund), salinidad (NaCl), mixto salinidad-inundación (NaCl-Inund) y condición control (Cont).	44
Figura 3.2. Estado fenotípico de las plantas de 4 accesiones del género <i>Lotus</i> en el día 8 desde que se completaron los tratamientos de aclimatación salina.....	45
Figura 3.3. Concentración de iones Na ⁺ y Cl ⁻ en hojas apicales y basales (en μmol por g de MS) de las plantas de 4 accesiones del género <i>Lotus</i> sometidas a 21 días de tratamientos de salinidad (NaCl) y mixto salinidad-inundación (NaCl-Inund).....	47
Figura 3.4. Concentración de K ⁺ (en μmol por g de MS) y relación molar K ⁺ /Na ⁺ en hojas de plantas de 4 accesiones del género <i>Lotus</i> sometidas a 21 días de tratamientos de sumersión parcial (Inund), salinidad (NaCl), mixto salinidad-inundación (NaCl-Inund) y condición control (Cont).....	49
Figura 3.5. Efecto de 21 días de tratamiento mixto salinidad-inundación (NaCl-Inund) sobre 3 accesiones del género <i>Lotus</i>	50
Figura 3.6. Expresión relativa de los genes <i>CLC-f</i> (A) y <i>LtNHX</i> (B) en plantas de 4 accesiones del género <i>Lotus</i> sometidas a 21 días de tratamiento mixto salinidad- inundación (NaCl-Inund) y condición control (Cont).....	50
Figura 3.7. Respuestas fisiológicas de plantas de 4 accesiones del género <i>Lotus</i> sometidas a 21 días de tratamientos de sumersión parcial (Inund), salinidad (NaCl), mixto salinidad-inundación (NaCl-Inund) y condición control (Cont).	52
Figura 4.1. Efecto de 28 días de inundación en sumersión parcial sobre la biomasa de plantas de <i>Lotus japonicus</i> (Lj) y <i>L. tenuis</i> (Lt) en simbiosis con <i>Mesorhizobium loti</i>	65
Figura 4.2. Efecto de 28 días de inundación en sumersión parcial sobre los nódulos de plantas de <i>Lotus japonicus</i> (Lj) y <i>L. tenuis</i> (Lt) en simbiosis con <i>Mesorhizobium loti</i>	66
Figura 4.3. Efecto de 28 días de inundación en sumersión parcial sobre la FBN en plantas de <i>L. japonicus</i> (Lj) y <i>L. tenuis</i> (Lt) en simbiosis con <i>M. loti</i>	67

Figura 4.4. Efecto de 28 días de inundación en sumersión parcial sobre la expresión relativa de genes vinculados a la FBN y al metabolismo fermentativo en plantas de <i>L. japonicus</i> (Lj) y <i>L. tenuis</i> (Lt) en simbiosis con <i>M. loti</i>	68
Figura 4.5. Efecto de 28 días de inundación en sumersión parcial sobre dos parámetros de la eficiencia del fotosistema II en plantas de <i>L. japonicus</i> (Lj) y <i>L. tenuis</i> (Lt) en simbiosis con <i>M. loti</i>	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Efecto de 55 días de sumersión parcial (Inund) y de 35 días de recuperación sobre la biomasa total (g de materia seca/planta) y la formación de raíces adventicias en plantas adultas de 5 accesiones (Acc) de <i>Lotus</i> spp.	20
Tabla 2.2. Efecto de 55 días de sumersión parcial (Inund) y de 35 días de recuperación sobre las relaciones de biomasa en peso seco (Vástago/Raíz y Hoja/Tallo) de plantas adultas de 5 accesiones (Acc) de <i>Lotus</i> spp.	21
Tabla 2.3. Efecto de 55 días de sumersión parcial (Inund) y 35 días de recuperación sobre las tasas de crecimiento relativo en peso seco (TCR, g g ⁻¹ día ⁻¹) de la biomasa aérea (vástago) y total de plantas adultas de 5 accesiones (Acc) de <i>Lotus</i> spp.....	22
Tabla 3.1. Lista de cebadores utilizados	42
Tabla 4.1. Lista de cebadores utilizados	63

ABREVIATURAS

- ADH = alcohol deshidrogenasa
- CLC = familia de canales subcelulares de cloruros
- DE = desvío estándar
- FBN = fijación biológica del nitrógeno
- MS = materia seca
- NHX = familia de intercambiadores subcelulares Na^+/H^+
- PCR = reacción en cadena de la polimerasa
- PDC = piruvato descarboxilasa

RESUMEN

Estrés por inundación en leguminosas del género *Lotus*: estudios morfológicos, anatómicos, fisiológicos, moleculares y de su relación simbiótica con rizobios

Una importante proporción de los suelos de la Pampa Deprimida (PD) se encuentran afectados por condiciones salinas y/o alcalinas. A su vez, la ocurrencia de inundaciones periódicas provoca el anegamiento de suelos. La combinación de condiciones estresantes para las plantas limita la aptitud agrícola de la PD. Si bien algunas leguminosas forrajeras del género *Lotus* son capaces de prosperar en la PD, la obtención de cultivares mejorados incrementaría la oferta forrajera. Con este objetivo, se investigó la respuesta de diferentes materiales de *Lotus* sometidos a estrés por anegamiento, así como a la combinación entre anegamiento y salinidad. Las accesiones más tolerantes durante el anegamiento, y además las que mejor respondieron luego de un período de recuperación, fueron *L. tenuis* (Lt) y un híbrido interespecífico *L. tenuis* x *L. corniculatus* (LtxLc). Se determinó una clara asociación entre la tolerancia al anegamiento y la capacidad de formar aerénquima. Por su parte, bajo las condiciones de estrés mixto de inundación y salinidad, se observó una mejor respuesta del material LtxLc, evidenciada entre otras características, por una mayor acumulación de biomasa en comparación a las otras accesiones. Destacablemente, el anegamiento morigeró los efectos del estrés salino, tanto para LtxLc como en su parental *L. corniculatus* diploide de origen español, encontrándose una conexión con la inducción en la expresión relativa de genes que codifican para transportadores de membranas intracelulares vinculados a la compartimentalización subcelular de los iones Na^+ y Cl^- . Por último se evaluó el efecto del estrés por inundación sobre la FBN en dos especies de *Lotus* (Lt y *L. japonicus*, Lj) contrastantes en su tolerancia a la inundación. Se determinó que la FBN resultó más afectada en Lj debido a una menor cantidad y tamaño de nódulos y a una menor eficiencia de los mismos. Los resultados obtenidos en la tesis, podrían utilizarse como criterios para la obtención de nuevos cultivares tolerantes al estrés por anegamiento y mixto entre anegamiento y salinidad.

Palabras clave: *Lotus* spp., anegamiento, tolerancia, hibridación interespecífica, aerénquima, salinidad, canal de Cl^- , intercambiador Na^+/H^+ , fijación biológica de nitrógeno.

ABSTRACT

Flooding stress in legumes of the *Lotus* genus: morphological, anatomical, physiological and molecular studies, and their symbiotic relationship with rhizobia

An important proportion of the Flooding Pampa soils (FP) are affected by saline and/or alkaline conditions. Moreover, flooding periods usually cause waterlogging in the region. These combined stress conditions reduce FP agronomic aptitude, being cattle production based on natural grasslands (with legumes deficiency) the main activity. Although forage legumes of the *Lotus* genus are able to growth in the FP, obtaining tolerant cultivars would increase the forage availability. With this aim, the flooding and combined saline-flooding stress response was evaluated in different *Lotus* spp. accessions. The most tolerant accessions during the flooding period, and after a recovery period, were *L. tenuis* (Lt) and an interspecific hybrid *L. tenuis* x *L. corniculatus* (LtxLc). A positive relationship between waterlogging tolerance and aerenchyma formation, relative growth rates and biomass production was observed for all the accessions evaluated. Meanwhile, LtxLc presented the best response to the combined stress conditions when compared with the others *Lotus* spp. Interestingly, waterlogging reduced saline stress effects in LtxLc and its parental *L. corniculatus* (LcD), and a positive connection was found with the induction of relative expression of genes coding for intracellular membrane transporters linked to subcellular compartmentalization of Na⁺ and Cl⁻ ions. Lastly, the flooding effect on symbiotic nitrogen fixation (SNF) was evaluated between two *Lotus* spp. (Lt and *L. japonicus*, Lj) contrasting in their tolerance response. The SNF was more affected in Lj due to a lower nodule development and a lower efficiency of them. Our results could be used as breeding criteria for new tolerant cultivars to waterlogging and combined salinity and waterlogging stresses.

Key words: *Lotus* spp., waterlogging, stress tolerance, interspecific hybridization, aerenchyma, salinity, Cl⁻ channel, exchanger Na⁺/H⁺, symbiotic nitrogen fixation.

1. CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Importancia mundial y regional de las inundaciones

Los períodos de inundación constituyen una perturbación natural de importancia creciente que afecta el rendimiento de cultivos y la producción de forraje en muchas regiones del mundo (Rosenzweig *et al.*, 2002). Actualmente se estiman grandes áreas con problemas de anegamiento e inundaciones (>1700 Mha), y se predice un incremento de las mismas para las próximas décadas debido al cambio climático global (Arnell y Liu, 2001; Hirabayashi *et al.*, 2013).

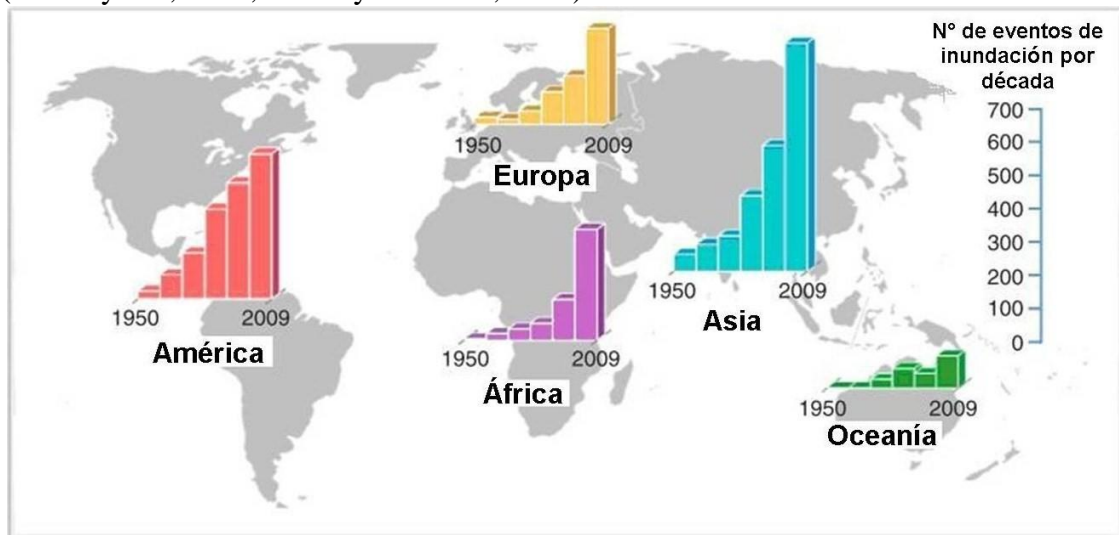


Figura 1.1. Inundaciones a nivel mundial en las últimas 6 décadas. Las barras representan el número de inundaciones por cada década, clasificadas como “desastre” en la Base de Datos Internacional de la Universidad de Lovaina (Bélgica). Se muestra el período que comprende desde 1950 a 2009 por continentes. (Adaptado de Bailey-Serres *et al.*, 2012).

La situación en la Pampa Deprimida de la provincia de Buenos Aires, se ve agravada por ser una llanura totalmente plana o con pendiente muy reducida (menor a 0,1 %), por lo tanto el escurrimiento es muy limitado. A dicha condición se suma la existencia de horizontes del suelo muy arcillosos que condicionan una rápida infiltración del agua. Por todo ello, en la Pampa Deprimida las inundaciones significan un disturbio natural de ocurrencia casi anual (Figura 1.2). Dichas inundaciones ocurren en los puntos topográficos más bajos, los cuales abarcan gran parte de toda la región, y suceden generalmente a comienzos de cada primavera (Paruelo y Sala, 1990). La totalidad de la región abarca un área muy significativa de la provincia de Buenos Aires y cuenta con una superficie de aproximadamente 10,5 millones de ha (Burkart *et al.*, 2005).

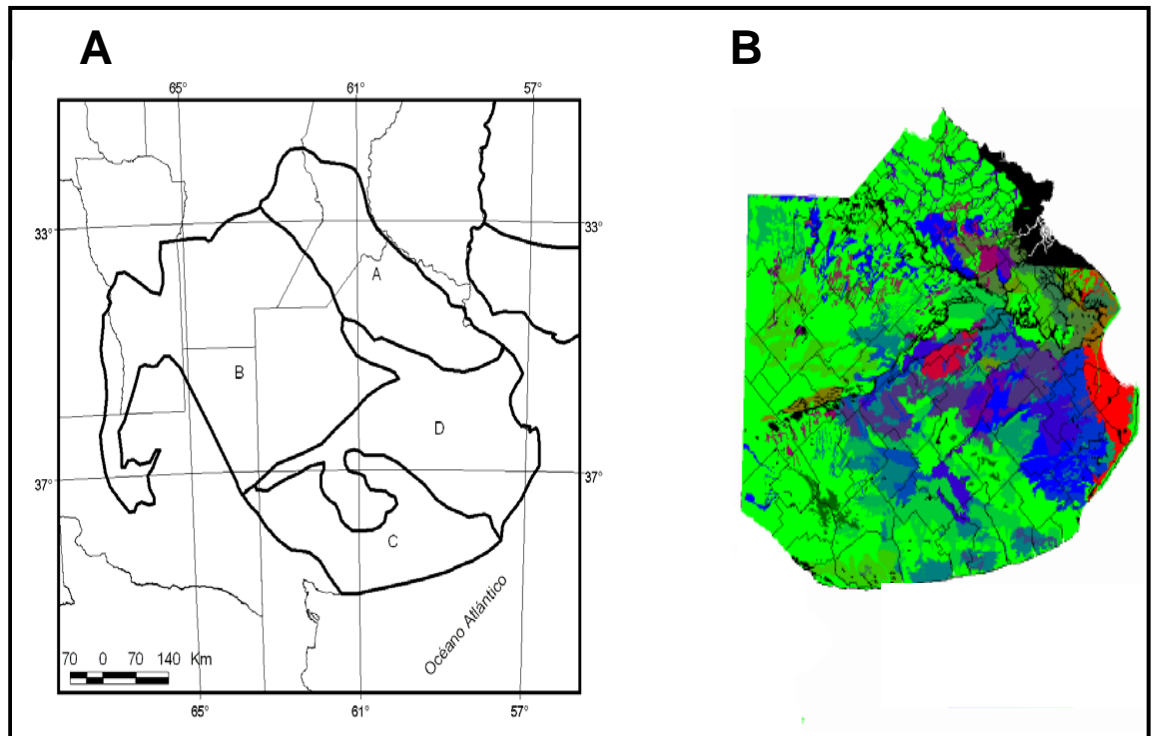


Figura 1.2. Región pampeana argentina. **A:** esquema de las subregiones de la región pampeana argentina. (A): Pampa Ondulada; (B): Pampa Interior; (C): Pampa Austral y (D): Pampa Deprimida. **B:** imagen que muestra en diferentes colores, las comunidades potenciales de pastizales distribuidas según las características geomorfológicas. En azul las zonas inundables de praderas húmedas de mesófitas y de hidrófilas, en rojo estepas de halófitas y en verde praderas de mesófitas. (Adaptado de Burkart *et al.*, 2005).

Por otra parte, además de los problemas de anegamiento antes mencionados en esta región, se encuentran frecuentemente rasgos de salinización y/o alcalinidad con alta sodicidad. En este sentido, alrededor de un 80 % de toda la superficie de la Pampa Deprimida cuenta con al menos una de las limitantes mencionadas (León *et al.*, 1979; Soriano, 1991; Maiola *et al.*, 2003). Por todo lo expuesto es que dichos suelos presentan una escasa aptitud agrícola que obliga a la mayoría de los productores a dedicarlos a la ganadería de cría utilizando pastizales naturales como principal recurso forrajero (Montes, 1988; Soriano, 1991). De hecho esta región es considerada la zona de ganadería de cría más importante del país (Rearte, 1997), siendo la región con mayor número de ganado bovino, así como con los valores más altos de densidad (carga) bovina del país (Figura 1.3). Por otra parte, en las últimas décadas, el avance de la agricultura hacia zonas de suelos más restrictivos, ha restado superficie a la práctica ganadera, incrementando la carga animal y la presión de pastoreo sobre los pastizales naturales. Como resultado se ha llegado en la actualidad a sistemas de producción sensiblemente más intensivos (Rearte, 2004, Manuel-Navarrete *et al.*, 2007).

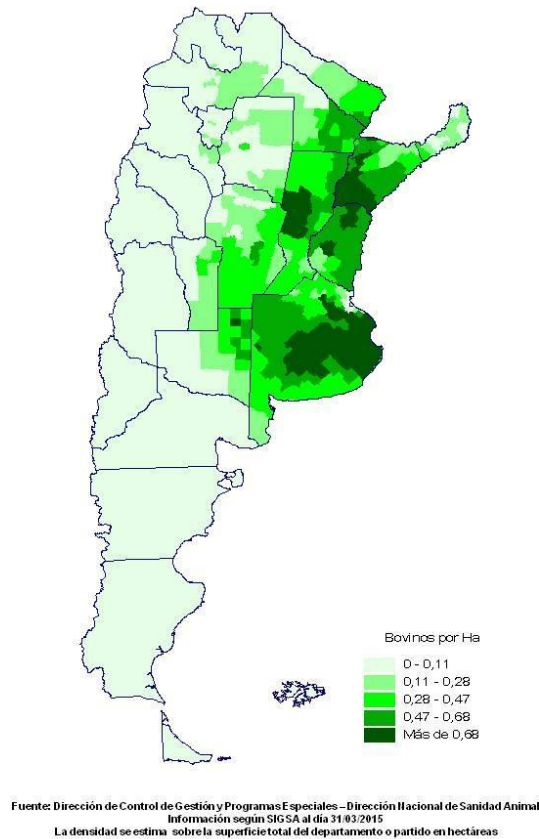


Figura 1.3. Densidad (carga) bovina en Argentina mostrada por partido o departamento. (Fuente: SENASA, 2015).

Este tipo de ambientes restrictivos para la agricultura, que es por naturaleza escaso en leguminosas originarias (Vervoort 1967, León *et al.* 1979), también es limitante para el establecimiento y persistencia de forrajeras leguminosas tradicionales como la alfalfa y el trébol blanco. Los intentos por implantarlas en esta región han sido muy poco exitosos (Mazzanti *et al.*, 1988; León *et al.*, 2007). Cabe mencionar, que la incorporación de leguminosas forrajeras a los sistemas ganaderos mejora la sustentabilidad y producción de estos ya que, incorporadas a las pasturas, incrementan el aporte de proteína y la digestibilidad del forraje en comparación con pasturas basadas únicamente en gramíneas (Buxton, 1996).

1.2. Consecuencias del anegamiento de los suelos

Poco después de que se produce el anegamiento del suelo, la actividad de las raíces y de los microorganismos derivan en un rápido agotamiento de la disponibilidad de oxígeno (Ponnamperuma, 1984). Mientras permanece el anegamiento, el oxígeno no es reincorporado al suelo, debido a su baja solubilidad en agua ($0,28 \text{ mol m}^{-3}$ a 20 °C) y a la baja capacidad de difusión de este gas a través de los poros saturados de agua (calculándose dicha difusión alrededor de 320.000 veces menor que a través de dichos poros con presencia exclusivamente de gas) (Armstrong y Drew, 2002). La tasa de consumo de oxígeno depende no solo de la actividad microbiana y de las raíces, sino de la temperatura y del contenido de carbono del suelo. Además del efecto en la

disminución de la concentración de oxígeno, el anegamiento puede provocar a largo plazo la acumulación de otros compuestos que influyen en el crecimiento de las plantas, tales como dióxido de carbono, etileno y productos orgánicos del metabolismo anaeróbico (etanol y ácidos orgánicos). Por otro lado, los organismos anaerobios, con actividad creciente en estos suelos con baja oxigenación, pueden generar una reducción en los niveles de NO_3^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} y SO_4^{2-} y acumular sus formas reducidas (Mn^{2+} , Fe^{2+} , H_2S y S_2^-) causantes de fitotoxicidad (Ponnamperuma, 1984; Greenway *et al.*, 2006).

Un suelo anegado con sus características, tiene consecuencias sobre las plantas que se encuentren sobre éste. En este sentido, el ambiente hipóxico o anóxico, provoca una secuencia de cambios en las plantas relacionados con su supervivencia que incluyen alteraciones de los procesos fisiológicos, así como ajustes anatómicos y morfológicos (Armstrong, 1979; Koslowski y Pallardy, 1984; Voesenek y Blom, 1989). A nivel fisiológico, el cierre de estomas, con o sin deshidratación de la hoja, la reducción de la transpiración y la inhibición de la fotosíntesis, son respuestas comunes que pueden ocurrir en horas o días, dependiendo de la tolerancia a la inundación de cada especie. Cuando la inundación es intensa, las plantas de especies sensibles reducen drásticamente su actividad fisiológica y frecuentemente mueren en poco tiempo (Else *et al.*, 1996). Por el contrario, se han descrito especies tolerantes que frente a un evento de anegamiento, no modifican algunos parámetros como la conductancia estomática, el potencial hídrico y la fotosíntesis (Naidoo y Naidoo, 1992; Insausti *et al.*, 2001). A nivel anatómico, la generación de tejido aerenquimático, o simplemente denominado aerénquima, es la respuesta más frecuentemente observada frente a esta situación de estrés (Justin y Armstrong, 1987). Dicho tejido constituye un sistema de lagunas o espacios de aire interconectados el cual provee un camino de resistencia más baja al oxígeno, facilitando su transporte desde los vástagos a las raíces, permitiendo su crecimiento y la exploración del suelo en esas condiciones (Armstrong, 1979; Colmer y Greenway, 2005). Además, entre las respuestas comunes a la inundación también se incluye un incremento en la altura de la planta y consecuentemente, en la proporción de biomasa sobre el nivel del agua (Naidoo y Mundree, 1993; Grimoldi *et al.*, 1999). Esto también contribuye a la oxigenación de los tejidos sumergidos, por medio del tejido aerenquimático (Laan *et al.*, 1990).

En anegamientos transitorios, los efectos adversos sobre las plantas pueden ocurrir durante el propio evento así como también después que retrocede el agua, sobre todo si las raíces remanentes son superficiales y se seca el horizonte superficial del suelo (Barrett-Lennard, 2003).

1.3. Leguminosas frente al anegamiento del suelo: importancia del género *Lotus*

Las leguminosas asociadas a rizobios, presentan la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico mediante la denominada fijación biológica de nitrógeno (FBN), la cual constituye uno de los mecanismos más eficientes y menos contaminantes para la nutrición vegetal. La FBN les otorga a las leguminosas una ventaja para la adaptación a ecosistemas marginales en los cuales actúan como “especies pioneras” durante la colonización. La infección de los rizobios en las raíces de leguminosas, produce una formación de nuevos órganos, que se denominan nódulos (Hirsch *et al.*, 2001). En las leguminosas terrestres, el sistema de raíces noduladas que permite la FBN, parece ser muy sensible a la condición de anegamiento del suelo, ya que se ha encontrado que la

misma se reduce fuertemente por dicha condición ambiental (Bacanamwo y Purcell, 1999; Shimamura *et al.*, 2002; Loureiro *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2011).

Por otro lado, las especies del género *Lotus* presentan gran adaptabilidad a diversos ecosistemas, entre otros, aquellos sujetos a períodos de inundación. Este género, nativo de la cuenca del Mediterráneo, se encuentra ampliamente distribuido alrededor del mundo, con especies adaptadas a las más diversas condiciones ambientales y del suelo, condiciones donde otras leguminosas forrajeras más tradicionales generalmente no prosperan, por lo que representan una alternativa para incrementar la productividad primaria y la calidad forrajera de los pastizales naturales (Blumenthal y McGraw, 1999; Striker *et al.*, 2005; Escaray *et al.*, 2012).

Lotus corniculatus L. y *L. tenuis* Waldst. et Kit. son leguminosas perennes estivales frecuentemente utilizadas para incrementar la producción de pasturas en suelos pobres y en pastizales naturales (Dear *et al.*, 2003). *L. tenuis* se ha naturalizado en la región de la Pampa Deprimida, la cual como ha sido mencionado anteriormente, sufre periódicos eventos de inundación (Soriano, 1991). Esta leguminosa le debe su éxito de implantación en dichas condiciones, en parte a su capacidad para alterar fácilmente su hábito de crecimiento. Así, en respuesta a muy diversas situaciones ambientales que condicionan su desarrollo, presenta fenotipos con crecimiento postrado bajo condición de pastoreo, y con crecimiento erecto, cambiando sus vástagos a una posición ortotrópica, bajo condiciones de inundación (Striker *et al.*, 2008) o bajo condiciones de canopia cerrada (Striker *et al.*, 2011). La capacidad de esta especie para cambiar su morfología de acuerdo al ambiente en el que se encuentra, le otorga mejores oportunidades de prosperar bajo diversas condiciones de crecimiento (Sultan, 2000).

Ambas especies difieren agrónomicamente ya que ocupan dos hábitats distintos; *L. tenuis* se adapta a los bajos inundables, mientras que *L. corniculatus*, si bien es considerada una especie de mayor valor agronómico debido a su mayor producción de forraje y a un nivel óptimo de taninos condensados (Hagerman y Butler, 1981), solo logra implantarse en zonas de mejores condiciones edáficas y no tolera las condiciones marginales en forma similar a *L. tenuis* (Vignolio *et al.*, 2002; Lagler, 2003; Striker *et al.*, 2005). Con respecto a los taninos condensados, estos son de gran importancia en concentraciones adecuadas en el forraje. Se sabe que niveles de hasta 45 mg g⁻¹ de MS otorgan beneficios a la dieta de los rumiantes, tales como evitar el meteorismo o empaste, mejorar el aprovechamiento de la fracción proteica de la dieta, efectos contra parásitos intestinales y disminución de fermentación entérica con la consecuente reducción de emisión de gases del efecto invernadero (principalmente metano) (Min *et al.*, 2003). Por estos beneficios, radica la importancia de obtener materiales forrajeros con niveles adecuados de taninos condensados que sean aptos para establecerse en la extensa superficie con ambientes inundables de la Pampa Deprimida.

Por otra parte, se ha descrito que *L. tenuis* realiza una eficiente utilización de fósforo (Mendoza, 2001; Kade *et al.*, 2003; Sannazzaro *et al.*, 2004), establece asociaciones simbióticas con rizobios y micorrizas aún bajo condiciones de inundación (Mendoza *et al.*, 2005) y tiene una buena calidad nutricional, incluso cuando está creciendo bajo estrés salino (Robinson *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, a las especies de *Lotus* cultivadas como forrajeras se las ha definido como especies alógamas obligadas, lo que resulta en un alto grado de heterocigosis dentro de las poblaciones (Fernandes, 1981; Kramina, 1999). En este sentido, la variabilidad inter- e intra-específica en el género *Lotus*, hace que sea un género auspicioso de explorar con objetivos de mejoramiento genético de posibles nuevas variedades. Es menester destacar que *L. tenuis* constituye una especie diploide (2n=2x=12) mientras que las poblaciones comerciales de *L. corniculatus* en América

del Sur se han descrito como tetraploides ($2n=4x=24$). La diferencia en el nivel de ploidía genera dificultad para lograr cruzamientos exitosos y obtener híbridos interespecíficos fértiles. Sin embargo, nuestro grupo de trabajo, ha sumado una nueva población diploide europea identificada como *L. corniculatus* subsp. *corniculatus* la cual es nativa del Parque Natural de la Albufera de Valencia (España), donde existen zonas que comparten características edáficas marginales similares a los suelos de la Pampa Deprimida. En estas zonas, denominadas “malladas”, se encuentran especies adaptadas a condiciones de anegamiento, deficiencia de nutrientes, salinidad y alcalinidad. Debido a sus particulares características, en nuestro laboratorio hemos utilizado la misma como parental para la obtención de un híbrido interespecífico: *L. tenuis* x *L. corniculatus*. El otro parental usado fue una población de *L. tenuis* argentina (Escaray *et al.*, 2014). El material híbrido obtenido, es altamente fértil y posee características de ambos parentales. Por ejemplo, la población diploide de *L. corniculatus* presenta niveles altos de taninos condensados foliares y rizomas (los rizomas son importantes en la persistencia de las plantas en las pasturas), y las dos características han sido encontradas en la F1 híbrida. En cuanto a los contenidos de taninos foliares la descendencia presenta valores intermedios entre los parentales, siendo estos últimos valores potencialmente óptimos para la alimentación bovina (Escaray *et al.*, 2014).

Este híbrido interespecífico, aún no ha sido evaluado frente a estrés por inundación y estrés de tipo mixto entre inundación y salinidad comunes en suelos restrictivos.

Por otro lado, es importante mencionar que el género *Lotus* presenta además una ventaja comparativa de relevancia con respecto a otros géneros vegetales, dado que la especie *L. japonicus*, ha sido seleccionada como especie modelo, lo que ha dado lugar a numerosos estudios genéticos, bioquímicos y fisiológicos (Udvardi *et al.*, 2005). Esta especie se encuentra taxonómicamente muy cercana a las especies antes mencionadas (Young *et al.*, 2003).

1.4. Aclaración de términos y objetivo general

En trabajos previos en donde se evalúa el estrés por inundación, se ha detectado una amplia variación en las condiciones de evaluación y en el uso de los términos implementados para describir dicha condición de estrés. La mayor diversidad se encuentra dada fundamentalmente en aspectos de intensidad (relacionado a la profundidad de la inundación) y a la duración del estrés. En este trabajo de tesis los términos vinculados al concepto general de “inundación” se definen de la siguiente manera: Anegamiento: constituye la inundación de todo el sistema radicular de la planta.

Sumersión parcial: considerada como aquella inundación del sistema radicular y una parte del vástago que comúnmente se la denomina como encharcamiento. Cabe aclarar que este fue el tipo de estrés empleado en los tres capítulos del presente trabajo de tesis.

Sumersión total: considerada cuando se genera una inundación de toda la planta, sin que quede en contacto ninguna parte de la misma con la atmósfera.

Con respecto al material vegetal del género *Lotus* evaluado en esta tesis, y el cual fue detallado en cada capítulo experimental, debe considerarse que todos ellos son heterogéneos, incluyéndose poblaciones de colecta propia, otros de variedades cultivadas comerciales (cv), una población híbrida interespecífica y un ecotipo autógeno. A los fines de generalizar una denominación común, a lo largo del trabajo se denominan indistintamente a todos ellos como “accesiones”.

Como **objetivo general** de este trabajo de tesis se propuso: *Ampliar el conocimiento existente sobre el género Lotus y su relación simbiótica con rizobios, mediante estudios fisiológicos, morfológicos, anatómicos y moleculares con la finalidad de incrementar su aprovechamiento en áreas inundables, tales como los de la Pampa Deprimida.*

**2. CAPÍTULO 2. EFECTOS DE LA INUNDACIÓN (SUMERSIÓN PARCIAL)
EN ESPECIES DEL GÉNERO *Lotus***

2.1. Introducción

La sumersión parcial, como se mencionó en la introducción general, provoca una rápida disminución del oxígeno a nivel de la rizósfera lo que ocasiona una serie de efectos y respuestas sobre las plantas que quedan con sus tejidos sumergidos. Las respuestas generales son observadas en diferentes niveles: a nivel fisiológico (reducción absorción de agua, cierre estomático, cambios en el balance hormonal); a nivel morfológico (desarrollo de raíces adventicias, número de tallos y ramificaciones) y anatómico (aparición de hipertrofias, aerénquima). Generalmente se asocia a una mayor tolerancia a la inundación a aquellas plantas capaces de desarrollar tales características eficazmente (revisado por Voesenek y Bailey-Serres, 2015).

Considerando las especies del género *Lotus*, la única especie que se ha naturalizado en la Pampa Deprimida hasta el momento ha sido *L. tenuis*. Se le adjudica la capacidad de naturalizarse a una serie de características que le posibilitan el estar adaptada a los suelos presentes en esta región. Entre esas características, la principal ha sido su capacidad de tolerar períodos en que el suelo se encuentra anegado y/o encharcado, tolerando en mayor medida esta condición que los cultivares de *L. corniculatus*. Esta tolerancia relativa superior de *L. tenuis* ha sido principalmente adjudicada a una mayor capacidad de formar tejido aerenquimático y raíces adventicias (Vignolio *et al.*, 1999; Striker *et al.*, 2005; Real *et al.*, 2008). Sin embargo, la especie *L. corniculatus*, tal cual se mencionó anteriormente, es considerada de mejor valor agronómico debido principalmente a su mayor potencial en producción de forraje y a su nivel óptimo de taninos condensados foliares (Hagerman y Butler, 1991). Como desventaja, los cultivares disponibles de *L. corniculatus* no han sido capaces de persistir en las condiciones de suelos anegables, por lo que se justifica la búsqueda de materiales con características forrajeras óptimas como las de *L. corniculatus* pero con tolerancia a suelos anegables.

Por lo anteriormente mencionado, mediante la hibridación interespecífica entre estas especies, (detallada en la sección 1.3 de este trabajo de tesis) se podrían obtener materiales promisorios con potencial forrajero que posean características de ambos parentales (forraje de mejor calidad para suelos de baja aptitud agrícola).

En este capítulo de tesis, se propuso como **objetivo** evaluar las respuestas de crecimiento, morfológicas, fisiológicas y anatómicas en plantas adultas de distintas accesiones de especies del género *Lotus*, frente al estrés por inundación. Se aplicó un estrés de inundación del tipo sumersión parcial en un período prolongado durante la primavera (55 días), condiciones las cuales simulaban sucesos frecuentes de la región de la Pampa Deprimida (Paruelo y Sala, 1990). También se incluyó en la evaluación un período de recuperación post-inundación de 35 días. Las accesiones evaluadas fueron: el híbrido interespecífico mencionado, sus accesiones parentales, el cultivar tetraploide de *L. corniculatus* “San Gabriel” ampliamente utilizado y un ecotipo de *L. japonicus*, (especie modelo de leguminosas de nodulación determinada). Complementariamente a los estudios de inundación en estadios adultos, las mismas accesiones se evaluaron bajo inundación en la etapa de germinación con el fin de determinar si existe una relación de la tolerancia en los distintos estadios fenológicos.

2.2. Hipótesis

Considerando que la población de *Lotus corniculatus* diploide con la cual se trabaja en nuestro laboratorio evolucionó en un ambiente inundable y que se conoce la elevada tolerancia de *L. tenuis* frente al estrés por inundación, se realizan las siguientes predicciones como **hipótesis**:

- a) La población diploide de *L. corniculatus* de la Albufera de Valencia, por estar adaptada a zonas inundables en su lugar de origen, tiene características morfológicas y anatómicas más aptas para tolerar períodos prolongados de sumersión parcial que el cv. comercial tetraploide de *L. corniculatus* (San Gabriel).
- b) Las características morfológicas y fisiológicas (la capacidad de generar abundante aerénquima y raíces adventicias entre otras) que le conceden a la especie *L. tenuis* una elevada tolerancia frente a la sumersión parcial son transferidas a la descendencia híbrida en el cruzamiento interespecífico con *L. corniculatus* de la Albufera de Valencia. De esta manera el híbrido interespecífico obtenido en procura de realizar una mejora de la calidad forrajera, posee también las características de tolerancia al estrés por sumersión parcial.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Sumersión parcial sobre plantas adultas de *Lotus* spp.

2.3.1.1. Material vegetal

El material vegetal utilizado consistió en lotes de semillas de las siguientes accesiones:

- Una población de *Lotus tenuis* naturalizada en un bajo inundable de la Pampa Deprimida (Lt).
- Una población diploide de colecta propia de *L. corniculatus* proveniente de las malladas salinas en la Devesa de la Albufera de Valencia, España (LcD).
- La primera generación de un híbrido interespecífico de población (LtxLc), obtenido entre las poblaciones Lt y LcD.
- El cultivar comercial “San Gabriel” de *L. corniculatus* tetraploide (LcT).
- El ecotipo Miyakojima MG-20 de *L. japonicus* (Lj).

2.3.1.2. Sistema de cultivo y tratamientos

A principios del mes de mayo, se tomaron semillas de las accesiones anteriormente descritas y se las escarificó con ácido sulfúrico concentrado (98 %). Para ello, se colocaron las semillas en tubos plásticos de 50 ml y se agregó ácido en una cantidad suficiente para cubrir las. Luego se las agitó vigorosamente con un agitador durante 3 minutos. El ácido sulfúrico se retiró de los tubos e inmediatamente se hicieron 10 lavados con agua destilada. Las semillas así escarificadas se sembraron en placas de Petri que contenían agar-agua al 0,8 % (p/v), y luego se trasladaron a la cámara de cultivo. Una vez que las plántulas tuvieron los cotiledones expandidos, se transplantaron (una plántula por cada maceta) y se ubicaron en invernáculo. Se usaron macetas de polietileno de 4 l de capacidad, conteniendo una mezcla de suelo y arena (1:1) previamente tamizada y homogeneizada. El suelo usado provino de los primeros 20 cm del horizonte superficial de un bajo “dulce” inundable de un lote que posee el campo experimental del IIB-INTECH en el partido de Chascomús. El suelo utilizado tuvo las características típicas de los ambientes de bajos inundables (Fósforo: 6,3 ppm; pH: 6,28;

CE: 0,54 dS; MO: 8,8 %; N total: 0,25 %). Las plantas se regaron con agua de lluvia acumulada en tanques destinados a este propósito y no se agregó ningún tipo de fertilizante a lo largo del cultivo de las mismas.

Las plantas se cultivaron durante 5 meses hasta la aplicación de los tratamientos “control” e “inundación” en el comienzo del mes de octubre. Esto simularía encharcamiento o anegamiento propios de principios de primavera, como frecuentemente ocurren en los suelos de bajo y de media loma con las lluvias abundantes de dicha época en la región de la Pampa Deprimida.

El tratamiento de inundación en este experimento consistió en someter a las plantas a una sumersión parcial con agua de lluvia, manteniendo el nivel de agua en 6 cm (± 1 cm) sobre el nivel de la superficie de suelo de la maceta, durante 55 días. El mismo se logró colocando por fuera de cada maceta, una más grande pero sin vías de drenaje. El tratamiento control consistió en el cultivo de las plantas regadas diariamente y con libre drenaje, manteniendo la humedad del sustrato en no menos del 80 % de capacidad de campo. Posteriormente, a los 55 días de aplicada y mantenida la inundación, y luego de la cosecha denominada fin de inundación realizada solo a un grupo de plantas, a un grupo similar se las retiró de la situación de estrés eliminándose el tratamiento de sumersión, y cambiándolas a un sistema con libre drenaje similar al utilizado en los individuos controles. Luego de 35 días, a este último grupo de plantas se las cosechó en el momento denominado a los fines experimentales como fin de recuperación.

2.3.1.3. Cosecha y determinación de parámetros de crecimiento

Se realizaron cosechas en tres fechas a lo largo del experimento, y en cada fecha se cosecharon plantas tanto del tratamiento en sumersión parcial como de la condición control de todas las accesiones evaluadas (Figura 2.1):

- Día cero o inicio de tratamiento. Se consideró como día cero el momento en que se comenzó con el tratamiento de sumersión parcial a las plantas de 5 meses de crecimiento otoño-invernal. En esta fecha se cosecharon 10 plantas por cada accesión evaluada.
- Fin de inundación. Se consideró esta fecha de cosecha de biomasa una vez transcurridos 55 días desde el inicio del tratamiento de sumersión parcial. En esta instancia se cosecharon 14 plantas elegidas aleatoriamente por cada tratamiento, es decir que por cada accesión se tomaron 14 plantas controles y 14 plantas en sumersión parcial.
- Fin de recuperación. Esta fecha de cosecha se realizó después de 35 días desde el momento en que se terminó con el tratamiento aplicado de sumersión, dejando a las plantas con libre drenaje tal cual las controles.

La cosecha para cada una de las tres fechas, consistió en descalzar cada planta del sustrato, lavando cuidadosamente las raíces y separando la biomasa total de cada individuo en tres fracciones: hojas, tallos y raíces. Estas fracciones de biomasa se colocaron en sobres de papel y secadas en estufa a 70 °C durante 3 días hasta peso constante. Luego de secadas las muestras, se pesaron con balanza analítica.

En el momento de cada una de las fechas de cosecha y por cada planta, también se registraron los siguientes parámetros: el número de tallos primarios y secundarios de más de 5 cm de longitud; el número de raíces adventicias y la longitud de los 5 tallos más largos. En la cosecha de fin de inundación, también por cada planta se midió el diámetro de 3 tallos principales a 3 cm desde la corona, registrado con un calibre manual con escala de Vernier o nonio con precisión de 0,1 mm. Los 3 valores de grosor

por cada planta se promediaron y así se obtuvo un solo valor por planta para el análisis de esta variable.

A partir de los datos de biomasa determinados en las tres diferentes fechas de cosecha se calculó la tasa de crecimiento relativo (TCR) para los diferentes períodos del experimento: para el período transcurrido entre las fechas de inicio y fin de inundación (período de inundación), para el período transcurrido entre fin de inundación y fin de recuperación (período de recuperación) y para el período total transcurrido entre la fecha de inicio de inundación y fin de recuperación (período total). La TCR se calculó usando la ecuación descrita por Malik *et al.* (2011):

$$\text{TCR} = (\text{LN MS}_2 - \text{LN MS}_1) / (t_2 - t_1)$$

donde, para los distintos períodos evaluados: MS_1 es la biomasa seca (g) en el inicio del período considerado; MS_2 es la biomasa seca (g) al final del mismo período; t_1 y t_2 son los días del comienzo y del final del período evaluado, siempre contados desde el día cero, el cual corresponde al día del transplante de cada plántula; LN es el logaritmo natural. En el cálculo de la TCR se asume que las tasas de crecimiento diario, son constantes durante cada período considerado.

También se calcularon las relaciones entre la biomasa aérea (vástagos) y la biomasa de raíz (V/R) y entre la biomasa de hojas y la biomasa de tallos (H/T).

2.3.1.4. Determinación del intercambio neto de gases

Un día antes de la cosecha de fin de inundación, a 54 días desde el comienzo del tratamiento de inundación, se determinó el intercambio de gases utilizando un analizador de gases portátil (TPS-2 PP System, Amesbury, MA, USA) en condición de concentraciones atmosféricas de CO_2 (aproximadamente 380 ppm), y de irradiancias saturantes para plantas de metabolismo C_3 ($1500 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{seg}^{-1}$, suministrada por luz LED del propio equipo). Las mediciones se realizaron sobre una hoja totalmente desarrollada del tercio medio de cada planta. De esta manera se midieron las tasas de intercambio neto de CO_2 a luz saturante (Asat) y conductancia estomática (GS).

2.3.1.5. Determinación de parámetros de la eficiencia del fotosistema II

Dos días antes de la cosecha de fin de inundación, es decir a los 53 días del comienzo del tratamiento de inundación, se determinaron los parámetros de la eficiencia del fotosistema II (PII), mediante la fluorescencia transitoria de la clorofila. Las determinaciones consistieron en análisis OJIP utilizando un fluorómetro portátil (Pocket Pea, Hansatech Instrument, UK) en hojas preadaptadas a la oscuridad por no menos de 20 minutos. Las determinaciones se realizaron en la tercera hoja expandida desde el ápice. Las lecturas obtenidas se analizaron mediante el programa Handy PEA (PEA Plus V1.10), calculándose el rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria ($\phi\text{Po} = \text{TRo}/\text{ABS} = \text{Fv}/\text{Fm}$). También se calculó la contribución a la regulación de la fotosíntesis por los tres pasos funcionales de absorción de energía de la luz (ABS), de captura de la energía de excitación (TR) y la conversión de la energía de excitación de transporte de electrones (ET) los cuales se expresaron a través del término multi-paramétrico denominado índice de performance (PIabs; Strasser *et al.*, 2000): $\text{PIabs} = (\text{RC}/\text{ABS}) \cdot [\phi\text{Po}/(1-\phi\text{Po})] \cdot [\Psi\text{o}/(1-\Psi\text{o})]$.

2.3.1.6. Estimación de estabilidad de membranas mediante la técnica de pérdida de electrolitos

En la fecha de cosecha fin de inundación, se colectaron los tres folíolos apicales de la quinta hoja expandida, contando a partir del ápice, de tres ramas diferentes por cada planta de los distintos tratamientos. Posteriormente se colocó un volumen de 15 ml de agua bi-distilada en tubos de plástico de 50 ml y se determinó la conductividad eléctrica (CE), la cual se denominó conductividad a tiempo cero (t_0). Luego se sumergieron los 9 folíolos en cada tubo y se los dejó 24 horas en agitación. Luego de finalizado ese tratamiento se determinó nuevamente la CE y se denominó conductividad a tiempo 1 (t_1). Finalmente se autoclavaron los tubos durante 20 minutos, a una presión de 1 atm y a 120 °C y posteriormente se determinó la CE a tiempo 2 (t_2). Con los tres valores de CE, se calcularon la pérdida de electrolitos porcentual (E) conforme a la ecuación $E_{total} = (t_1 - t_0)/(t_2 - t_0) * 100$ y la integridad de membranas (I%) según la ecuación $I\% = (1 - (t_1 - t_0)/(t_2 - t_0)) * 100$ (Lee *et al.*, 1993).

2.3.1.7. Determinación de aerénquima

La anatomía de los cortes transversales de raíz se observó con microscopio óptico. Para ello se colectaron segmentos de raíces de aproximadamente 1 cm de largo, a partir de 2,5 cm medidos desde el ápice. Estos segmentos se lavaron cuidadosamente y luego se preservaron en el fijador Formaldehído : Alcohol : Ácido Acético : Agua (FAA) (2:10:1:7) hasta que se procesaron. Los segmentos de raíces así fijados, se deshidrataron en series crecientes de concentraciones de etanol, y luego se embebieron en parafina. Se cortaron secciones de 10 μm de espesor con ayuda de un micrótopo manual, luego se tiñeron con Safranina y Fast-Green y se montaron en Bálsamo de Canadá. Por cada tratamiento, las observaciones anatómicas se realizaron tomando aleatoriamente 5 secciones de raíces de plantas diferentes. De esta manera se determinó la proporción de aerénquima del área de las secciones transversales de las raíces utilizando el programa analizador de imágenes Image-ProPlus v4.1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

2.3.1.8. Diseño experimental y análisis de datos

Se implementó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial de los tratamientos en 2 factores fijos: factor “accesión” con 5 niveles (esto corresponde a las 5 accesiones evaluadas) y el factor “inundación” con 2 niveles (plantas en sumersión parcial y plantas con libre drenaje en condición control). La unidad experimental fue una planta cultivada individualmente en una maceta. Debido a que cada cosecha fue destructiva de la biomasa total de la planta, el número de repeticiones de los parámetros de biomasa dependió de cada fecha de cosecha: para la fecha de inicio de inundación hubo 10 repeticiones, para la fecha de fin de inundación, 14 repeticiones y para la de fin de recuperación, 10 repeticiones (Figura 2.1 del esquema del experimento). En las determinaciones no destructivas el número de repeticiones se indica en cada cuadro o tabla de la sección 2.4 de este capítulo correspondiente a los resultados.

Para las variables determinadas, se probaron los supuestos de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene y de normalidad de los errores a través de la prueba de Shapiro-Wilks. El análisis de las variables se realizó implementando un análisis de la varianza (ANVA) a 2 vías, excepto para la variable “Número de raíces

adventicias” que se analizó mediante un ANVA a una vía (ya que las raíces adventicias solo se registraron en un solo nivel del factor inundación). Para cada variable en la que se detectó interacción significativa, se analizaron las medias de los 10 tratamientos, los cuales consistieron en todas las combinaciones entre los niveles de los dos factores (5 x 2), mediante una prueba de comparación múltiple de medias de Duncan. Para las variables en que el ANVA no detectó interacción significativa, se analizaron los efectos principales de los factores, y si alguno de estos fue significativo, también se aplicó la prueba de Duncan para diferenciar entre medias de los diferentes niveles de cada factor. Se empleó el nivel de significancia del 5 %, tanto para el ANVA como para las pruebas de Duncan.

Las variables que correspondieron a valores porcentuales (por ejemplo la proporción de aerénquima en secciones de raíces), previo al análisis estadístico se transformaron mediante \sqrt{p} , donde p es la variable en valores de proporción ($0 \leq p \leq 1$). Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa InfoStat versión 2011 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) (Di Rienzo *et al.*, 2011).

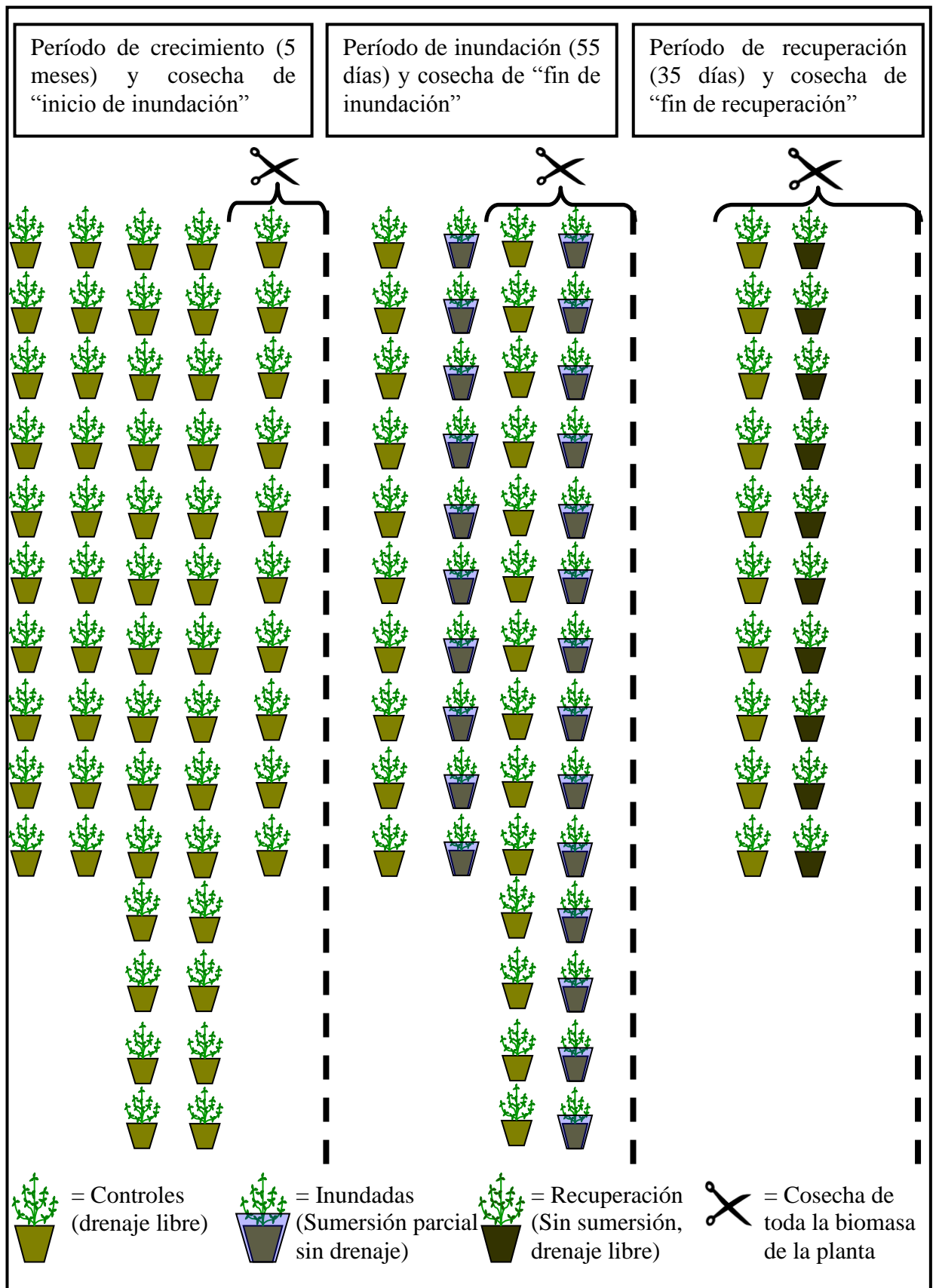


Figura 2.1. Esquema del diseño y de los momentos de cosecha del experimento para una accesión dada.

2.3.2. Germinación de *Lotus* spp. en inundación

2.3.2.1. Material vegetal

Se utilizaron las mismas accesiones que para el apartado anterior de esta tesis (2.3.1.1).

2.3.2.2. Sistema de cultivo y tratamientos

Las semillas se escarificaron químicamente con ácido sulfúrico de la misma manera que se explicó en el apartado anterior 2.3.1.2. Una vez escarificadas, se sembraron en macetas conteniendo una mezcla arena:tierra (2:1). Cada maceta se dividió en 6 sectores de igual tamaño. Por cada sector se sembraron 20 semillas de las accesiones. A estas macetas, inmediatamente después de sembradas se las inundó con agua de lluvia, manteniendo una profundidad de agua de 5 cm por sobre la superficie del sustrato. Además se pusieron a germinar semillas, también escarificadas de la misma manera, de todas las accesiones en macetas sin inundación para registrar el porcentaje de germinación en una condición testigo. El ensayo se llevó a cabo en condiciones de invernáculo, a principios de septiembre.

2.3.2.3. Determinación de germinación

Las determinaciones realizadas consistieron en el recuento de las semillas germinadas tanto para la condición testigo como para la de inundación. Se realizó un seguimiento de la germinación en una frecuencia de dos o tres días durante un período total de 30 días. Considerándose una plántula “emergida o germinada” aquella que logró expandir sus dos cotiledones.

2.3.2.4. Diseño experimental y análisis de datos

Se empleó un diseño experimental en bloques completos al azar (DBCA) con 4 repeticiones. Cada bloque correspondió a una maceta, que se dividió en 6 sectores. En cada uno de los sectores se sembraron las diferentes accesiones evaluadas.

Los valores se registraron y convirtieron en porcentajes de germinación, siendo el 100 % de cada accesión, el número de plántulas germinadas en la situación testigo. Para analizar en un ANVA, los datos de porcentajes de germinación, se transformaron previamente mediante \sqrt{p} , donde p es la proporción de las semillas germinadas en inundación respecto al total de semillas germinadas en situación control ($0 \leq p \leq 1$).

2.4. Resultados

2.4.1. Incidencia de la sumersión parcial y de un período de recuperación en la acumulación de biomasa

Si bien en todas las accesiones sometidas a 55 días de sumersión parcial (inundación) se redujo la acumulación de biomasa con respecto a la situación control, el efecto fue diferente dependiendo de las accesiones (interacción significativa entre los dos factores accesión e inundación, $p < 0,05$) para el período de inundación y el de recuperación en

todas las fracciones de biomasa analizadas (biomasa de hojas, de tallos, de raíces y total) (Figura 2.2 y Tabla 2.1. Tablas S.2.1 y S.2.2 del anexo). En este sentido, y con respecto a su control, en *Lotus tenuis* (Lt) se observó la menor reducción de la biomasa durante el período de inundación y también durante el período de recuperación (28 y 34 % de reducción en la biomasa aérea y total en el período de inundación y 15 y 21 % respectivamente para el período de recuperación). Mientras que en *L. corniculatus* tetraploide (LcT) en inundación se observó que fue la accesión en que más se redujo la biomasa con respecto a su control (63 y 74 % de reducción en la biomasa aérea y total en el período de inundación y 54 y 64 % respectivamente para el período de recuperación). En el híbrido interespecífico *L. tenuis* x *L. corniculatus* (LtxLc) se observó que se redujo la biomasa de manera intermedia a Lt y LcT en el período de inundación (50 y 52 % de reducción en la biomasa aérea y total) pero con una fuerte recuperación de biomasa en el período post-inundación (25 % de reducción en la biomasa aérea y total) (Figura 2.2 y Tabla 2.1).

Entre las plantas sometidas al estrés por inundación, las que mayor biomasa aérea acumularon en los dos períodos fueron las de Lt seguidas por las de LtxLc (13,95 y 8,99 g por planta en el período de inundación y 20,65 y 18,53 g por planta en el período de recuperación respectivamente). Cabe mencionar que la acumulación de biomasa determinada en la cosecha de fin de recuperación, LtxLc no se diferenció de Lt. Las plantas sometidas a inundación de las demás accesiones tuvieron menor acumulación de biomasa aérea en ambos períodos evaluados (5,99, 5,07 y 3,72 g por planta en LcT, LcD y Lj en el período de inundación y 10,46, 8,98 y 3,67 g por planta respectivamente en las mismas accesiones) (Figura 2.2.C y D). Comparando esos valores de biomasa aérea de las dos cosechas, se observó que en promedio las plantas de LtxLc acumularon casi 10 g de materia seca por planta en el período de 35 días de recuperación post-inundación, mientras que en el mismo período las demás accesiones acumularon 6,70, 4,47, 3,91 y 0 g por planta en Lt, LcT, LcD y Lj respectivamente.

La biomasa de raíces se redujo fuertemente en las plantas inundadas de LcT con respecto a sus plantas controles en ambos períodos evaluados (88 y 84 % de reducción en el período de inundación y recuperación respectivamente) (Figura 2.2.C). Mientras que en las demás accesiones dicha biomasa se redujo entre un 48 y 64 % en promedio para el período de inundación. En el período de recuperación post-inundación lo más destacable fue que la biomasa de raíces de las plantas del híbrido LtxLc, se equiparó con la biomasa de las plantas controles (Figura 2.2.D).

Comparando plantas inundadas, Lt fue la que más biomasa de raíces acumuló (4,4 g por planta; Figura 2.2.C), lo que concuerda con el número de raíces adventicias formadas bajo dicho estrés (más de 200 raíces adventicias por planta en Lt) (Tabla 2.1). En este sentido, todas las accesiones formaron raíces adventicias únicamente en las plantas inundadas durante el período de inundación, y persistieron en el período de recuperación. Sin embargo, las accesiones respondieron diferencialmente entre ellas ($p < 0,05$; ANVA a una vía). Las accesiones LcT y LtxLc formaron menor cantidad de raíces que Lt, con alrededor de 100 raíces adventicias por planta, mientras que LcD y Lj formaron en promedio algo más de 50 raíces adventicias por planta (Tabla 2.1). Además se observó que gran parte del sistema radicular original se desintegró en todas las accesiones por el efecto de la inundación, siendo casi íntegramente reemplazado por la formación de las raíces adventicias (se puede observar en las fotografías de las plantas inundadas de la Figura 2.2.A).

Es menester mencionar que en las raíces de todas las accesiones se observó la formación de nódulos resultantes de la simbiosis con rizobios.

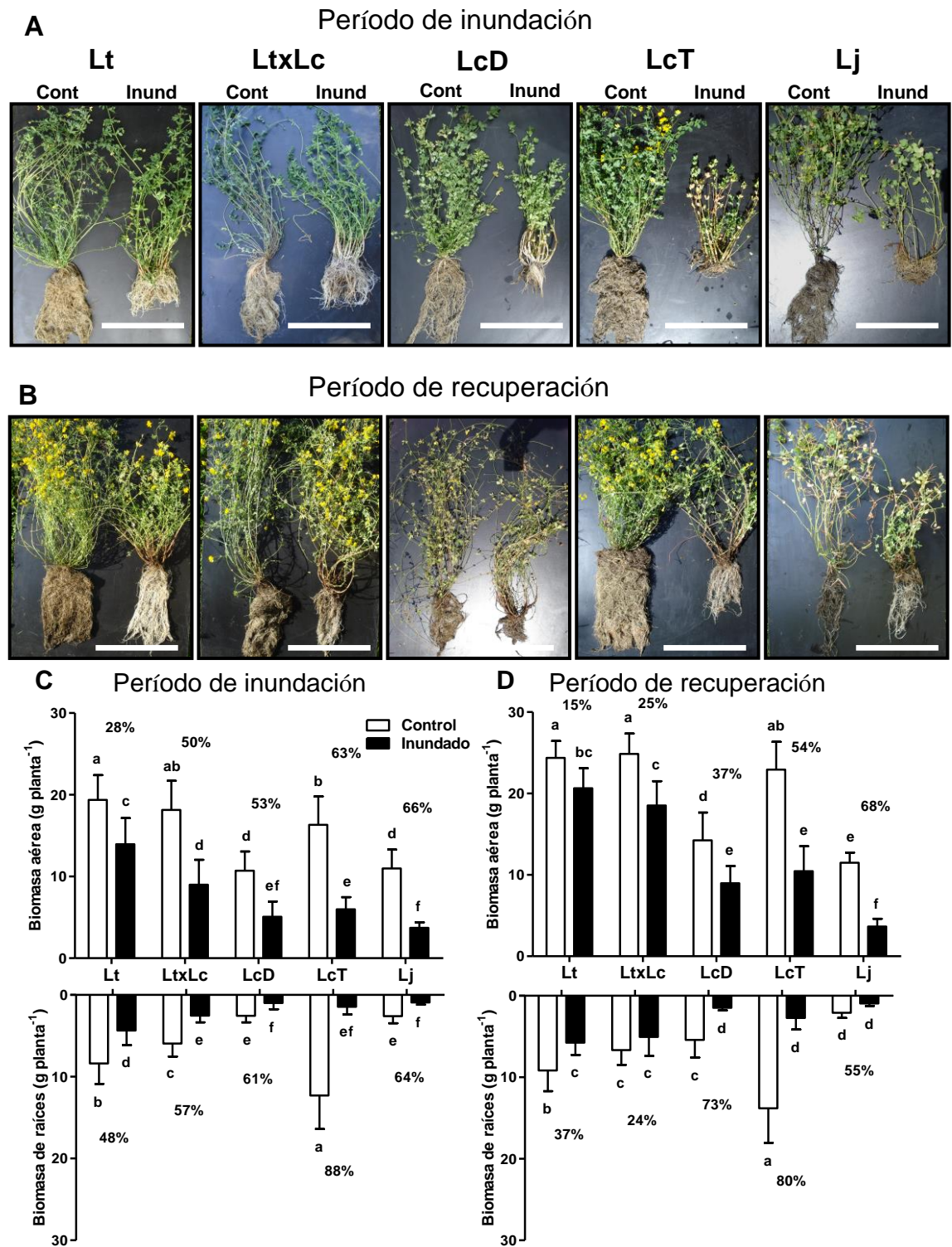


Figura 2.2. Efecto de 55 días de sumersión parcial (Inundado) y 35 días de recuperación sobre la biomasa de plantas adultas de 5 accesiones de *Lotus* spp. (Lt: *L. tenuis*; LtxLc: híbrido *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide; LcD: *L. corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide y Lj: *L. japonicus*). A y B: fotografías tomadas en el momento de la cosecha de fin de inundación. Las líneas blancas sobre las fotos, representan 25 cm. C y D: biomasa aérea y de raíces, ambos en peso seco. Los porcentajes muestran la reducción de crecimiento de las plantas inundadas con respecto a las controles. Las columnas (medias, n=14 o n=10, \pm DE) sin ninguna letra en común son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

Tabla 2.1. Efecto de 55 días de sumersión parcial (Inund) y 35 días de recuperación sobre la biomasa total (g de materia seca/planta) y la formación de raíces adventicias en plantas adultas de 5 accesiones (Acc) de *Lotus* spp. (Lt: *L. tenuis*; LtxLc: híbrido *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide; LcD: *L. corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide y Lj: *L. japonicus*).

Tratamientos (Acc x Inund)	Período de inundación				Período de recuperación								
	Biomasa Total		Raíces adventicias*		Biomasa Total		Raíces adventicias*						
	media	± DE	media	± DE	media	± DE	media	± DE					
Lt	Cont	27,78	± 4,59	a		33,56	± 4,15	ab					
	Inund	18,32	± 4,68	c	206,6	± 67,44	a	26,43	± 2,57	c	192,6	± 61,54	a
LtxLc	Cont	24,11	± 4,55	b				31,55	± 3,71	b			
	Inund	11,54	± 3,71	d	95,6	± 49,54	b	23,61	± 4,97	cd	110,6	± 47,14	b
LcD	Cont	13,29	± 2,54	d				19,69	± 4,09	d			
	Inund	6,08	± 2,54	e	53,9	± 36,05	c	10,46	± 2,23	e	18,7	± 6,03	c
LcT	Cont	28,64	± 6,50	a				36,77	± 4,96	a			
	Inund	7,46	± 2,32	e	114,3	± 67,78	b	13,21	± 4,24	e	100,3	± 59,51	b
Lj	Cont	13,60	± 2,81	d				13,60	± 1,71	e			
	Inund	4,65	± 0,86	e	56,2	± 12,07	c	4,62	± 1,18	f	37,3	± 10,98	c

Los valores son las medias de 14 (período de inundación) o 10 (período de recuperación) plantas ± el desvío estándar. Para cada variable (columnas), las medias sin ninguna letra en común son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

** En la variable “Raíces adventicias” se realizó un ANVA a una vía, de las plantas inundadas con las accesiones como clasificación, porque solo en esta condición se desarrollaron este tipo raíces.

La relación biomasa aérea (vástagos)/biomasa de raíces (V/R) aumentó en las plantas inundadas con respecto a las controles en ambas accesiones de *L. corniculatus* durante el período de inundación, pero en mayor grado en LcT que en LcD (250 y 44 % respectivamente, con respecto a sus controles). El incremento de la relación en ambas accesiones persistió en el período de recuperación. Las plantas inundadas de Lt y LtxLc no se diferenciaron de sus plantas controles para esta relación en ninguno de los dos períodos considerados. En la especie modelo Lj, la relación V/R de las plantas inundadas se observó invariable con respecto a las controles en el período de inundación, pero disminuyó en el período de recuperación (Tabla 2.2).

En la relación hoja/tallo (H/T), nuevamente la accesión más afectada por la inundación respecto a su control fue LcT (57 % menor), seguida por la otra accesión de *L. corniculatus*, LcD (37 % menor, también respecto a su control) durante el período de inundación (Tabla 2.2). En Lt, LtxLc y Lj la relación H/T no se modificó por la inundación durante el mismo período. En las plantas controles de la accesión LcD se observó el valor más alto de la relación H/T (1,05).

Para el período de recuperación, en las plantas que transcurrieron por la inundación, no se observó efecto de la misma sobre la relación H/T y sólo se observaron diferencias entre las accesiones independientemente de la inundación (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Efecto de 55 días de sumersión parcial (Inund) y de 35 días de recuperación sobre las relaciones de biomasa en peso seco (Vástago/Raíz y Hoja/Tallo) de plantas adultas de 5 accesiones (Acc) de *Lotus* spp. (Lt: *L. tenuis*; LtxLc: híbrido *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide; LcD: *L. corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide y Lj: *L. japonicus*).

Tratamientos (Acc x Inund)	Período de inundación				Período de recuperación				
	Vástago/Raíz		Hoja/Tallo		Vástago/Raíz		Hoja/Tallo*		
	media	± DE	media	± DE	media	± DE	media	± DE	
Lt	Cont	2,49 ± 0,83	ef	0,46 ± 0,10	def	2,83 ± 0,75	cd	0,26 ± 0,07	bc
	Inund	3,50 ± 0,97	cde	0,52 ± 0,14	cde	3,82 ± 1,21	bc	0,37 ± 0,11	
LtxLc	Cont	3,20 ± 0,80	de	0,65 ± 0,14	c	3,97 ± 1,09	bc	0,29 ± 0,09	bc
	Inund	3,57 ± 0,84	cde	0,58 ± 0,12	cd	4,17 ± 1,39	bc	0,38 ± 0,12	
LcD	Cont	4,67 ± 2,44	bc	1,05 ± 0,38	a	3,02 ± 1,63	bcd	0,53 ± 0,26	ab
	Inund	6,75 ± 3,30	a	0,66 ± 0,25	c	6,23 ± 1,69	a	0,31 ± 0,12	
LcT	Cont	1,42 ± 0,42	f	0,84 ± 0,12	b	1,83 ± 0,68	d	0,44 ± 0,23	a
	Inund	4,97 ± 1,80	b	0,36 ± 0,17	f	4,48 ± 1,71	b	0,63 ± 0,29	
Lj	Cont	4,61 ± 1,63	bc	0,41 ± 0,06	ef	5,83 ± 1,42	a	0,15 ± 0,04	c
	Inund	4,19 ± 0,95	bcd	0,36 ± 0,12	f	3,98 ± 0,77	bc	0,31 ± 0,08	

Los valores son las medias de 14 (período de inundación) o 10 (período de recuperación) plantas ± el desvío estándar. Para cada variable (columnas), las medias sin ninguna letra en común son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

* En la relación H/T del período de recuperación no hubo interacción entre los factores. La inundación no tuvo efecto y el factor accesión sí lo tuvo (se muestran las diferencias por accesión).

En las plantas inundadas de las accesiones Lt, LtxLc y LcT en comparación con las controles, se observó una reducción del número de tallos primarios (o basales) en el período de inundación, que persistió en el período de recuperación, mientras que LcD y Lj no alteraron dicho número en ningunos de los períodos (Tablas S.2.5 y S.2.6 del anexo).

Por otra parte, el número de tallos secundarios se redujo en todas las accesiones cuando las plantas se sometieron al tratamiento de inundación. Sin embargo, en el período de recuperación las plantas del tratamiento de inundación aumentaron considerablemente el número de tallos secundarios (o ramificaciones laterales) alcanzando los valores de las plantas controles en todas las accesiones e incluso superándolo ampliamente en el caso de Lt (Tablas S.2.5 y S.2.6 del anexo).

En cuanto a las tasas de crecimiento relativo de la biomasa aérea (TCR_v), de las raíces (TCR_r) y la total (TCR_t), para el período de inundación de 55 días, se observó una reducción de las mismas en todas las plantas inundadas de las diferentes accesiones con respecto a sus controles. Sin embargo, esas reducciones fueron diferenciales dependiendo de las accesiones en las tres fracciones (interacción significativa entre los dos factores, $p < 0,05$) (Tabla 2.3 y Tabla S.2.3 del anexo).

Las TCR_v de las plantas inundadas disminuyeron en un 20, 29, 52, 78 y 86 % con respecto a las controles en Lt, LtxLc, LcD, LcT y Lj respectivamente (Tabla 2.3). En la accesión LcT, la TCR_r se observó severamente afectada por la inundación, con valor negativo de la tasa ($-0,009 \text{ g g}^{-1} \text{ día}^{-1}$), lo que indicó una pérdida de biomasa con respecto a la situación de inicio de inundación (Tabla S.2.3 del anexo). La TCR_t se

encontró más severamente afectada en LcT que en las demás accesiones (25, 30, 55, 93 y 86 % para Lt, LtxLc, LcD, LcT y Lj respectivamente) (Tabla 2.3).

Cabe destacar, que las TCR de las distintas fracciones de biomasa y la TCR_t de la accesión LtxLc en ambas condiciones, fueron las más altas entre todas las accesiones evaluadas (Tabla 2.3 y Tabla S.2.3 del anexo).

Las TCR_v y TCR_t durante el período de 35 días de recuperación de las plantas que se sometieron a inundación, también respondieron diferencialmente dependiendo de las accesiones (interacción entre factores, $p < 0,05$) (Tabla 2.3). En la accesión LtxLc, las TCR_v y TCR_t fueron mayores en las plantas que transcurrieron la inundación que las que permanecieron siempre en condición control. Lo mismo se observó en la TCR_v de LcD y en la TCR_t de LcT.

Tabla 2.3. Efecto de 55 días de sumersión parcial (Inund) y 35 días de recuperación sobre las tasas de crecimiento relativo en peso seco (TCR, $g\ g^{-1}\ día^{-1}$) de la biomasa aérea (vástago) y total de plantas adultas de 5 accesiones (Acc) de *Lotus* spp. (Lt: *L. tenuis*; LtxLc: híbrido *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide; LcD: *L. corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide y Lj: *L. japonicus*).

Tratamientos (Acc x Inund)		Período de inundación				Período de recuperación							
		TCR Vástago		TCR Total		TCR Vástago		TCR Total					
		media	± DE	media	± DE	media	± DE	media	± DE				
Lt	Cont	0,030	± 0,003	c	0,031	± 0,003	bc	0,006	± 0,002	de	0,005	± 0,003	cd
	Inund	0,024	± 0,004	d	0,023	± 0,004	e	0,011	± 0,003	bcd	0,010	± 0,003	bc
LtxLc	Cont	0,048	± 0,003	a	0,047	± 0,003	a	0,009	± 0,003	cd	0,008	± 0,003	c
	Inund	0,034	± 0,007	b	0,033	± 0,007	b	0,020	± 0,005	a	0,020	± 0,006	a
LcD	Cont	0,029	± 0,005	c	0,028	± 0,004	cd	0,008	± 0,007	d	0,011	± 0,006	bc
	Inund	0,014	± 0,007	e	0,013	± 0,008	f	0,016	± 0,007	ab	0,015	± 0,006	ab
LcT	Cont	0,023	± 0,004	d	0,027	± 0,004	d	0,009	± 0,004	cd	0,007	± 0,004	c
	Inund	0,005	± 0,005	f	0,002	± 0,006	g	0,015	± 0,009	abc	0,015	± 0,01	ab
Lj	Cont	0,022	± 0,004	d	0,023	± 0,004	e	0,001	± 0,003	ef	0,000	± 0,004	de
	Inund	0,003	± 0,003	e	0,003	± 0,003	g	-0,001	± 0,007	f	-0,001	± 0,007	e

Los valores son las medias de 14 (período de inundación) o 10 (período de recuperación) plantas ± el desvío estándar. Para cada variable (columnas), las medias sin ninguna letra en común son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

2.4.2. Efecto de la sumersión parcial sobre el intercambio de gases, fotosistema II y pérdida de electrolitos

La tasa de intercambio neto de CO₂ a luz saturante (Asat) se afectó diferencialmente por la inundación dependiendo de las accesiones (interacción significativa entre los factores, $p < 0,05$). En las plantas inundadas de las accesiones LcT y Lj se observó un 68 y 71 % menos de fijación de CO₂ que en sus controles respectivamente, mientras que en las accesiones Lt y LtxLc dicha tasa de fijación no se afectó con respecto a sus controles y en LcD tendió a disminuir (Figura 2.3.A). La conductancia estomática (GS) (Figura 2.3.B) tendió a repetir lo observado para ASat, pero ni la interacción entre los factores, ni los efectos principales, fueron significativos ($p > 0,05$).

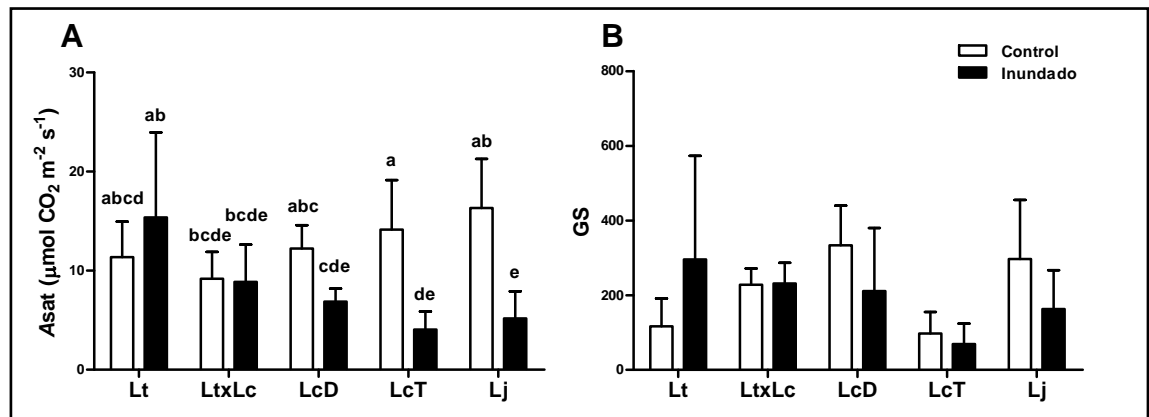


Figura 2.3. Efecto de 54 días de sumersión parcial (Inundado) sobre el intercambio de gases de plantas adultas de 5 accesiones de *Lotus* spp. (Lt: *L. tenuis*; LtxLc: híbrido *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide; LcD: *L. corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide y Lj: *L. japonicus*). A: Intercambio neto de CO_2 a luz saturante (Asat) y B: Conductancia estomática (GS) determinadas un día antes de la cosecha de fin de inundación. Los porcentajes muestran la reducción de las tasas de las plantas inundadas con respecto a los controles. Las columnas (medias, $n=4$, $\pm\text{DE}$) sin ninguna letra en común, son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p<0,05$). Para la GS, ni la interacción entre los factores, ni los efectos principales fueron significativos.

Si bien en las plantas de todas accesiones bajo estrés por inundación se redujo el índice multiparamétrico PIabs, en la accesión Lt se observó menor reducción, y la mayor reducción se produjo en LcT (50, 64, 68, 83 y 93 % de reducción en Lt, LtxLc, LcD, Lj y LcT con respecto a sus controles respectivamente) (Figura 2.4).

Para el parámetro F_v/F_m no se encontró un efecto de la inundación con respecto a la situación control en ninguna de las diferentes accesiones (datos no mostrados).

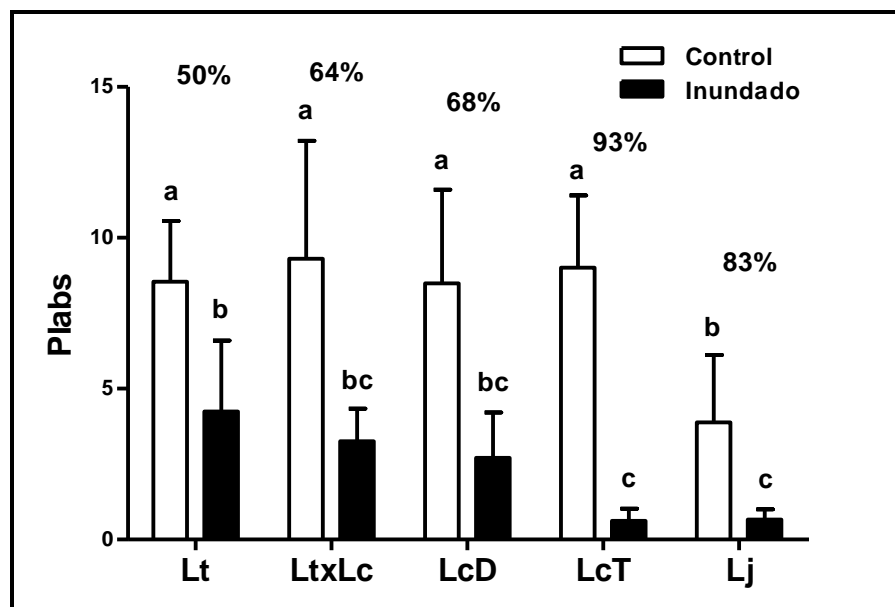


Figura 2.4. Efecto de 53 días de sumersión parcial (Inundado) sobre el índice de performance (PIabs) en plantas de *Lotus* spp. de 5 meses de edad (Lt: *L. tenuis*; LtxLc: híbrido *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide; LcD: *L. corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide y Lj: *L. japonicus*). Los porcentajes muestran la reducción del índice de las plantas inundadas respecto a los controles. Las columnas (medias, $n=6$, $\pm\text{DE}$) sin ninguna letra en común, son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p<0,05$).

La técnica de pérdida de electrolitos, usada como una estimación de integridad de membranas, mostró interacción significativa entre los factores inundación y accesión ($p < 0,05$). Las accesiones LcT y Lj fueron las únicas que tuvieron una pérdida de electrolitos en las plantas inundadas mayor con respecto a sus controles (Figura 2.5) sugiriendo un mayor daño de membranas que en las restantes accesiones.

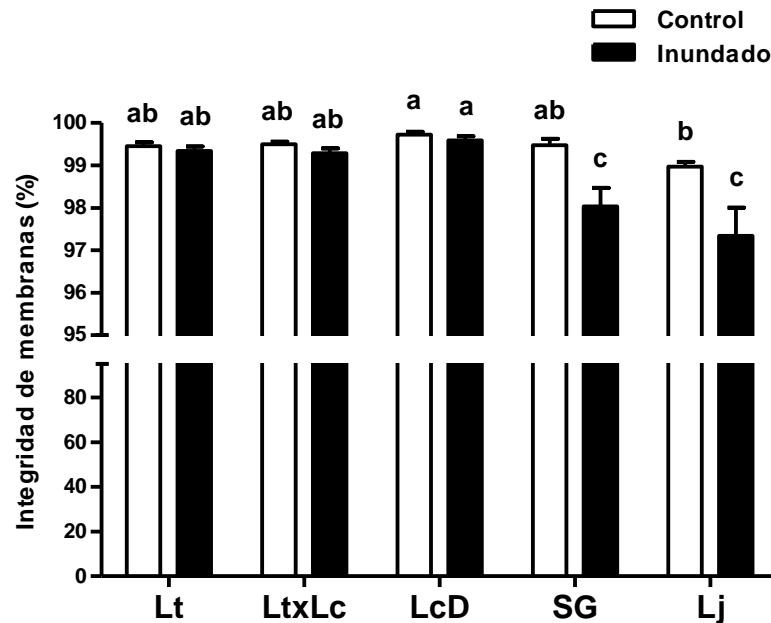


Figura 2.5. Efecto de 55 días de sumersión parcial (Inundado) sobre la integridad de membranas (I%), según la ecuación $I\% = (1 - (t_1 - t_0) / (t_2 - t_0)) * 100$ (detallada en la sección 2.3.1.6), en plantas de *Lotus* spp. de 5 meses de edad (Lt: *L. tenuis*; LtxLc: híbrido *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide; LcD: *L. corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide y Lj: *L. japonicus*). Las columnas (medias, $n=6$, \pm DE) sin ninguna letra en común, son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

2.4.3. Efecto de la sumersión parcial en la formación de aerénquima y en el diámetro de la base de los tallos

Los cortes histológicos a 2,5 cm desde el ápice, de secciones transversales de raíces, demostraron un claro incremento de la proporción de lagunas de tejido aerénquimático en la situación de inundación en Lt, LtxLc y LcD (34,9, 32 y 31,3 % respectivamente), lo que contrastó con lo observado en LcT y Lj (7,4 y 3,4 % respectivamente) (Figura 2.6.A y C). En la situación control, la proporción de lagunas de tejido aerénquimático, es decir aerénquima constitutivo, también se diferenció ($p < 0,05$) siendo Lt y LtxLc las que presentaron mayores niveles sin diferenciarse entre sí (10,6 y 16,5 % respectivamente). Las tres accesiones restantes, LcD, LcT y Lj, fueron las que menores proporciones de aerénquima presentaron en situación control (3,1, 2,8 y 2,1 % respectivamente).

El diámetro de tallos principales, medido a 3 cm desde la superficie del suelo (la inundación cubrió hasta los primeros 6 cm), se incrementó en todas las accesiones en la situación de inundación debido a la formación de un tejido hipertrófico esponjoso, pero el grado de aumento dependió de las accesiones (interacción significativa entre los dos

factores, $p < 0,05$). En las accesiones Lt, LtxLc y LcD el aumento en el diámetro fue alrededor de 140 % con respecto a sus controles y en LcT y Lj el incremento fue aproximadamente del 60 % ($p < 0,05$; Figura 2.6.B).

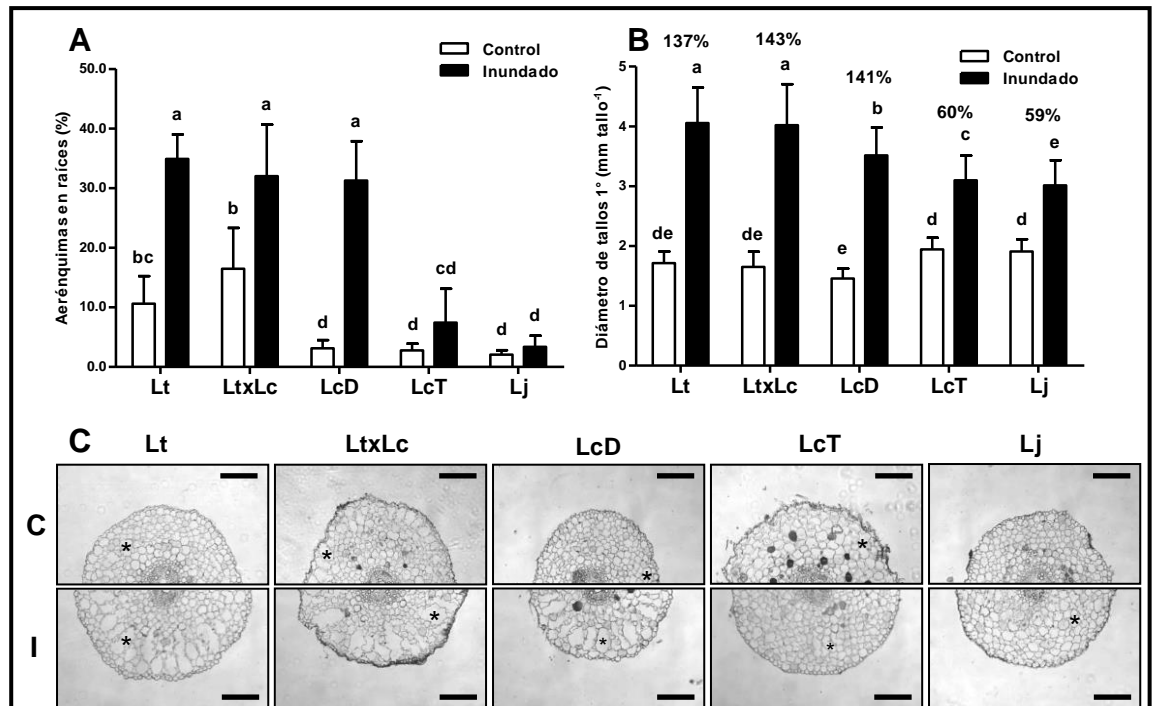


Figura 2.6. Formación de tejido aerénquimático en secciones transversales de raíces y diámetro de tallos primarios, de plantas de *Lotus* spp. de 5 meses de edad sometidas a un período de 55 días en condiciones de sumersión parcial (Inundado) y control (Control) (Lt: *L. tenuis*; LtxLc: híbrido *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide; LcD: *L. corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide y Lj: *L. japonicus*). A: Proporción de aerénquima con respecto al área de la sección transversal de cada raíz. B: Diámetro de tallos primarios (mm) tomado a 3 cm desde la corona de las plantas. Las columnas (medias, $n=5$ en A y $n=14$ en B, \pm DE) sin ninguna letra en común, son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p < 0,05$). C: Fotografías representativas tomadas con microscopio óptico (10X) de secciones transversales de raíces cortadas a 2,5 cm desde el ápice. Los asteriscos indican la presencia de aerénquima lagunar. La letra "C" muestra la fila de las raíces controles y la letra "I" la fila de las inundadas. Las barras negras sobre las fotografías representan 150 μ m. Cada fotografía es representativa de 5 secciones de raíces de plantas diferentes.

2.4.4. Germinación de *Lotus* spp. en inundación

El porcentaje de germinación (%G) bajo inundación (5 cm) (relativizado al %G de cada testigo a tiempo final) de las accesiones evaluadas, se distribuyó en tres grupos claramente diferentes (Figura 2.7). Por un lado, se halló a la población de Lt con un %G en promedio del 90 % (relativo a su testigo). En forma intermedia, y levemente por encima del 60 %, se observaron los %G de LcD y LtxLc. Por último y sin llegar al 20 % se encontraron las accesiones de LcT y Lj.

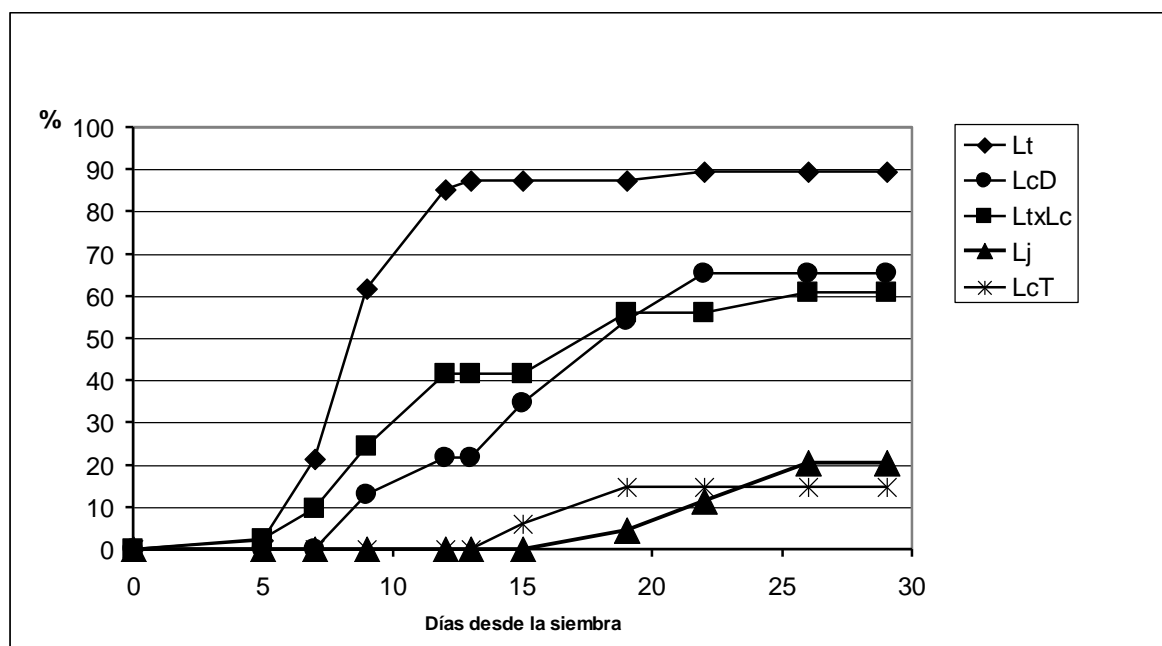


Figura 2.7. Efecto de la inundación (5cm) sobre la germinación de 5 accesiones de *Lotus* spp. (Lt: *L. tenuis*; LcD: *L. corniculatus* diploide; LtxLc: *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide; Lj: *L. japonicus*; LcT: *L. corniculatus* tetraploide).

2.5. Discusión

En este capítulo se caracterizaron las respuestas de plantas adultas de 5 accesiones del género *Lotus* sometidas a un estrés por sumersión parcial a comienzos de la primavera, el cual representa una situación típica de la región de la Pampa Deprimida, y que a continuación se discuten.

2.5.1. Efecto de la inundación sobre la producción de biomasa y variables asociadas

La reducción en la materia seca de las plantas cultivadas en diferentes situaciones de estrés, entre las que se encuentra la inundación, con respecto a sus controles, constituye el parámetro más determinante para la clasificación de la tolerancia en diferentes especies vegetales. Teniendo como referencia dicho criterio, recientemente Striker y Colmer (2016) realizaron una clasificación de las especies leguminosas forrajeras más frecuentemente cultivadas a nivel mundial, frente al estrés por anegamiento. Teniendo en cuenta el mismo criterio, los resultados obtenidos en nuestro trabajo mostraron el siguiente *ranking* de tolerancia para las accesiones evaluadas: *Lotus tenuis* (Lt) > híbrido interespecífico *L. tenuis* x *L. corniculatus* (LtxLc) > *L. corniculatus* diploide (LcD) > *L. japonicus* (Lj) > *L. corniculatus* tetraploide (LcT). Los resultados observados para Lt, concuerdan con lo reportado en varios trabajos previos (Vignolio *et al.*, 1994; Mendoza *et al.*, 2005; Striker *et al.*, 2005; Real *et al.*, 2008; Manzur *et al.*, 2009), donde se indica su tolerancia a condiciones similares de estrés. Es menester destacar que la menor reducción de la biomasa total, se evidenció principalmente en la parte aérea (Figura 2.2; Tabla 2.1).

La accesión más sensible a las condiciones de estrés, fue LcT (Figura 2.2.B). Sin embargo, en el meta-análisis llevado a cabo por Striker y Colmer (2016) la especie *L.*

corniculatus se describió como tolerante, por tener una reducción de la biomasa del 35 % en promedio. Es oportuno tener presente que en la mayoría de los trabajos incluidos en el análisis de esos autores, se utilizaron períodos más cortos de inundación que el utilizado en nuestro trabajo. No obstante en otros reportes (Vignolio *et al.*, 2002; Striker *et al.*, 2005; Real *et al.*, 2008), al igual que lo observado en nuestros ensayos, encontraron que LcT fue menos tolerante que Lt. Asimismo, bajo nuestras condiciones experimentales, Lj presenta una reducción de su biomasa similar a LcT (Lj redujo el 66 % de la biomasa aérea con respecto a sus controles, mientras que LcT lo hizo en un 63 %). Otros autores han evaluado a Lj en condiciones de anegamiento. Recientemente Striker *et al.* (2014) trabajando con dos ecotipos de dicha especie modelo (MG-20 y Gifu B-129) y líneas recombinantes entre ambos ecotipos, reportaron una reducción de biomasa solo del 32 %. Sin embargo, es importante considerar que el período de anegamiento en dicho trabajo fue solo de 21 días, lo que presumiblemente justifique la diferencia con nuestro trabajo. En otro trabajo realizado con el ecotipo Gifu B-129 de *L. japonicus*, Rocha *et al.* (2010) reportaron al mismo como “altamente tolerante”, trabajando con una solución hipóxica y con 28 días de anegamiento en un sustrato inerte. Esto último difiere de nuestras condiciones, debido a que cuando se utiliza suelo como sustrato (nuestro caso), la disminución de oxígeno provocada por el anegamiento y la consecuente caída en el potencial redox del suelo, pueden ejercer otros efectos en detrimento del crecimiento y la fisiología de las plantas, que no podrían ser observados trabajando con sustratos inertes. Un ejemplo constituye la posible toxicidad producida sobre las plantas por elementos reducidos bajo estas condiciones como el Fe^{2+} o el Mn^{2+} (Ponnamperuma, 1984; Colmer, 2003).

Con respecto a la accesión diploide de colecta propia de *L. corniculatus* (LcD), debemos destacar que este trabajo constituye el primero entre sus similares, donde se estudia una accesión diploide de esta especie frente al estrés por anegamiento. En este caso, si bien proporcionalmente esta accesión redujo su biomasa en mayor medida que Lt y el híbrido LcxLt, también es cierto que esta reducción fue menor que en LcT. Esta diferencia entre respuestas comparado a LcT se podría deber al nivel de ploidía, pues recientemente se ha reportado que bajo condiciones ambientales con restricción de macronutrientes como el N y el P (se debe recordar que en el caso de anegamiento la adquisición de N se ve disminuida), las especies con mayor ploidía son más afectadas que las de menor ploidía (Guignard *et al.*, 2016). También es importante considerar que la accesión LcD se colectó de una población originaria de la región de las malladas de la Devesa de “El Saler” en Valencia (España), región que cuenta con varios factores de estrés abiótico comunes a los encontrados en la Pampa Deprimida, y que podría tener características adaptativas que le otorguen mayor tolerancia que su par tetraploide. Estas características podrían ser transferidas a la descendencia híbrida. Con respecto a la utilización de híbridos interespecíficos para programas de mejoramiento en el género *Lotus*, un inconveniente común es la diferencia en el nivel de ploidía entre las especies. De todas maneras se han logrado cruzamientos efectivos con diferentes técnicas como el uso de *L. tenuis* autotetraploides para el cruzamiento con *L. corniculatus* tetraploides mediante el rescate y cultivo de embriones (Grant, 1999), pero la baja fertilidad y la poca viabilidad en las semillas de la descendencia, ha dificultado la aplicación biotecnológica de estas herramientas. Sin embargo, el hecho de que nuestro grupo de trabajo seleccionara una accesión española diploide, nos ha permitido trabajar con materiales con el mismo nivel de ploidía ($2n=2x$), obteniéndose una población F1 con alta viabilidad y fertilidad lo que evidencia un elevado potencial tecnológico (Escaray *et al.*, 2014).

En este sentido, en el presente trabajo se estudió la respuesta del híbrido interespecífico obtenido en nuestro laboratorio, en vistas de evaluarlo como un material potencialmente cultivable en suelos anegables. En estrés por inundación, dicho material híbrido tuvo la menor reducción de biomasa después de la especie altamente tolerante *L. tenuis* (Figura 2.2 y Tabla 2.1).

En un trabajo previo, el mismo material híbrido obtenido en nuestro laboratorio, se evaluó en cuanto a las características agronómicas de importancia mencionadas anteriormente (el nivel óptimo de taninos condensados y producción de rizomas), y se encontraron valores intermedios entre sus parentales (Escaray *et al.*, 2014); lo cual fue consistente con lo observado por Castillo *et al.*, (2012) que trabajando con híbridos de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* tetraploides, generados por rescate de embriones, también reportaron características agronómicas intermedias entre los parentales.

Otra característica de interés para los cultivares de las plantas forrajeras leguminosas, radica en una alta relación hoja/tallo (H/T). Desde el punto de vista del mejoramiento, este es un indicador importante de su calidad. En el caso de la alfalfa, este criterio es ampliamente utilizado en programas de mejoramiento debido a su estrecha relación positiva con la digestibilidad y con el consumo del forraje por parte del ganado bovino, que surge de la mayor digestibilidad de las hojas en relación con los tallos (Kephart *et al.*, 1990; Lemaire y Allirand, 1993). Además, para esta misma especie, se observó que es una característica con alta heredabilidad (Annicchiarico, 2015). Por su parte, para el género *Lotus*, la relación H/T también ha sido propuesta como un criterio importante de selección para facilitar la cantidad de taninos condensados de la ingesta del ganado. Es dable recordar que en algunas especies de este género, los taninos son proporcionalmente más abundantes en las hojas que en los tallos (por ejemplo en *L. corniculatus* y *L. uliginosus*) (Häring *et al.*, 2007). De las accesiones evaluadas en este trabajo de tesis, LcD presentó la relación H/T más alta tanto en condición control como en estrés. Es importante mencionar que en el material híbrido LtxLc, se observó la segunda relación H/T más alta, lo que sugiere que también podría ser una característica transferible por hibridación entre especies del género (Tabla 2.2). A su vez, vale la pena aclarar que LcT, presentó la mayor reducción en la relación H/T en situación de estrés con respecto a su control; lo que podría conducir a una fuerte reducción en la calidad forrajera de esta especie en suelos anegables. Lo mencionado justificaría realizar mayores esfuerzos en la generación de nuevos cultivares con características mejoradas en la relación H/T.

En estreses por inundación que no comprenden la sumersión total de la planta (anegamiento y sumersión parcial), los órganos que quedan en contacto directo con la inundación, sufren mayores efectos que los que quedan fuera del alcance de ésta (Smethurst y Shabala, 2003, Colmer y Voesenek, 2009). En este sentido, la relación vástago/raíz (V/R) de las plantas inundadas de LcT, aumentó en promedio más de tres veces con respecto a las controles, mientras que dicha relación en las plantas inundadas de Lt y el híbrido interespecífico no se diferenció de las plantas controles (Tabla 2.2). Cabe aclarar que si bien el aumento de la relación V/R en las plantas inundadas es tomado frecuentemente como una mayor partición relativa de los fotosintatos hacia la parte aérea de la planta (Rubio *et al.*, 1995; Mendoza *et al.*, 2005), en nuestras condiciones experimentales, el fuerte aumento de la relación en LcT, también se debió a una marcada desintegración del sistema radicular original. Esto último se evidenció además por los valores negativos de la TCR de las raíces de LcT en el período de inundación (Tabla S.2.3 del anexo). De esta manera, el “componente raíz” incluido en la relación V/R, estaría influenciado a su vez por un equilibrio entre el mantenimiento de

las raíces formadas anteriormente al período de inundación, la desintegración de esas raíces y las formadas durante dicho período.

La capacidad de formar raíces adventicias ha sido considerada como una característica muy importante frente al estrés por anegamiento durante períodos prolongados (Colmer y Voesenek, 2009; Voesenek y Bailey-Serres, 2015). Diversos autores han demostrado una asociación positiva entre la tolerancia a períodos prolongados de inundación y el número de raíces adventicias, en diferentes especies vegetales (Real *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2011). En coincidencia con la literatura, en nuestros resultados se observó que la accesión más tolerante (Lt) presentó un mayor número de raíces adventicias (Tabla 2.1). Por otro lado, si bien el número de raíces entre LcT y LtxLc fue similar, es importante destacar que el tamaño de las mismas en LcT fue inferior que en LtxLc (Figura 2.2.A, comparar las plantas inundadas de las fotografías entre LtxLc y LcT).

Con respecto a las tasas de crecimiento relativo (TCR) de las diferentes fracciones de las plantas, las mismas también reflejaron las respuestas contrastantes de las accesiones evaluadas frente a la inundación. La TCR del total de la biomasa de la planta (TCR_t), ha sido utilizada para evaluar el crecimiento de plantas frente a estrés por anegamiento en diferentes especies (Alamri *et al.*, 2013; Imaz *et al.*, 2015), incluyendo *Lotus* spp. (Teakle *et al.*, 2010). En nuestro trabajo, la TCR_t de las plantas de LtxLc durante el período de inundación mostró ser la más alta, tanto en el tratamiento control como en el de estrés (Tabla 2.3); las TCR de LcT y Lj fueron las más afectadas, siendo esto consistente con los resultados obtenidos de biomasa acumulada. Es importante mencionar que aunque LtxLc presentó una alta TCR con respecto a las demás accesiones, tuvo menor acumulación de biomasa que Lt en la cosecha de fin de inundación. Esto se debió a que la materia seca acumulada hasta el inicio del período de inundación de LtxLc fue menor que la de Lt. Y como el valor que toma la TCR es relativo precisamente al peso inicial de cada accesión en el comienzo del período, hace que sean posibles valores más altos en una planta con menor acumulación final de biomasa. Los datos sugieren que LtxLc tendría un crecimiento inicial en los meses otoño-invernales más lento que las demás accesiones, pero durante los períodos de inundación, y ya comenzada la primavera, incrementaría su crecimiento a tasas elevadas, alcanzando o incluso superando los valores de acumulación de biomasa del resto de las accesiones.

2.5.2. Efecto de la inundación sobre la fijación de CO₂, el estado del PSII y la estabilidad de membrana

Previamente ha sido reportado que el anegamiento modifica la fijación de carbono de las plantas (Else *et al.*, 1996; Insausti *et al.*, 2001), observándose reducciones de la tasa de fotosíntesis neta (*A*) y de la conductancia estomática (*g_s*) en diferentes especies (McCarron *et al.*, 1998, Ashraf, 2003). En nuestras condiciones, los resultados revelaron que la *Asat* no se redujo en las plantas inundadas de Lt y LtxLc y sí se redujo fuertemente en LcT y Lj con respecto a sus respectivos controles, (Figura 2.3.A). Este resultado fue consistente con los valores de acumulación de biomasa de esas accesiones durante el período de inundación (Figura 2.2) y con los resultados obtenidos por otros autores en *L. corniculatus* (Striker *et al.*, 2005). A grandes rasgos, nuestros resultados sugieren que esta respuesta podría estar vinculada al componente de difusión de gases, debido a la tendencia que presentaron los valores de *g_s* (Figura 2.3.B). Sin embargo, las reducciones durante anegamientos de largo plazo también podrían estar asociadas a daños en el fotosistema II (PSII) como ha sido demostrado previamente en alfalfa

(Smethurst y Shabala, 2003; Irving *et al.*, 2007). En este sentido, en nuestro trabajo se encontraron indicios de que se afectaron algunos componentes del PSII, lo cual estuvo evidenciado por el índice multiparamétrico PIabs (Figura 2.4). El indicador de la eficiencia cuántica máxima del PSII (Fv/Fm), no se modificó fuertemente en el estrés estudiado, aunque mostró una tendencia de disminución en la accesión más afectada (LcT) y no en las demás accesiones.

Cabe mencionar que el Fv/Fm es usualmente utilizado para caracterizar el estado fisiológico de las plantas sometidas a diferentes tipos de estreses abióticos. Sin embargo en condiciones no muy severas de estrés, el Fv/Fm carece de sensibilidad para diferenciar la respuesta del PSII a los cambios ambientales, tal como se reportó por ejemplo en el estrés a temperaturas bajas en oscuridad para soja (Van Heerden *et al.*, 2004, Strauss, 2006). Nuestros resultados concordaron con reportes previos que indican que bajo condiciones no muy severas de estrés, el PIabs es un parámetro más sensible permitiendo diferenciar con mayor precisión los efectos negativos de la inundación entre las accesiones que presentaron similar tolerancia a dicho estrés. La diferencia de información entre ambos parámetros radica en que el PIabs es una expresión multiparamétrica que combina tres funciones principales (absorción de energía, excitación de la energía atrapada y conversión de la energía de excitación para el transporte de electrones) y el Fv/Fm sólo relaciona la fluorescencia inicial (F₀) y la fluorescencia máxima (F_m) del PSII (Strasser *et al.*, 2000).

A su vez una disminución de la fotosíntesis podría estar asociada a una mayor producción de especies reactivas del O₂ (EROs) (Foyer y Shigeoka, 2011). Una cantidad excesiva de las EROs, podría conducir a daños en membranas celulares (Foyer y Noctor, 2005). El daño en las mismas ha sido estimado en diversos trabajos mediante el método de pérdida de electrolitos (Bajji *et al.*, 2002; Koyro *et al.*, 2013). Bajo nuestras condiciones de estudio se evidenció que LcT y Lj sometidos a la situación de inundación perdieron más electrolitos que las demás accesiones (Figura 2.5). Esto podría estar indicando un mayor daño de las membranas en estas dos accesiones, que estaría en correspondencia a que fueron las más afectadas en la mayoría de los demás parámetros.

2.5.3. Generación de aerénquima en inundación

El transporte de O₂ a través de los tejidos desde la parte aérea de la planta, hacia órganos que están inundados, es trascendental para mantener la oxigenación de las raíces (Armstrong, 1979; Colmer, 2003). Como consecuencia, la baja resistencia interna al movimiento de los gases debida a una alta porosidad de los tejidos (aerénquima) es una característica que ha sido ampliamente asociada a la tolerancia de diversas plantas a condiciones de inundación (Armstrong, 1979; Laan *et al.*, 1989; Colmer y Voesenek 2009). La porosidad se puede deber tanto a tejido arenquimático constitutivo (aquel que ya está formado incluso en condiciones de libre drenaje) como al formado por efecto de la inundación.

Striker y Colmer (2016), realizando un meta-análisis de diversos trabajos de leguminosas forrajeras sometidas a anegamiento/hipoxia, sugieren un umbral de porosidad de raíces (10-12 %), en que las especies que quedan por debajo del mismo, sufren severas reducciones en la biomasa de las plantas. Nuestros resultados concuerdan con este último concepto, ya que las accesiones con mayor capacidad de desarrollar aerénquima en las raíces adventicias (Lt, LtxLc y LcD), son las que menos reducciones de biomasa sufrieron durante el estrés (Figura 2.6). Estos resultados también

concuerdan con lo observado en trabajos previos en *L. tenuis* (Striker *et al.*, 2005, 2006; Teakle *et al.*, 2006). Sin embargo Striker *et al.*, (2014) trabajando con *L. japonicus* (dos ecotipos y 94 líneas recombinantes entre ellos) no encontraron correlación entre la proporción de aerénquima y la acumulación de biomasa aérea, ni tampoco con otras características del vástago de las plantas de esa especie. Esa falta de conexión entre la proporción de aerénquima de las raíces y las características del vástago pudo deberse principalmente a que se trató de la especie, que al menos en nuestras condiciones, fue una de las más sensibles, por lo que no tendría la capacidad de desarrollar adecuadamente una red de tejido aerenquimático y también del período de inundación al cual se sometieron las plantas en dicho trabajo, que fue mucho menor al aplicado en nuestro trabajo (21 días frente a 55 días).

Por otra parte en nuestras condiciones, al tratarse de una inundación del tipo de sumersión parcial (6-7 cm sobre la superficie del suelo), significó que las bases de los tallos quedaran sumergidas. Esto condujo a la formación de una hipertrofia, un tejido secundario blanco muy esponjoso, el cual podría contener una gran proporción de aerénquima secundario (Jackson y Armstrong, 1999; Yamauchi *et al.*, 2013) como los reportados previamente en *Melilotus siculus* (Teakle *et al.*, 2011; Verboven *et al.*, 2012). Para estimar esta característica, utilizamos la medición del diámetro en la base de los tallos sumergidos, encontrando un incremento notoriamente superior, en Lt, LtxLc y LcD con respecto a sus correspondientes controles, lo que contrasta claramente con lo observado en LcT y en la especie modelo Lj, coincidiendo esto con lo que se observó en la formación de aerénquima en raíces (Figura 2.6). Esto sugiere que la formación de este tejido esponjoso en la base de los tallos, podría estar relacionada también a la capacidad de formar aerénquima en las raíces. En este sentido, se ha reportado una gran importancia de ese tipo de tejido secundario en la oxigenación de las raíces sumergidas (Shimamura *et al.*, 2002; Teakle *et al.*, 2011).

2.5.4. Período de recuperación

Mediante una revisión bibliográfica hemos detectado que los trabajos en los que se analiza este tipo de estrés, hay pocos reportes que incluyan la evaluación del período de post-inundación o de recuperación (Striker, 2012). De hecho, aproximadamente solo el 20 % de los estudios de inundación de las leguminosas forrajeras perennes han incluido un período de recuperación en la evaluación de las respuestas a este estrés (Striker y Colmer, 2016). Entendiendo que evaluar la recuperación post-inundación constituye un factor muy importante, ya que se ha encontrado que las respuestas de las plantas durante el período de inundación, no siempre concuerdan con las respuestas que muestran una vez finalizada la exposición al estrés (Striker, 2012, Parad *et al.*, 2013). Nuestros resultados demostraron que entre las plantas que son sometidas al período de inundación, y posteriormente a un período 35 días de recuperación, las accesiones de Lt y LtxLc tuvieron una recuperación superior a las demás accesiones (Figura 2.2.D). En este sentido, ambas accesiones presentaron una alta acumulación de biomasa aérea, tanto en términos absolutos (duplicando la biomasa aérea lograda por las accesiones de *L. corniculatus*) como en comparación con sus respectivos controles.

En general, podemos concluir que, al menos en nuestras condiciones, las plantas que demostraron mayor tolerancia durante el período de inundación, también lo hicieron en el período de recuperación. Sin embargo, Striker *et al.* (2012) reportaron que tres de las especies de *Lotus* que también se utilizaron en nuestro trabajo, respondieron en el período de recuperación de manera opuesta a lo observado durante el período de

inundación. Estas aparentes contradicciones, podrían justificarse por el tipo de estrés realizado (sumersión total) y por el estado ontogénico evaluado (plántulas) en dicho trabajo.

Por otro lado, Vignolio *et al.* (1994), en coincidencia con lo observado en nuestros estudios, reportaron que después de un período de 42 días de inundación y 90 días de recuperación, las plantas de *L. tenuis* alcanzaron valores de biomasa total similares a los de las controles. Dicha observación era simultánea con lo observado en plantas de *L. corniculatus*, las cuales presentaron una débil recuperación en el período posterior al del estrés.

Por su parte, la especie modelo *L. japonicus*, respondió muy débilmente en el período de recuperación post-estrés, con bajos valores en la acumulación de biomasa y en las tasas de crecimiento, perdiendo hojas y raíces con respecto al período de inundación. Es importante mencionar que esta tendencia se observó tanto en las plantas sometidas al estrés por anegamiento como las que se cultivaron en situación control (Tabla 2.1). En cierto sentido podemos considerar estas respuestas como previsibles, ya que la especie modelo se trata de una especie de ciclo anual, y en la fecha de cosecha del final del período de recuperación, las plantas se encontraban finalizando su ciclo biológico, desarrollando y madurando vainas y semillas. Es importante destacar que una búsqueda bibliográfica no nos ha permitido encontrar en la especie modelo otros estudios de estrés por inundación a largo plazo.

Para nuestro estudio también hemos tenido en cuenta que, en términos de uso forrajero en las condiciones edafo-climáticas de la región de la Pampa Deprimida, es de mucha importancia conocer la respuesta de las plantas una vez que haya terminado el período de anegamiento primaveral, porque constituye el período de mayor utilización de este recurso en la producción ganadera. Asimismo se ha demostrado que el pastoreo temprano, previo a la finalización del período de inundación, provocaría la desaparición de estas leguminosas de las pasturas, como consecuencia del pisoteo del ganado (Striker *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta todo ello, nuestros resultados sugieren que el híbrido LtxLc sería tan apto como Lt en ofrecer forraje para el ganado, pues alcanza el mismo nivel de acumulación de biomasa aérea luego de 35 días de recuperación (Figura 2.2.D).

2.5.5. Efecto de la inundación sobre la germinación

Los resultados encontrados sugieren que habría una conexión entre las respuestas de las accesiones más tolerantes en estado de planta adulta y la germinación bajo inundación. Esto podría estar debido a que la profundidad del agua en nuestras condiciones de estudio, no fue muy profunda (5 cm), y aquellas accesiones que estarían más adaptadas a inundaciones frecuentes, podrían establecerse tempranamente una vez retirada la inundación. En este sentido, el establecimiento temprano post-inundación significaría una ventaja adaptativa, que justificaría, en parte, la exitosa naturalización de *L. tenuis* en la Pampa Deprimida.

Por otro lado, desde otro punto de vista, también para la etapa de germinación, Vignolio *et al.* (1995) estudiando períodos largos de anegamientos sobre semillas de *L. tenuis* y *L. corniculatus*, le adjudicaron mayor tolerancia a *L. tenuis* por presentar la capacidad de mantener mayor cantidad de semillas duras viables que *L. corniculatus*, sugiriendo que la mayor dureza de las mismas permitiría que persistan viables para el momento en que el agua se disipe. En nuestro trabajo esto no se contempló porque se escarificaron químicamente las semillas antes de comenzar con el tratamiento de inundación.

2.6. Conclusiones

En este capítulo se analizó la respuesta de cinco accesiones de *Lotus* a un período de estrés prolongado de anegamiento, y a su posterior período de recuperación. También se evaluó la germinación durante el anegamiento. Los resultados obtenidos tomados en forma conjunta, demostraron que *L. tenuis* y el híbrido interespecífico presentaron mejores características de respuestas a la situación de estrés (en lo que se refiere a la acumulación de biomasa, al desarrollo de tejido aerenquimático y de raíces adventicias, a la tasa fotosintética, integridad de membranas, entre otras características) y también mostraron una mejor recuperación post-inundación en cuanto a acumulación de biomasa, en comparación con las dos accesiones de *L. corniculatus* y la de *L. japonicus* que se afectaron en mayor grado en dichas características. En este sentido, la tolerancia superior de *L. tenuis* se observó en la mayoría de las variables morfológicas y fisiológicas evaluadas. Sin embargo, con el objetivo en el que se pretende disponer forraje con niveles de taninos condensados foliares adecuados en ambientes anegables, se concluye que entre los materiales evaluados, el material híbrido es el más apto en cumplir con las dos condiciones (se tuvo en cuenta entre las dos accesiones de *L. corniculatus* y el híbrido interespecífico *L. tenuis* x *L. corniculatus*). Además, entre las dos accesiones de *L. corniculatus*, teniendo en cuenta todos los parámetros antes mencionados, se pudo concluir que la población diploide de colecta propia fue más tolerante que el material comercial tetraploide. Como conclusión general, la hibridación interespecífica en el género *Lotus* podría constituir una herramienta útil para incrementar la tolerancia al estrés por inundación de materiales con otras características forrajeras importantes (como el nivel de taninos condensados foliares, rizomas, etc.).

3. CAPÍTULO 3. EFECTOS DEL ESTRÉS MIXTO DE INUNDACIÓN Y SALINIDAD EN *Lotus* spp.

3.1. Introducción

3.1.1. La salinidad y las plantas

En un sentido amplio, incluyendo el punto de vista productivo, el problema de salinidad edáfica existe si las concentraciones de sales en el suelo, provocan reducciones en el crecimiento de las plantas, así como en el rendimiento de los cultivos (Ayers y Westcot 1985). Se estima que cerca de 800 millones de hectáreas están afectadas por salinidad, las cuales cubren más del 6 % de la superficie terrestre del mundo (FAO, 2008).

Además de la salinidad natural, la salinización secundaria (antrópica) debido a irrigaciones de cultivos con aguas salinas y otras prácticas agrícolas inadecuadas, se ha convertido en una amenaza para la producción agropecuaria (Pannell y Ewing, 2004).

El impacto de la salinidad en las plantas es esencialmente observado desde dos perspectivas: el estrés osmótico y la toxicidad iónica (Munns, 2002). El estrés osmótico es causado por los iones en la solución del suelo, que disminuyen la disponibilidad de agua para las raíces. La toxicidad iónica tiene lugar cuando las raíces de las plantas absorben Na^+ y/o Cl^- y esos iones se acumulan en niveles perjudiciales en las hojas generando disrupción de las estructuras de enzimas, dañando organelas e interfiriendo con el metabolismo de la célula provocando desequilibrios iónicos y deficiencias nutricionales (revisado por Munns y Tester, 2008). Los efectos osmóticos se producen de manera inmediata, mientras que la toxicidad iónica requiere de un tiempo mayor (días o semanas) (Munns, 2002).

Las plantas superiores poseen diferentes mecanismos al enfrentar situaciones de estrés salino destinados a prevenir el efecto tóxico de los iones nocivos en sus tejidos. Estos mecanismos pueden ser agrupados en dos: 1- tolerancia por “exclusión” de Na^+ y Cl^- y 2- tolerancia “de tejido”, sobrellevando concentraciones altas de esos iones en los propios tejidos.

Entre los mecanismos que se denominan de “exclusión”, están incluidos aquellos que extraen los iones nocivos de la planta, por ejemplo mediante glándulas especializadas de secreción de sales como ocurre en las gramíneas perennes *Diplachne fusca* y *Distichlis spicata* (Qureshi *et al.*, 1982; Yensen *et al.*, 1988), y aquellos que directamente no permiten la entrada de los iones nocivos desde la solución del suelo, a las células de las raíces (Teakle y Tyerman, 2010). Si bien, en la mayoría de las plantas, los iones Na^+ y Cl^- son efectivamente excluidos por las raíces cuando absorben agua del suelo, se ha demostrado que las halófitas (aquellas que pueden cumplir su ciclo de vida en concentraciones altas de salinidad del suelo) son capaces de mantener la exclusión de iones a mayor salinidad que las glicófitas (aquellas que no logran completar su ciclo de vida en concentraciones altas de salinidad del suelo) (Munns, 2005).

Por otro lado, los mecanismos que otorgan tolerancia “de tejido”, requieren de la adecuada compartimentalización a nivel subcelular de los iones, con el objetivo de impedir que su acumulación en el citoplasma alcance niveles tóxicos (Munns y Tester, 2008). Cabe mencionar, que las enzimas distribuidas en el citoplasma, tanto de plantas halófitas como glicófitas, son igualmente sensibles al efecto tóxico de estos iones (Flowers *et al.*, 1977).

Ambos tipos de mecanismos de tolerancia, en mayor o menor medida, requieren del transporte activo de iones con gasto de energía. Esto último toma especial relevancia en el caso de los estreses mixtos de salinidad e inundación, pues como se retomará en el siguiente apartado de la tesis (3.1.2), la inundación del suelo conduce a un déficit energético en las plantas.

Existen otros efectos importantes provocados por la salinidad que están relacionados en mayor o menor medida con lo anterior, como por ejemplo: incrementos significantes de

especies activas del oxígeno en raíces (Xie *et al.*, 2011) y en hojas (Tanou *et al.*, 2009) e interferencia en la homeostasis del K^+ (Maathuis y Amtmann, 1999; Shabala y Cuin, 2008), lo que conlleva a la activación de los mecanismos de respuesta conducentes a una muerte celular acelerada (Shabala, 2009; Joseph y Jini, 2010).

3.1.2. Salinidad e inundación

En el mundo, una gran parte de los suelos salinos se encuentra agravada por el anegamiento. Ambas situaciones del suelo son causantes conjuntas de estrés vegetal (Barrett-Lennard, 2003; Bennett *et al.*, 2009; Barrett-Lennard y Shabala, 2013). Las causas del anegamiento en suelos salinos pueden deberse a una irrigación intensiva en sistemas de producción agrícola (Smedema y Shiati, 2002), al ascenso de las napas freáticas salinas (Hatton *et al.*, 2003), a la intrusión de agua de mar a los ambientes costeros (Carter *et al.*, 2006), a la estructura débil del suelo que reduce el drenaje y/o a las inundaciones estacionales de áreas salinizadas (Drew *et al.*, 1988; Rengasamy *et al.*, 2003; Smedema y Shiati, 2002).

A pesar de diversos estudios sobre los estreses individuales de salinidad y anegamiento de suelos (también estudios de anoxia o hipoxia), pocas investigaciones han sido llevadas a cabo sobre la combinación de los mismos. Al estar combinados, los cuales pueden interactuar afectando a las plantas más severamente que la suma de ambos efectos en forma independiente (Barrett-Lennard, 2003; Teakle *et al.*, 2010).

En plantas glicófitas, la mayoría de las investigaciones coinciden en la observación de que la interacción de ambos estreses, en comparación al estrés por salinidad de manera aislada, causa un mayor incremento en la tasa de transporte de Na^+ y Cl^- hacia el vástago, y una reducción en la tasa de transporte de K^+ . También interactúan en sus efectos sobre las relaciones iónicas, sobre el crecimiento y la supervivencia de las plantas (Drew *et al.*, 1988; Galloway y Davidson, 1993; Barrett-Lennard *et al.*, 1999; Barrett-Lennard, 2003).

El hecho de que la hipoxia combinada con salinidad a nivel de las raíces pueda causar aumentos en las concentraciones de Na^+ y/o Cl^- en hojas, es más claro para las plantas glicófitas que para las halófitas (Barrett-Lennard, 2003; Colmer y Flowers, 2008). En las glicófitas, Barrett-Lennard (2003) ha reportado que la hipoxia causó más del 30 % de incremento en la concentración de Na^+ o Cl^- en vástagos u hojas en 20 de las 21 especies evaluadas. Por el contrario, en halófitas, incrementos de esta magnitud solo ocurrieron en 7 de las 15 especies evaluadas bajo condiciones experimentales similares (Colmer y Flowers, 2008).

El anegamiento, al reducir la aireación del suelo y por lo tanto el suministro de oxígeno a las raíces, inhibe fuertemente la respiración aeróbica, disminuyendo drásticamente la producción de ATP (Datta y de Jong, 2002; Smedema y Shiati, 2002; Rengasamy *et al.*, 2003; Bailey-Serres y Voesenek, 2008; Bennett *et al.*, 2009), lo que podría interferir en los mecanismos que las plantas poseen para hacer frente a la toxicidad de los iones Na^+ y Cl^- , ya que para el transporte activo de iones se requiere energía para mantener el gradiente de H^+ a través de las membranas. Esto último implica la actividad de las bombas H^+ -ATPasas, siendo esencial para activar el transporte activo secundario, por ejemplo de Na^+ (Greenway y Munns, 1980; Barrett-Lennard, 2003; Munns, 2005; Teakle *et al.*, 2007). En este sentido, existe una gran cantidad de evidencias que sugieren que la hipoxia afecta la selectividad de membranas y el transporte de nutrientes (Buwalda *et al.*, 1988; Morard y Silvestre, 1996).

En el caso particular del Na^+ , su transporte hacia el vástago depende de numerosos procesos que ocurren tanto en raíces como en la parte aérea de la planta. En ellos se incluyen, la absorción y la exclusión de Na^+ hacia y desde las raíces, la acumulación de dicho catión en la vacuola de células radicales y posteriormente la captación del mismo desde el xilema. Cada uno de estos procesos depende de diversas proteínas generalmente de membrana (Tester y Davenport, 2003; Volkov y Amtmann, 2006; Byrt *et al.*, 2007). Por lo tanto, el transporte de Na^+ en raíz, que depende de gradientes transmembranales, podría ser afectado por el déficit energético en hipoxia, lo que incluye: i) transportadores de alta afinidad que extraen Na^+ desde el xilema (por ejemplo HKT; James *et al.*, 2006; Byrt *et al.*, 2007), ii) antitransportadores Na^+/H^+ de membrana plasmática que excluyen Na^+ (por ejemplo: SOS1; Martínez-Atienza *et al.*, 2007) o iii) intercambiadores de Na^+/H^+ a nivel de tonoplasto, los cuales acumulan Na^+ en vacuolas de células, como es el caso de NHX1 (Xue *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2006). El secuestro vacuolar de Na^+ protege a las enzimas citoplasmáticas y, simultáneamente contribuye a mantener la turgencia celular (Flowers *et al.*, 1977; Greenway y Munns, 1980), por lo tanto, los transportadores NHX1 cumplen un rol importante en la tolerancia a la salinidad (Apse *et al.*, 1999) y bajo el estrés mixto de salinidad e hipoxia (Teakle *et al.*, 2010). En este sentido, bajo condiciones de estrés mixto de salinidad e hipoxia en plantas de *L. tenuis*, y a diferencia de lo observado en *L. corniculatus*, se ha encontrado que son capaces de sostener la expresión del gen *NHX1* en células radicales (Teakle *et al.*, 2010).

En general, para el caso del anión Cl^- existe menor información que para el Na^+ , pero se ha reportado que la regulación del transporte del Cl^- y su exclusión desde el vástago, están correlacionados con la tolerancia a la salinidad en muchas especies leguminosas (revisado por Teakle y Tyerman, 2010).

3.1.3. *Lotus* spp. para ambientes salinos con inundaciones frecuentes

Teniendo en cuenta el estrés causado por la combinación de las restricciones de salinidad e inundación, resultan muy interesantes las especies del género *Lotus*, ya que se sabe que varias especies de este género se destacan por una excelente adaptabilidad a los ambientes restrictivos, lo que las diferencia de otras leguminosas forrajeras (Blumenthal y McGraw, 1999, Escaray *et al.*, 2012). Tal cual se ha mencionado anteriormente en la presente tesis, la Pampa Deprimida además de los períodos frecuentes de anegamiento, sufre problemas de salinidad en gran parte de su superficie, otorgándole a los suelos de la región características hidro-halomórficas restrictivas para el establecimiento y persistencia de las forrajeras leguminosas tradicionales.

Entre las especies del género *Lotus*, se han reportado mayores niveles de tolerancia frente al estrés mixto, inundación y salinidad, de *L. tenuis* con respecto a *L. corniculatus*. Esto resulta consistente con lo observado en condiciones de campo, ya que *L. tenuis* se encuentra naturalizado en los ambientes restrictivos de la Pampa Deprimida, mientras que las poblaciones comerciales tetraploides de *L. corniculatus*, no lo están. Por otra parte, se ha observado que si bien *L. tenuis* persiste en tales condiciones, la disminución en su rendimiento (biomasa) es mayor si se la compara con la observada en otros ambientes inundables pero no salinos. Teniendo en cuenta esta observación, se justifica el intento por desarrollar materiales forrajeros que puedan producir forraje en las condiciones más desfavorables.

Por otro lado, es conocida la existencia de poblaciones de *L. corniculatus* capaces de crecer y desarrollarse en regiones salinas, frecuentemente inundables, en ambientes

cercanos al mar Mediterráneo de los cuales son nativas. En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha identificado una población de *L. corniculatus*, detallada en el apartado 1.3. de la presente tesis, con la particularidad de haber sido colectada de ambientes salinos, frecuentemente inundables y además de ser diploide (Escaray *et al.*, 2014). Es importante destacar, que la tasa de crecimiento en situaciones control de esa población de *L. corniculatus*, es menor que la de las especies del género *Lotus* que habitualmente se utilizan como forrajeras. A su vez, con el objeto de obtener un híbrido interespecífico, se utilizó como segundo parental una población naturalizada de *L. tenuis* colectada de los bajos inundables de la Pampa Deprimida. Teniendo en cuenta los orígenes en que se adaptaron dichos parentales, se presumía que el híbrido interespecífico tendría una mejor respuesta frente al estrés mixto de inundación y salinidad, tal vez adoptando los mecanismos de tolerancia de ambos parentales, con una mejor performance en la producción de biomasa. Por lo antedicho hemos planteado como **objetivo parcial** del presente trabajo de tesis, estudiar al híbrido interespecífico frente al estrés mixto de inundación y salinidad, mediante determinaciones de biomasa, fisiológicas, de expresión de genes involucrados en la compartimentalización de iones tóxicos, y compararlo con sus parentales, así como con un cultivar comercial tetraploide de *L. corniculatus* (San Gabriel).

3.2. Hipótesis

La mayor tolerancia frente al estrés mixto de inundación y salinidad que poseen algunas accesiones de *Lotus* spp. se debe a la capacidad de mantener activos los mecanismos que tienen para tolerar al estrés por salinidad, aún bajo condiciones de sumersión parcial:

- a) Mecanismos que evitan la acumulación perjudicial de iones en vástago (“de exclusión”).
- b) Mecanismos de compartimentalización subcelular de iones nocivos (“de tejido”).

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Material vegetal

Se utilizó una población naturalizada en la Pampa Deprimida de *L. tenuis* (Lt); un cultivar comercial tetraploide de *L. corniculatus* (LcT); una población diploide de *L. corniculatus* (LcD) y la primera generación del material híbrido de población *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide (LtxLc).

3.3.2. Sistema de cultivo y tratamientos

La escarificación química con ácido sulfúrico de las semillas y la obtención de plántulas se realizó de la misma manera que lo explicado para la sección 2.3.1.2. de este trabajo de tesis.

Las plántulas así obtenidas se transplantaron a macetas de 300 cm³ de capacidad, con una mezcla de arena y perlita (en proporción 1:1) estéril. Las macetas con una plántula por cada una de ellas, se colocaron en una cámara de cultivo en condiciones controladas con un fotoperiodo de 16/8 horas a 24 °C / 21 °C ± 2 °C (día/noche) y una humedad relativa de 55/65 ± 5 %. La intensidad de luz (250 μmol fotones m⁻² s⁻¹) fue provista por

lámparas fluorescentes GroLux (F 40W). La solución de riego utilizada fue Hoagland 0,5 X (Hoagland y Arnon, 1950) conteniendo 3 mM KNO₃; 2 mM Ca(NO₃)₂·4H₂O; 1 mM MgSO₄·7H₂O; 0,5 mM NH₄H₂PO₄; 50 μM NaFeO₈EDTA·2H₂O; 4,5 μM MnCl₂, 23 μM H₃BO₃, 0,16 μM CuSO₄·5H₂O, 0,09 μM ZnSO₄·7H₂O y 0,06 μM Na₂MoO₄·2H₂O.

Luego de transcurridos 21 días desde el trasplante, las plantas se sometieron a una aclimatación escalonada de los tratamientos con salinidad y luego se aplicaron los diferentes tratamientos completos mantenidos por otros 21 días y que son detallados a continuación:

- Control (**Cont**), las plantas usadas como controles continuaron en las condiciones de los primeros 21 días de crecimiento, es decir regadas con solución de Hoagland 0,5 X con libre drenaje.

- Salinidad (**NaCl**), agregado de NaCl progresivamente a la solución nutritiva hasta alcanzar la concentración 150 mM en condiciones de drenaje libre.

- Inundación (**Inund**), se mantuvo sin drenaje la solución nutritiva sobre 3 cm desde el nivel del sustrato. Antes de cada riego, la solución nutritiva se burbujeó con gas N₂ para disminuir el nivel de O₂ a niveles considerados como hipóxicos.

- Salinidad e inundación (**NaCl-Inund**), combinación de los dos tratamientos anteriores, es decir las plantas se irrigaron con solución nutritiva Hoagland 0,5 X salina hipóxica sin drenaje.

Para evitar efectos de un “choque” osmótico, los tratamientos de salinidad y mixto de inundación-salinidad, se llevaron a cabo con incrementos progresivos en la concentración salina (aclimatación). Las plantas inicialmente recibieron 50 mM de NaCl y la concentración fue incrementándose (25 mM cada 3 días) durante 12 días hasta alcanzar la concentración final de 150 mM de NaCl.

La solución nutritiva utilizada en las plantas que se sometieron al tratamiento de inundación y mixto inundación-salinidad contuvo 0,1 % (p/v) de agar y además se burbujeó con nitrógeno gaseoso (N₂). Este procedimiento disminuye el nivel de O₂ disuelto a menos del 10 % que en la solución saturada en aire (Gibbs y Greenway, 2003), mientras que el agar disuelto previene los movimientos convectivos y por lo tanto, evita la re-oxigenación de la solución nutritiva (Wiengweera *et al.*, 1997). Después del período de aclimatación de 12 días, es decir una vez alcanzada la concentración de 150 mM de NaCl en los tratamientos de salinidad y mixto, las plantas de los 4 tratamientos se mantuvieron en estas condiciones durante 21 días hasta la cosecha de la biomasa total de las plantas.

3.3.3. Cosecha de biomasa

Transcurridos los 21 días de aplicación de tratamientos completos, se realizó la cosecha del total de la biomasa por planta, lavándola cuidadosamente con agua destilada, y separándola en 4 fracciones: hojas apicales (4 hojas apicales de cada tallo); hojas basales (todas las hojas de cada planta excepto las apicales); tallos y raíces. Las fracciones de biomasa así separadas se colocaron en sobres de papel y se secaron en estufa a 70 °C durante 3 días hasta peso constante. Luego de secadas las muestras, se pesaron con ayuda de una balanza analítica.

3.3.4. Determinación del intercambio neto de gases

Un día antes de la cosecha de la biomasa, es decir a 32 días del inicio de los tratamientos de inundación y de la aclimatación salina, se determinó el intercambio neto de gases de la misma manera que lo detallado en el capítulo anterior en la sección 2.3.1.4.

3.3.5. Determinación de parámetros de la eficiencia del fotosistema II

Dos días antes de la cosecha de la biomasa se determinaron los parámetros de la eficiencia del fotosistema II a través de la fluorescencia transitoria de la clorofila, de la misma manera en que se explicó para el capítulo 2 en el apartado 2.3.1.5.

3.3.6. Determinación de la concentración de iones

De las fracciones de biomasa seca de cada planta, correspondientes a hojas apicales, hojas basales y raíces, se tomó una alícuota de 10 mg finamente molida. En esa alícuota se determinó la concentración de los iones Na^+ y K^+ . El método consistió en agregar a cada muestra 1 ml de HCl 0,1 N y se incubó durante dos horas a 60 °C. Luego se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 rpm. Se extrajo el sobrenadante para utilizarlo en la determinación de las concentraciones de Na^+ y K^+ mediante un fotómetro de llama (Marca Zeltec, Modelo ZF 250). Los valores obtenidos se interpolaron en una curva de calibración para los dos iones determinados. Por otro lado, también se determinó la concentración de iones Cl^- . Para ello, 25 mg de muestra seca finamente molida, se digirió en tubos cerrados, con una solución extractora compuesta por 1 ml de peróxido de hidrógeno al 30 %, 1 ml de ácido nítrico concentrado y una gota de alcohol isoamílico durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la digestión, se llevó la solución resultante a 10 ml con agua destilada y ésta se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 rpm. Para las muestras correspondientes a plantas cultivadas bajo tratamiento control y de inundación sin salinidad, se tomó una alícuota de 320 μl del sobrenadante recuperado y se le añadió 1 ml de reactivo de color, compuesto por 15 ml de solución de tiocianato de mercurio (4,17 g/l metanol), 15 ml de solución de nitrato de hierro (202 g de nitrato de hierro + 21 ml de ácido nítrico concentrado, enrasado a 1 l con agua destilada) y 50 μl de Brij® 35 (polietilenglicol-dodeciléter) al 4 %. Para las muestras de las plantas que se sometieron a los tratamientos de salinidad y mixto de inundación y salinidad, se procedió de manera similar, pero comenzando con una alícuota de 50 μl del sobrenadante a la que se le agregaron 270 μl de solución extractora y 1 ml de reactivo de color. Luego de mezclar se procedió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm (utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25) y los valores obtenidos se interpolaron en una curva de calibración comprendida entre 0-40 mg/l obtenida luego de emplear una solución patrón de KCl.

3.3.7. Expresión relativa de genes de compartimentalización subcelular de los iones Cl^- y Na^+

Para poder evaluar la expresión relativa de genes mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR), se obtuvo el ADN copia (ADNc) de los ápices de los vástagos, tomando aproximadamente 100 mg de peso fresco. Se congeló el material vegetal inmediatamente en N_2 líquido y luego se almacenó a -80°C hasta su utilización para la extracción de ARN. Para dicha extracción se molieron las muestras en mortero con la utilización constante de N_2 líquido y se empleó el kit de extracción “Total RNA Plant Isolation kit” (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se evaluó la integridad del ARN por electroforesis en gel de agarosa (1 %) en solución tampón TBE 0,5 X, con 8 μl de BrEt/100 ml, durante 30 minutos a 10 V/cm. Se colocaron en cada pocillo 5 μl del ARN total con 3 μl de tampón de carga. Las bandas correspondientes a los ARNr se visualizaron mediante un transiluminador de luz UV y la observación de bandas discretas permitió comprobar la integridad del ARN extraído. Una vez obtenido el ARN, se realizó el tratamiento con DNasa para eliminar alguna posible contaminación con ADN genómico. Para esto se tomó una alícuota del ARN total y se le aplicó el tratamiento con la enzima “Turbo DNA-free™ Kit” (Ambion) de acuerdo al manual de uso del fabricante. El siguiente paso hacia la obtención del ADNc fue comprobar la ausencia de ADN en el ARN extraído. Para ello se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificando la región nrITS utilizando un control positivo de ADN de referencia para comprobar que la reacción en cadena haya funcionado y agua como control negativo. Por lo tanto, la ausencia de producto amplificado en las muestras de ARN, indicó que se encontraban libres de ADN genómico contaminante. Posteriormente se cuantificó y se evaluó el ARN tratado con un “nanodrop”, depositando 2 μl de muestra de ARN en un adaptador con un lector múltiple de placas (Synergy H1) midiendo la absorbancia a dos longitudes de onda: 260 nm y 280 nm. Se utilizaron las muestras que presentaron una relación de absorbancia 260/280 comprendida entre 2 y 2,2. Para la cuantificación se utilizó el valor obtenido a una absorbancia de 260 nm considerando que, a esta longitud de onda, una unidad de absorbancia corresponden a 40 mg de ARN/ml.

Para la síntesis de ADNc se utilizó una alícuota de las muestras conteniendo 3 μg del ARN tratado, usando la enzima transcriptasa reversa “Moloney Murine Leukemia Virus” (MMLV-RT) (Promega, WI, USA) y 100 pmol de hexámeros (Pharmacia Biotech) siguiendo las recomendaciones del fabricante. De esta manera se obtuvo el ADNc en un volumen final de 40 μl de agua estéril, el cual se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Con la finalidad de identificar un gen candidato que estuviera vinculado con el transporte subcelular del Cl^- se comenzó con una búsqueda *in silico* a partir de la secuencia aminoacídica de un gen de canal transportador de cloruros (*CLC*) de arroz (*OsCLC1*), sobre la base de datos “GenBank” de secuencias disponible de *L. japonicus* y otras especies modelos. Esa búsqueda arrojó una posible región con la función predictiva de un *CLC*. Para diseñar los cebadores, se utilizó esa información además de la información de transcriptómica de las especies *L. tenuis* y *L. corniculatus* obtenida en nuestro grupo de trabajo (datos no mostrados, manuscrito en preparación), realizándose un alineamiento de las secuencias de las diferentes especies para obtener una secuencia ortóloga consenso de *CLC* para *Lotus* spp. Con el objetivo de diseñar el par de cebadores que luego se utilizó en el análisis por qRT-PCR, se alinearon las secuencias nucleotídicas deducidas del *CLC* de *L. tenuis*, *L. corniculatus* y *L. japonicus* más conservadas entre las especies, con el programa “BioEdit” (Hall, 1999) y se analizaron

con la interfase de internet “Primer3Plus” (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). La secuencia consenso se analizó en diversas bases de datos y herramientas *in silico* (por ejemplo BLAST contra toda la base de datos del NCBI, PFAM, GenOntology) y se encontró que este gen codifica para un tipo de canal transportador de Cl⁻ ubicado en membranas de compartimentos del aparato de Golgi y que en la literatura especializada se lo denomina *CLC-f*.

Además, se utilizó un par de cebadores diseñado para evaluar la expresión relativa del gen *LtNHX1* en *L. tenuis* y en *L. corniculatus* según lo reportado por Teakle *et al.* (2010). Finalmente, se utilizó un par de cebadores diseñado para el gen *EF-1α*, el cual constituyó el gen de referencia (Escaray *et al.*, 2014). Los cebadores utilizados para la evaluación de expresiones relativas de genes de este capítulo son presentados en la Tabla 3.1.

Los cebadores obtenidos de la forma reportada con anterioridad, se evaluaron inicialmente en su especificidad y eficiencia de amplificación en qRT-PCR sobre ADNc de vástagos de las especies de *Lotus* utilizadas en este capítulo. Para comprobar la especificidad de los mismos se realizó un análisis de disociación después de cada corrida de amplificación, seguido de secuenciamiento del amplicón. Por otro lado la eficiencia de la PCR se evaluó realizando una curva estándar para cada gen, usando seis puntos de dilución, cada uno por triplicado. Todos los pares de cebadores produjeron el amplicón esperado y presentaron similares eficiencias de qRT-PCR en las distintas accesiones de *Lotus* aquí evaluadas.

Tabla 3.1. Lista de cebadores utilizados

Nombre del gen	Dirección	Secuencia del cebador (5'→3')	Referencia
<i>L. tenuis</i> NHX1-like (<i>LtNHX1</i>)	Sentido	TACTTCACTGCGGTCCAATG	Teakle <i>et al.</i> , 2010
	Antisentido	GATCTAGGGAAGCCATGCTG	Teakle <i>et al.</i> , 2010
Chloride channel-like (<i>CLC-f</i>)	Sentido	TTAGTTGGAATGGCCGCTAC	Esta tesis
	Antisentido	ACTGAGGGAACCCATATTGC	Esta tesis
Elongation factor 1-alpha (EF-1α)	Sentido	TGACAAGCGTGTGATCGAGAGG	Escaray <i>et al.</i> , 2014
	Antisentido	GATACCTCTTTCACGCTCAGCCTT	Escaray <i>et al.</i> , 2014

3.3.8. Diseño experimental y análisis de datos

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial de los tratamientos en 3 factores fijos. Los factores fueron “accesión” (con 4 niveles, correspondiente a las 4 accesiones evaluadas), “inundación” (con dos niveles: inundado y no inundado) y el factor “salinidad” (con dos niveles: 150 mM de NaCl y 0 mM de NaCl). El análisis para todas las variables se comenzó con un ANVA de tres vías (debido a los 3 factores), para las variables que surgieron interacciones dobles, se separó el análisis en dos ANVAs de dos vías para las dos situaciones de salinidad, uno para el nivel 0 de NaCl y otro para el nivel 150 mM de NaCl. Se realizó de dicha manera porque la salinidad fue el factor que más modificó los parámetros. El número de repeticiones fue de 5 (cada unidad muestral correspondió a una planta individualmente cultivada en una maceta).

Cuando se detectaron diferencias significativas en los ANVAs, se aplicó una prueba de Duncan como método de análisis de comparación múltiple de medias.

Para las variables de la eficiencia del fotosistema II, por cada accesión se realizó una prueba de “t” de cada tratamiento en comparación con su respectivo control.

Para todos los casos en que se realizaron análisis y pruebas estadísticas, se empleó un nivel de significancia del 5%.

El análisis estadístico de la expresión relativa de genes se realizó mediante la aplicación de análisis desarrollada para analizar expresiones relativas de genes obtenidas por qRT-PCR, denominada “micromatrices de ADN” del programa InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011) con 5000 ciclos de remuestreo y comparación de a pares ($p < 0,05$).

3.4. Resultados

3.4.1. Efecto del estrés mixto de inundación y salinidad sobre la acumulación de biomasa y sus componentes

En los tratamientos en los cuales la salinidad estuvo presente (salino y mixto inundación-salinidad) pudo observarse que si bien en general todas las accesiones redujeron la biomasa del vástago con respecto a los tratamientos que no se sometieron a salinidad (inundado y control), las mismas tuvieron respuestas diferentes (interacción significativa entre los factores inundación y accesión dentro del nivel 150 mM de NaCl) (Figura 3.1.B). La mejor respuesta, tomando como criterio una mayor acumulación de biomasa de vástagos, se observó para el híbrido interespecífico (LtxLc) en el estrés mixto, con respecto al estrés únicamente salino (1,25 y 0,87 g MS por planta respectivamente). En las demás accesiones, la acumulación de biomasa de vástagos se afectó por el estrés mixto de forma similar al estrés provocado por salinidad únicamente, aunque con una tendencia clara a reducirla aún más en el cv. de *Lotus corniculatus* tetraploide (LcT) (0,62 y 0,95 g MS por planta en promedio en el estrés mixto y salino respectivamente). Una tendencia similar a lo observado para LtxLc en el estrés mixto se encontró en el parental *L. corniculatus* diploide (LcD) (0,62 y 0,35 g MS por planta para el estrés mixto y salino respectivamente) (Figura 3.1.B).

Para los tratamientos que no incluyeron salinidad (control e inundado), la biomasa de vástagos no presentó interacción entre los factores inundación y accesión ($p > 0,05$). Al analizar los efectos principales de los mismos se observó que LcT fue la accesión que más biomasa en vástago acumuló, sin diferenciarse de LtxLc, pero sí de *L. tenuis* (Lt) y de LcD (Figura 3.1.A). Si bien la biomasa de raíces de la accesión LcT se redujo en inundación sin salinidad, no se encontró reducción de la biomasa de los vástagos para ninguna accesión (Figura 3.1.A).

La biomasa de raíces en general para las diferentes situaciones fue mayor en LcT, pero fue la única accesión que presentó una reducción provocada por la inundación, tanto en los tratamientos sin salinidad (Figura 3.1.C), como también en los tratamientos en presencia de concentraciones elevadas de sales (Figura 3.1.D). Las demás accesiones no presentaron alteraciones destacables frente al estrés por inundación bajo nuestras condiciones experimentales.

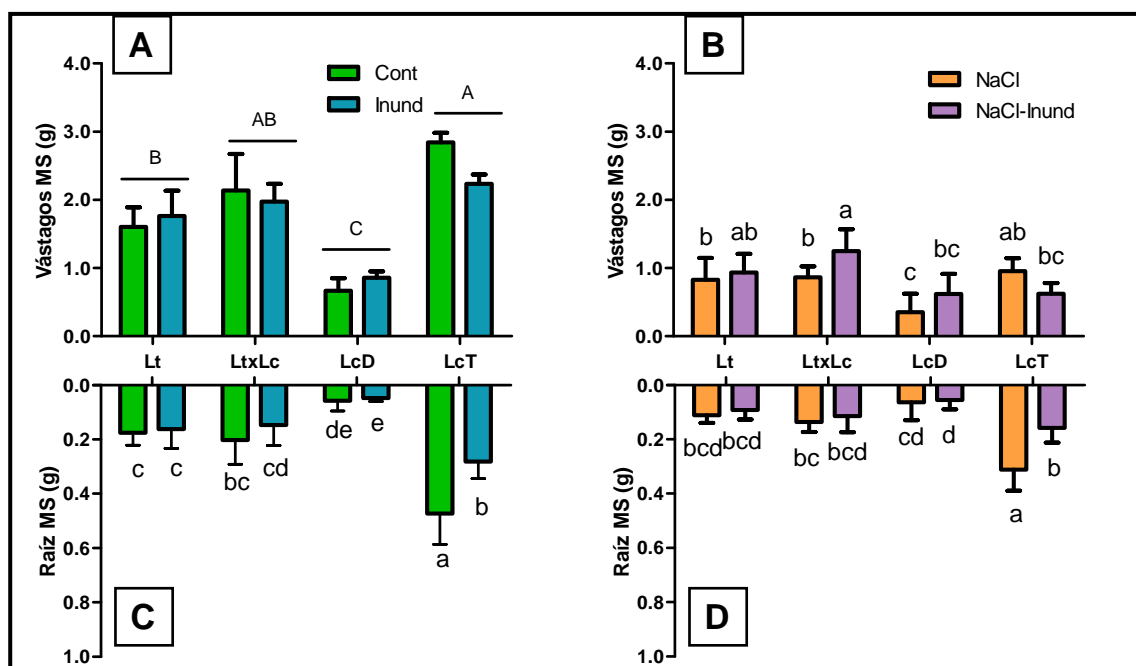


Figura 3.1. Biomasa seca (en g de MS) de plantas de 4 accesiones del género *Lotus* sometidas a 21 días de tratamientos de sumersión parcial (Inund), salinidad (NaCl), mixto salinidad-inundación (NaCl-Inund) y condición control (Cont). A y B: Vástagos. C y D: Raíces. Dentro de cada gráfico, las barras que no tienen ninguna letra en común, son significativamente diferentes (Prueba de Duncan, $p < 0,05$, $n=5$, $\pm DE$). En el gráfico A, la interacción del ANOVA (entre accesión e inundación) no fue significativa ($p > 0,05$), los efectos principales mostraron que el factor accesión fue significativo ($p < 0,05$) mientras que el factor inundación no ($p > 0,05$), y las diferencias son indicadas en letras mayúsculas. Lt: *Lotus tenuis*; LtxLc: híbrido interespecífico entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*; LcD: *L. corniculatus* diploide y LcT: *L. corniculatus* tetraploide.

A los 20 días de comenzados los tratamientos de estrés por aclimatación salina (principalmente cuando se trató del salino y el mixto), el efecto deletéreo de los tratamientos sobre el estado general de la parte aérea de la planta ya resultaba evidente (Figura 3.2). En ese momento, como puede observarse en la Figura 3.2 ya se insinuaba una respuesta diferencial entre algunas accesiones cuando eran sometidas al estrés mixto, siendo muy contrastante el estado de las plantas de LtxLc con respecto a las de LcT. Asimismo, era posible observar una mejor respuesta del híbrido LtxLc frente al estrés mixto que frente al estrés provocado únicamente por la salinidad.

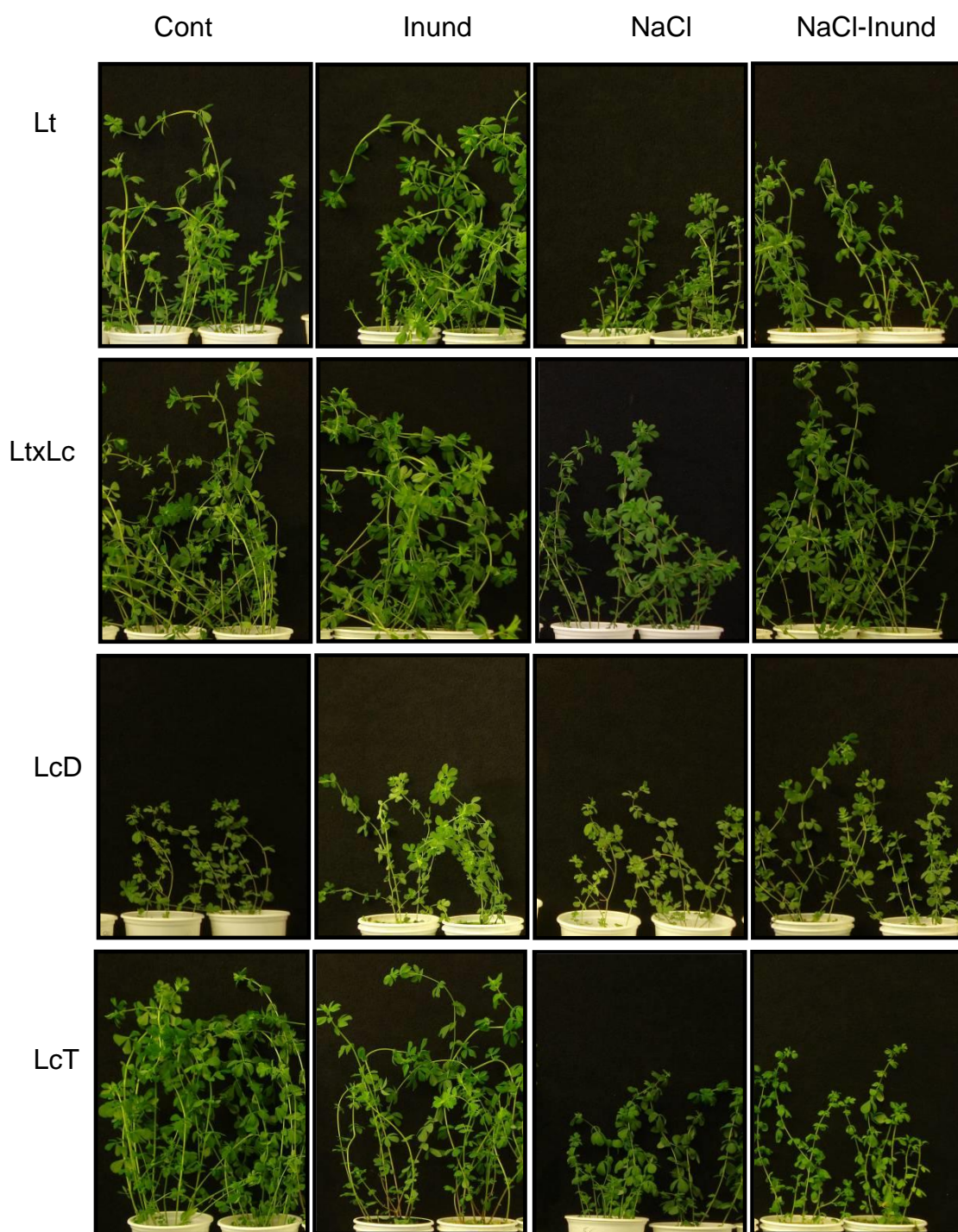


Figura 3.2. Estado fenotípico de las plantas de 4 accesiones del género *Lotus* en el día 8 desde que se completaron los tratamientos de aclimatación salina. Tratamientos: sumersión parcial (Inund), salinidad (NaCl), mixto salinidad-inundación (NaCl-Inund) y condición control (Cont). Lt: *Lotus tenuis*; LtxLc: híbrido interespecífico entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*; LcD: *L. corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide.

3.4.2. Efecto del estrés mixto de inundación y salinidad sobre la concentración de iones en las diferentes fracciones de la biomasa

Los tratamientos que incluyeron salinidad aumentaron considerablemente la concentración de iones Na^+ y Cl^- en las hojas (apicales y basales) en todas las accesiones con respecto a las situaciones que no la incluyeron (Figura 3.3 y Figura S.3.1 del anexo). En las hojas apicales de las plantas que se sometieron a estrés mixto de inundación y salinidad, y también las sometidas a únicamente salinidad, se observó que las accesiones respondieron diferencialmente en la concentración de ambos iones (se detectó interacción accesión x inundación). Las concentraciones de iones Na^+ y Cl^- del tratamiento mixto de inundación y salinidad comparadas con aquellas observadas en plantas bajo tratamiento de estrés por salinidad solamente, casi se duplicaron en la accesión LcT, mientras que en las demás accesiones, se observaron concentraciones similares entre ambas condiciones experimentales (Figura 3.3.A y C). La accesión Lt en los tratamientos con salinidad presentó los menores niveles de Cl^- en sus hojas apicales, seguido por el material híbrido LtxLc, el cual a su vez, no se diferenció de su parental LcD. También dentro de los tratamientos con salinidad, se observó que la concentración de Na^+ en las hojas apicales de Lt sometidas a salinidad solamente, fue la más baja. Dicha concentración de Na^+ no se diferenció de las obtenidas para la misma accesión de Lt cuando se sometió a la condición mixta, y tampoco de la concentración determinada para LcD en presencia de salinidad solamente (Figura 3.3.C). Las demás condiciones y accesiones tuvieron niveles similares de Na^+ en sus hojas apicales, excepto LcT en la condición mixta de inundación y salinidad que al igual que para el Cl^- , casi duplicó su concentración con respecto a los niveles obtenidos para el tratamiento de salinidad solamente.

En las condiciones sin aplicación de salinidad (únicamente inundación y control), los niveles de Na^+ y Cl^- en las hojas apicales y basales, fueron muy bajos en comparación con los tratamientos con 150 mM de NaCl y no se modificaron por la inundación (Figura S.3.1 del anexo).

En las hojas basales, en los tratamientos que incluyeron 150 mM de NaCl, la inundación incrementó la concentración de los iones Na^+ y Cl^- en todas las accesiones (se detectó efecto del factor inundación), en forma independiente a ellas (interacción accesión x inundación no significativa). Las accesiones se diferenciaron entre ellas, siendo Lt nuevamente, al igual que para las hojas apicales, la que menos iones tóxicos acumuló, seguida en orden ascendente por el material híbrido LtxLc y su parental LcD, que no se diferenciaron entre sí. La mayor acumulación de estos iones se determinó en la accesión LcT (Figura 3.3.B y D).

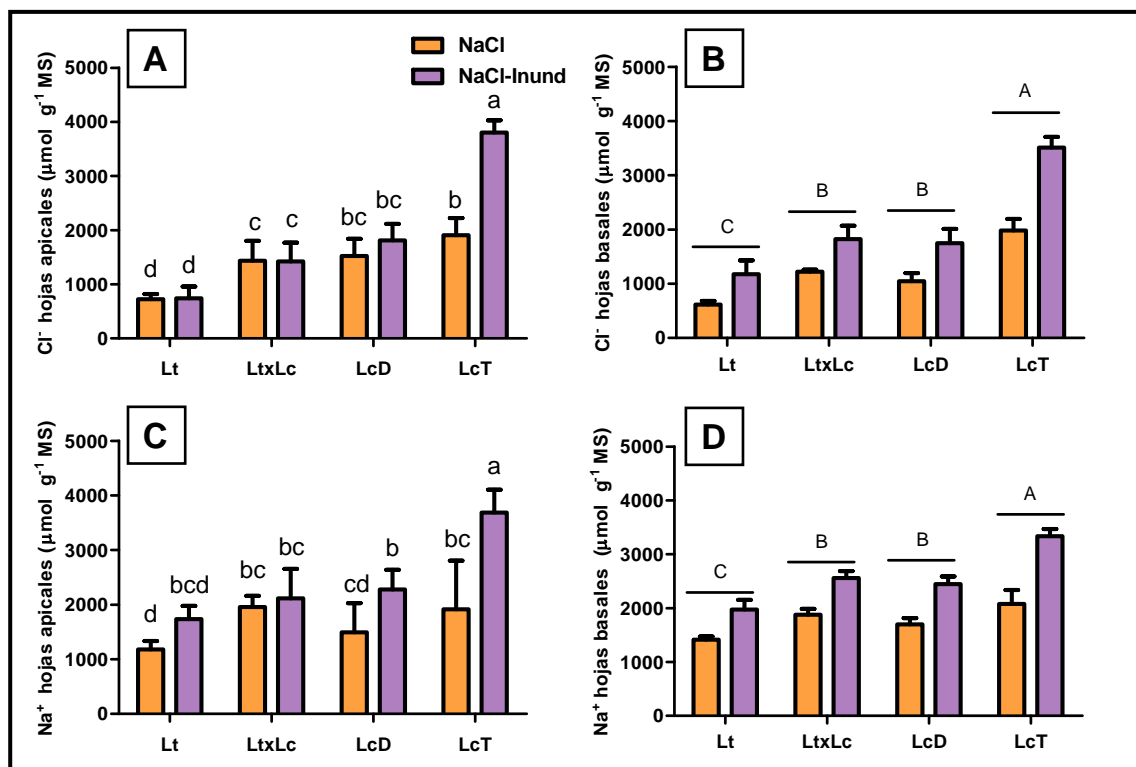


Figura 3.3. Concentración de iones Cl⁻ y Na⁺ en hojas apicales y basales (en μmol por g de MS) de las plantas de 4 accesiones del género *Lotus* sometidas a 21 días de tratamientos de salinidad (NaCl) y mixto salinidad-inundación (NaCl-Inund). A y B: concentración del ion Cl⁻ en hojas apicales y basales respectivamente. C y D: concentración del ion Na⁺ en hojas apicales y basales respectivamente. Dentro de cada gráfico, las barras que no tienen ninguna letra en común, son significativamente diferentes (Prueba de Duncan, $p < 0,05$, $n = 5$, $\pm \text{DE}$). En el gráfico B y D, la interacción del ANOVA (entre Accesoión e Inundación) no fue significativa y se detectó diferencia entre accesiones, las cuales se indican con letras mayúsculas y además el factor inundación aumentó la concentración de los iones. Lt: *Lotus tenuis*; LtxLc: híbrido interespecífico entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*; LcD: *L. corniculatus* diploide y LcT: *L. corniculatus* tetraploide.

Con respecto a la concentración del ion K⁺ en las hojas apicales, los efectos de los tres factores fueron significativos e independientes entre ellos (no se detectó interacción triple ni ninguna doble entre los factores accesoión, inundación y salinidad). En este sentido, la salinidad y la inundación disminuyeron la concentración de K⁺ en las hojas apicales. En la accesoión LtxLc se observó menor concentración de dicho ion, independientemente de la salinidad y de la inundación (Figura 3.4.A).

La concentración de K⁺ en las hojas basales de las plantas que recibieron 150 mM de NaCl, difirió entre las accesiones y respondió dependiendo de la inundación (pudo observarse interacción accesoión x inundación). Todas las accesiones disminuyeron la concentración de K⁺ de sus hojas basales en el tratamiento mixto en comparación con el tratamiento de únicamente salinidad. LcT en esta última situación de estrés, fue la que mayor concentración de K⁺ mantuvo en sus hojas basales. Sin embargo fue también la que proporcionalmente más redujo la concentración de dicho ion al ser sometida a inundación durante el estrés mixto. Los valores obtenidos para el material híbrido en el estrés mixto, no se distinguieron significativamente de los valores observados en su parental LcD bajo la misma condición. (Figura 3.4.B).

La concentración de K⁺ en las hojas basales de las plantas que no recibieron 150 mM de NaCl, disminuyó por la inundación, independientemente de las accesiones (se detectó

efecto del factor inundación y no hubo interacción entre accesión x inundación) (Figura S.3.2.A del anexo).

Teniendo en cuenta la relación en base molar entre los iones K^+ y Na^+ (K^+/Na^+) en las hojas apicales y basales, se observó una fuerte caída general en dicha relación en todas las accesiones cuando las plantas se sometieron a 150 mM de NaCl con respecto a aquellas que no se sometieron a esa condición de estrés (Figura 3.4.C y D; Figura S.3.2.B del anexo). Analizando la misma relación en ápices de plantas sometidas al tratamiento de salinidad y estrés mixto de inundación y salinidad (Figura 3.4.C), se observó que la inundación disminuyó la relación K^+/Na^+ independientemente de las accesiones (no se detectó interacción accesión x inundación; se detectó efecto del factor inundación). También se observaron diferencias entre las accesiones, siendo el material híbrido LtxLc el que menor relación K^+/Na^+ presentó pero sin diferenciarse significativamente de los valores observados para LcT (Figura 3.4.C).

En los tratamientos sin salinidad, la relación K^+/Na^+ de las hojas apicales de las plantas inundadas con respecto a las controles se mantuvo en valores similares a excepción de LcT en la cual se observó una reducción con respecto a su control (Figura S.3.2.B del anexo).

La relación K^+/Na^+ en las hojas basales se redujo por el efecto de los factores inundación y salinidad, independientemente entre sí y del factor accesión (no se observó ninguna interacción doble ni triple; se detectó efecto del factor inundación y del factor salinidad; no existió efecto del factor accesión) (Figura 3.4.D).

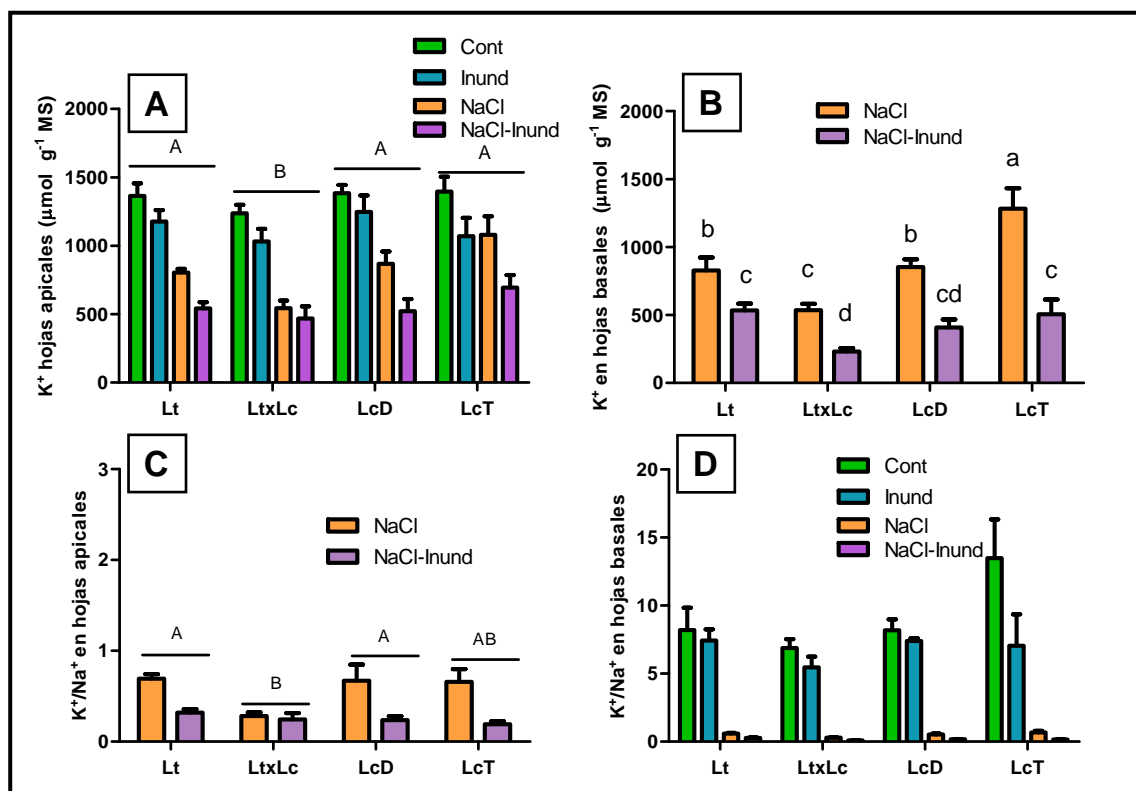


Figura 3.4. Concentración de K^+ (en μmol por g de MS) y relación molar K^+/Na^+ en hojas de plantas de 4 accesiones del género *Lotus* sometidas a 21 días de tratamientos de sumersión parcial (Inund), salinidad (NaCl), mixto salinidad-inundación (NaCl-Inund) y condición control (Cont). A: concentración de K^+ en hojas apicales, no se detectó la presencia de ninguna interacción entre los factores (ni dobles ni la triple), los efectos principales de los factores fueron los tres significativos y se muestran con letras mayúsculas las diferencias entre accesiones. B: concentración de K^+ en hojas basales. C: relación K^+/Na^+ en hojas apicales, no se detectó interacción entre accesión e inundación y se muestran las diferencias entre accesiones con letras mayúsculas. D: relación K^+/Na^+ en hojas basales, no se detectó la presencia de ninguna interacción entre los factores (ni dobles ni la triple) y los efectos principales de los factores inundación y salinidad fueron significativos y los dos disminuyeron la relación. Dentro de cada gráfico, las barras que no tienen ninguna letra en común, son significativamente diferentes (Prueba de Duncan, $p < 0,05$, $n=5$, $\pm\text{DE}$). Lt: *Lotus tenuis*; LtxLc: híbrido interespecífico entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*; LcD: *L. corniculatus* diploide y LcT: *L. corniculatus* tetraploide.

Con respecto al estado fenotípico de los ápices y otras hojas de las plantas de LcT durante el estrés mixto de inundación y salinidad al momento de la cosecha, estas mostraron a simple vista un claro deterioro. Se observó pérdida de turgencia, varias hojas secas en cada vástago, características todas estas que no se evidenciaron en las otras accesiones (Figura 3.5) y tampoco en las plantas del propio LcT en situación de estrés provocado únicamente por la salinidad.

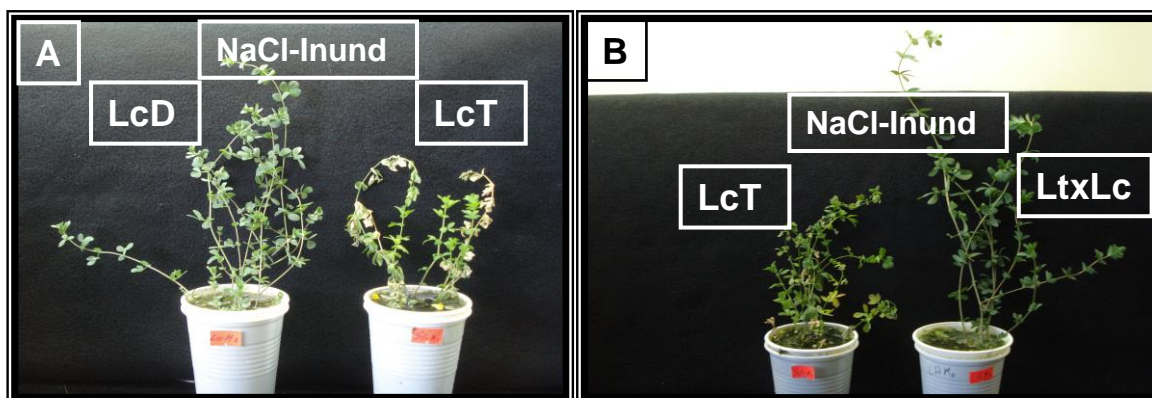


Figura 3.5. Efecto de 21 días de tratamiento mixto salinidad-inundación (NaCl-Inund) sobre 3 accesiones del género *Lotus*. A: Imagen del estado de LcD y LcT al momento de la cosecha de biomasa, donde se pueden observar daños por fitotoxicidad iónica en LcT. B: Imagen del estado de LcT y de LtxLc al momento de la cosecha. LcD: *Lotus corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide; LtxLc: híbrido interespecífico entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*.

3.4.3. Efecto del estrés mixto de inundación y salinidad sobre la expresión relativa de genes vinculados a la compartimentalización subcelular de iones Na^+ y Cl^-

La expresión relativa de genes que codifican transportadores involucrados en la compartimentalización subcelular de los iones Na^+ y Cl^- , se evaluó en ápices de vástagos de plantas cultivadas en situación control y en estrés mixto de inundación y salinidad, condición de estrés que más se diferenció entre las accesiones en cuanto a su respuesta general. Se observó que en la expresión relativa del gen *CLC-f*, el cual codifica para un canal de Cl^- en membranas subcelulares, se indujo en el material híbrido LtxLc y en su parental LcD con respecto a sus controles. En las restantes dos accesiones, Lt y LcT no se observó una modificación en el nivel de transcripción de dicho gen con respecto a los controles (Figura 3.6.A).

Por otro lado, el gen *LtNHX1*, que codifica para un antitransportador Na^+/H^+ del tonoplasto, se indujo en el híbrido interespecífico LtxLc en la condición de estrés mixto en comparación a su control. Asimismo, en la accesión Lt se encontró reprimida la expresión relativa de este gen en la situación de estrés mixto con respecto a la situación control (Figura 3.6.B).

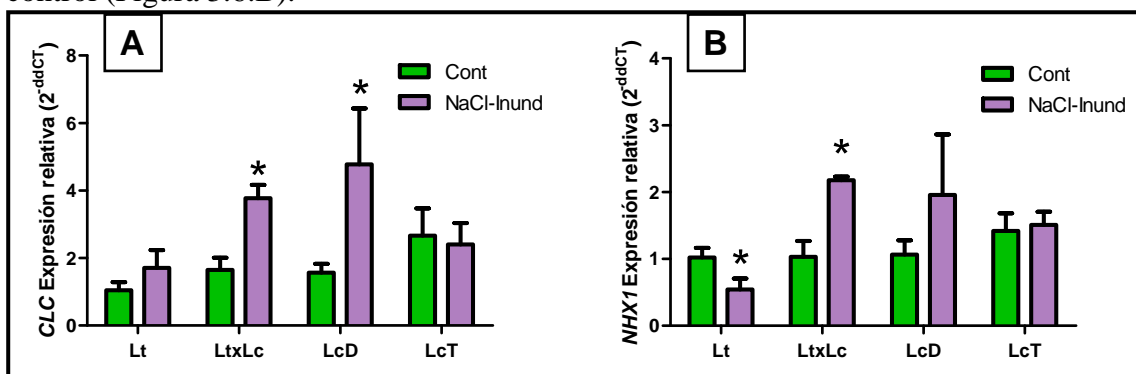


Figura 3.6. Expresión relativa de los genes *CLC-f* (A) y *LtNHX1* (B) en plantas de 4 accesiones del género *Lotus* sometidas a 21 días de tratamiento mixto salinidad-inundación (NaCl-Inund) y condición control (Cont). Valores son expresados como $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ referidos a Lt Cont ($n=3 \pm \text{DE}$). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto a la situación control ($p < 0,05$). Lt: *Lotus tenuis*; LtxLc: híbrido interespecífico entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*; LcD: *L. corniculatus* diploide y LcT: *L. corniculatus* tetraploide.

3.4.4. Efecto del estrés mixto de inundación y salinidad sobre la fotosíntesis neta y parámetros del fotosistema II

La tasa de fotosíntesis neta determinada como el intercambio neto de CO₂ a luz saturante, en general se redujo fuertemente en todas las accesiones cuando estuvo presente la salinidad en los tratamientos (estrés únicamente por salinidad y estrés mixto de inundación y salinidad). En esta situación, las accesiones tuvieron respuestas diferenciales frente a la inundación (existió interacción accesión x salinidad). Se encontró que el híbrido LtxLc y su parental LcD incrementaron fuertemente las tasas de intercambio neto de CO₂ en la situación de estrés mixto con respecto al estrés por salinidad solamente. Por otro lado, las accesiones Lt y LcT tuvieron tasas similares entre las plantas sometidas a estrés mixto y las sometidas a salinidad solamente (Figura 3.7.B). En la situación de los tratamientos sin salinidad (inundación y control), LcT fue la única accesión que debido a la inundación redujo su tasa fotosintética con respecto a su control. Simultáneamente en LcD se observó una tendencia a incrementar dicha tasa debido a la inundación (Figura 3.7.A).

Con respecto a los parámetros relacionados a la eficiencia y funcionamiento del fotosistema II, determinados mediante mediciones basadas en la fluorescencia transitoria de la clorofila, se observó que LcT fue la única accesión que presentó una reducción del rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm; Figura 3.7.C) y del índice de performance (PIabs; Figura 3.7.D) en el tratamiento de salinidad, y en mayor magnitud en el tratamiento mixto, siempre con respecto a la situación control.

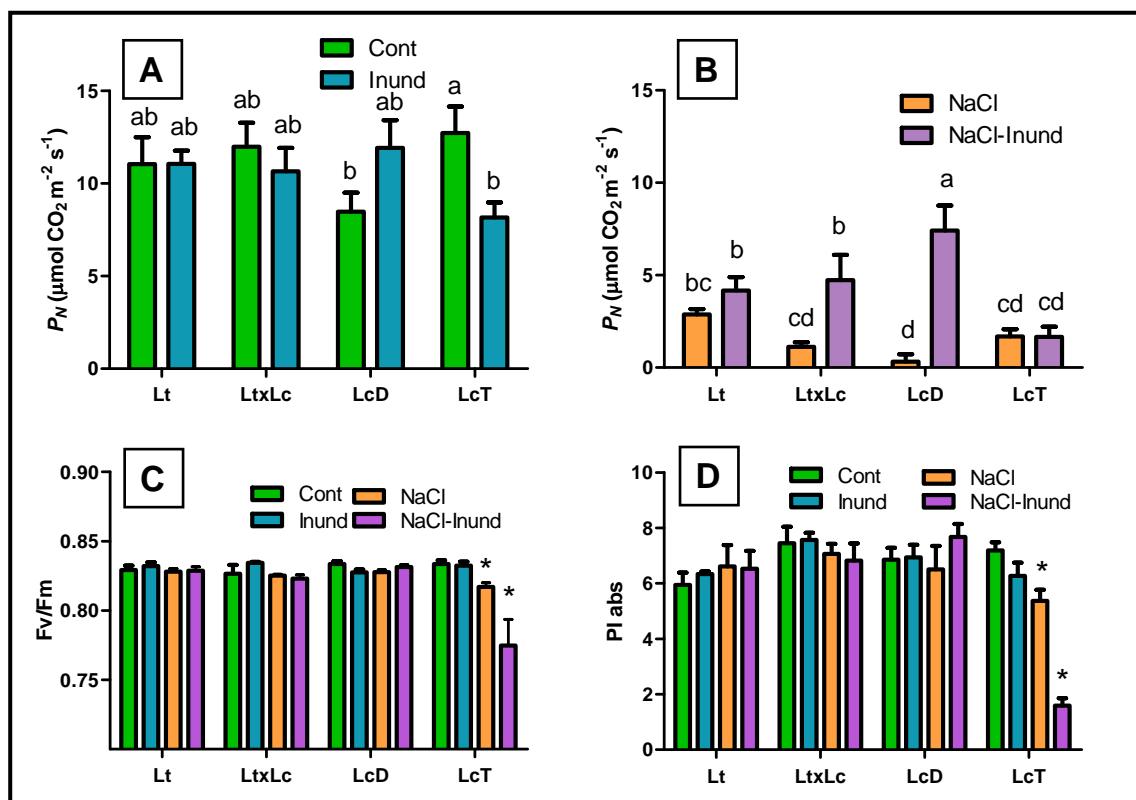


Figura 3.7. Respuestas fisiológicas de plantas de 4 accesiones del género *Lotus* sometidas a 21 días de tratamientos de sumersión parcial (Inund), salinidad (NaCl), mixto salinidad-inundación (NaCl-Inund) y condición control (Cont). A y B: tasa de intercambio neto de CO₂ a luz saturante (P_N). Dentro de cada gráfico, las barras que no tienen ninguna letra en común, son significativamente diferentes (Prueba de Duncan, $p < 0,05$, $n=5$, $\pm DE$). C: rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria (F_v/F_m) y D: índice de performance (PI abs). En C y D cada tratamiento se comparó frente a la situación control mediante una prueba de t bilateral, y las diferencias se indicaron con asteriscos ($p < 0,05$). Lt: *Lotus tenuis*; LtxLc: híbrido interespecífico entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*; LcD: *L. corniculatus* diploide y LcT: *L. corniculatus* tetraploide.

3.5. Discusión

3.5.1. Efecto del estrés mixto de inundación y salinidad sobre la acumulación de biomasa y fotosíntesis neta

Como respuesta general de las plantas de todas las accesiones, la acumulación de biomasa en los vástagos se redujo cuando los tratamientos incluyeron salinidad (tratamiento de salinidad solamente y el mixto entre inundación y salinidad). Al respecto, se ha considerado que este resultado pudo deberse en mayor medida, al efecto osmótico provocado por la salinidad, según el modelo de dos fases propuesto por otros autores (Munns, 2002; Zhu, 2003). En el tratamiento de únicamente salinidad, para el período y el nivel aquí aplicado (150 mM de NaCl durante 21 días, con previa aclimatación salina), más allá de la reducción en el crecimiento, no se observaron ni síntomas, ni otros indicios de toxicidad en ninguna de las accesiones. Por lo tanto, todas las accesiones presentaron un destacable grado de tolerancia al estrés por salinidad, si se considera la supervivencia y el estado general de las plantas como criterios para establecerlo. Esto concuerda con las observaciones realizadas previamente para dos de

las especies de este género analizadas en este trabajo de tesis, evaluadas en situaciones experimentales de salinidad similares (*L. tenuis* y *L. corniculatus* tetraploide) (Teakle *et al.*, 2006, 2010).

Cuando las plantas se sometieron únicamente al estrés por sumersión parcial (inundación), y tal como era de esperarse por tratarse de especies descritas previamente como tolerantes a este estrés (revisado por Striker y Colmer, 2016), las accesiones presentaron pocos efectos deletéreos, tales como la reducción de la biomasa en el cultivar tetraploide comercial de *L. corniculatus* (LcT) y el aumento de la relación vástago-raíz provocada por la inundación en todas las accesiones. Las proporciones de biomasa de vástagos y de raíces se pueden observar en la Figura 3.1, (los cálculos y análisis de la relación no son presentados).

La situación más interesante y contrastante entre las accesiones, surgió frente a la combinación de los estreses, es decir, en la condición de estrés mixto de inundación y salinidad. Ha sido ampliamente reportado para la mayoría de las plantas cultivadas, que el efecto de la salinidad es exacerbado por la inundación cuando ambos estreses ocurren en simultáneo, tornándose una situación más perjudicial que aquella que se presumiría como solo la suma de ambos estreses por separado (Barrett-Lennard, 2003; Bennett *et al.*, 2009). Esta observación fue muy evidente en LcT para la mayoría de los parámetros evaluados y también por el estado general de las plantas de esta accesión, tomando como ejemplo la aparición de los típicos síntomas de toxicidad iónica provocada por la salinidad (aparición de hojas secas desde los márgenes y la muerte de algunos ápices de las plantas) (Figura 3.5). También en esta misma accesión se observó una tendencia a la reducción mayor de la biomasa durante el estrés mixto que cuando se sometieron las plantas al estrés por salinidad solamente. Bajo nuestras condiciones experimentales, la diferencia en la menor acumulación de biomasa en los vástagos en plantas de la accesión LcT sometidas al estrés mixto, no llegó a ser significativa con respecto a lo determinado bajo la situación de estrés por salinidad solamente. Sin embargo debe tenerse en cuenta que al momento de la cosecha, las hojas secas (presentes en LcT en situación de estrés mixto) no se separaron de las que aún no presentaban efectos deletéreos evidentes a simple vista, y todas se incluyeron en la determinación de la biomasa seca total, pudiendo esto probablemente enmascarar las diferencias.

El material híbrido interespecífico LtxLc bajo las condiciones de estrés mixto de inundación y salinidad, presentó una mayor acumulación de biomasa aérea que frente al estrés provocado únicamente por la salinidad (Figura 3.1), lo que deja en evidencia que la sumersión parcial (inundación) podría tener un efecto atenuante sobre el estrés salino en este material vegetal. Este interesante hallazgo para una especie leguminosa, también fue reflejado en el estado general de las plantas (Figuras 3.2 y 3.5.B) y por los otros parámetros medidos, como por ejemplo, la mayor tasa de fotosíntesis neta que se observa en el estrés mixto (Figura 3.7). En este sentido, también su parental *L. corniculatus* diploide (LcD) presentó una mayor tasa de fotosíntesis en el estrés mixto que en el provocado por la salinidad únicamente. Además, para la misma accesión fue posible observar una tendencia a una mayor acumulación de biomasa en los vástagos en el estrés mixto, que lo observado en simultáneo frente al estrés provocado por agregado de iguales concentraciones de sal pero en condiciones de libre drenaje (Figura 3.7). Estas respuestas encontradas en LcD, podrían estar indicando que estos rasgos de tolerancia, son transferidos desde este parental de procedencia española, hacia el material híbrido. Una respuesta más favorable en el estrés mixto de inundación y salinidad que en el estrés por salinidad sola, ha sido poco reportada en la literatura. Solo recientemente se ha observado que en la planta *Mentha aquatica*, la inundación ayudó a

morigerar el efecto de la salinidad, probablemente debido a un incremento en la actividad antioxidante y de la estabilidad de membranas (Haddadi *et al.*, 2016).

3.5.2. Efecto del estrés mixto de inundación y salinidad sobre la concentración de iones en la biomasa de las plantas

Con respecto a la concentración de iones Na^+ y Cl^- en las hojas, es sabido que para la mayoría de las plantas cultivadas, el estrés mixto de inundación y salinidad produce un incremento mayor de la concentración de estos iones hacia el vástago, que cuando las plantas están sometidas a estrés únicamente por salinidad (Galloway y Davidson, 1993; Barrett-Lennard, 2003). En los resultados de esta tesis, esto fue muy evidente en la accesión menos tolerante (LcT), ya que el estrés mixto, efectivamente provocó un mayor incremento de los iones Na^+ y Cl^- tanto para las hojas apicales como en las basales (Figura 3.3). Dicha observación fue consistente con los síntomas de las plantas resultando evidente el comienzo de la muerte de las hojas desde sus márgenes y de los tejidos apicales en general (Figura 3.5). Además LcT fue la única accesión que presentó parámetros del fotosistema II afectados por las condiciones salinas (Figura 3.7.C y D), sugiriendo daños en el mismo.

En la accesión Lt se observó una respuesta muy contrastante con respecto a LcT en dos sentidos: por un lado, en Lt el estrés mixto no aumentó la concentración de los iones nocivos con respecto al estrés provocado únicamente por la salinidad, y por otro lado, los valores de esas concentraciones, fueron muy inferiores a los valores que presentó la accesión menos tolerante (LcT) (Figura 3.3). Estas respuestas, sumadas a observaciones previas similares realizadas por Teakle *et al.* (2006 y 2007) para estas dos especies, sugieren que Lt posee mecanismos eficientes de exclusión de los iones nocivos, que no permiten que las concentraciones de estos lleguen a ser severamente perjudiciales a nivel de vástagos, y que, además, esos mecanismos pueden ser eficazmente mantenidos en condiciones del estrés mixto de inundación y salinidad.

Particularmente para el caso del Cl^- , la concentración de este anión en vástagos se ha encontrado fuertemente correlacionada (en forma negativa) con el nivel de tolerancia, e incluso con una correlación negativa mayor que la observada con la concentración de Na^+ en vástagos de géneros de leguminosas tales como *Trifolium* (Winter, 1982; Rogers *et al.*, 1997), *Medicago* (Sibole *et al.*, 2003), *Glycine* (Luo *et al.*, 2005) y *Lotus* (Teakle *et al.*, 2006; Teakle *et al.*, 2007). De todas maneras, es importante tener presente que el Cl^- es considerado un micronutriente esencial que regula actividades de enzimas en el citoplasma, y también es un cofactor esencial en la fotosíntesis. Además está involucrado en regulaciones de pH y de turgencia (Xu *et al.*, 2000; White y Broadley, 2001). Sin embargo, el Cl^- puede ser tóxico para las plantas en altas concentraciones, y se han reportado valores críticos que resultan ser tóxicos a partir de 115-200 $\mu\text{moles por g de MS}$ para las plantas consideradas “sensibles” y de 425-1410 $\mu\text{moles por g de MS}$ para las consideradas “tolerantes” (Xu *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta los valores estimados por esos autores para plantas tolerantes a salinidad, pudimos determinar que Lt fue capaz de mantener al Cl^- por debajo de una concentración de 1000 $\mu\text{moles por g de MS}$ en plántulas sometidas al estrés salino y también frente al estrés mixto, lo que afianza aún más la hipótesis de que se activarían mecanismos de exclusión (o de “no entrada”) para este anión en esta especie. Por el contrario, las plantas de LcT y sobre todo las sometidas al estrés mixto, superaron alrededor de 4 veces estos valores (Figuras 3.3.A y B), y consistentemente se evidenciaron síntomas de toxicidad y otros fenotipos que sugieren daños concurrentes en el fotosistema II.

En las accesiones experimentales LcD y el híbrido LtxLc, las plantas sometidas a estrés mixto de inundación y salinidad con respecto a las sometidas únicamente a salinidad, no aumentaron sus concentraciones de Cl^- en las hojas apicales, y el material LtxLc tampoco incrementó la concentración de Na^+ (Figura 3.3). Tanto el híbrido interespecífico como la accesión diploide de *L. corniculatus* presentaron valores intermedios entre las dos accesiones más contrastantes (Lt y LcT). Esto podría estar indicando que en parte, activaron mecanismos de exclusión. Pero si se toman en cuenta los valores críticos estimados para toxicidad por Cl^- previamente detallados, los niveles de concentración en LcD y LtxLc superaron los mismos y debieron haber presentado síntomas evidentes de toxicidad en las hojas. Sin embargo, ninguna evidencia de toxicidad iónica se puso de manifiesto en estas dos accesiones experimentales. Este puede resultar un indicio de importancia que sugiere la activación de los mecanismos de compartimentalización subcelular o “secuestro” de iones nocivos en compartimentos intracelulares a nivel de las hojas. Posiblemente este mecanismo evitaría que los iones nocivos dañen las enzimas citoplasmáticas de sitios metabólicamente muy activos, como el mesófilo de las hojas en crecimiento. Para hacer una aproximación hacia esa hipótesis, se midieron las expresiones relativas de dos genes involucrados en el proceso de compartimentalización del Na^+ y del Cl^- . Esta posibilidad se analizó y se discutió en el próximo apartado de este capítulo (3.5.3).

Por otro lado, es frecuentemente reportado en la bibliografía, que el estrés por salinidad en plantas de cultivos, además de provocar un incremento de los iones Na^+ y Cl^- , también induce una caída en la concentración celular de K^+ (Greenway y Munns, 1980; Maathuis y Amtmann, 1999). En nuestros resultados se observó que, efectivamente, la salinidad redujo la concentración de K^+ en las hojas de todas las accesiones. Por su parte, el estrés por inundación también redujo la concentración de K^+ , y los efectos adversos de los dos estreses observados en el estrés mixto, fueron aditivos y condujeron a las menores concentraciones determinadas para este catión (Figura 3.4).

Resulta conocido el hecho de que la similitud en las características fisicoquímicas entre el Na^+ y el K^+ determina que estos iones compitan entre sí, poniendo en riesgo un amplio rango de procesos citoplasmáticos claves como reacciones enzimáticas, síntesis de proteínas y funciones de los ribosomas, por lo que ha sido propuesto que resulta esencial la determinación de la relación de concentraciones que mantienen entre ellos (Shabala y Cuin, 2008). En este sentido, habitualmente se asocia como rasgo de identidad de las especies vegetales con mayor grado de tolerancia a la salinidad, el de mantener lo más invariable posible la relación K^+/Na^+ en sus tejidos (Munns y Tester, 2008). Con respecto a esto, los resultados en este capítulo de la tesis no mostraron correspondencia con dicha afirmación ya que se observó en todas las accesiones una fuerte reducción de dicha relación cuando se sometieron a los tratamientos bajo condiciones de salinidad (Figura 3.4), y no se encontró correspondencia con los diferentes grados de tolerancia que sí pudieron observarse en la mayoría de los demás parámetros evaluados. Es oportuno mencionar que ya ha sido reportado previamente que en diversas plantas halófitas y en algunas glicófitas con mayor grado de tolerancia a la salinidad, la relación K^+/Na^+ no siempre es invariable frente a niveles crecientes de salinidad, y que frecuentemente no es posible establecer una correlación clara con respecto a la tolerancia, definida ésta en base a otros parámetros (Colmer *et al.*, 2009; Flowers *et al.*, 2014). Esto podría deberse a que una proporción significativa del K^+ de las hojas, se localiza en las vacuolas, cumpliendo principalmente la función física de generación de turgencia. La clave estaría, en que en ciertas especies de plantas, este rol del ion K^+ en las vacuolas puede ser reemplazado por el Na^+ (Leigh y Wyn Jones, 1986; Kronzucker *et al.*, 2013). Por lo tanto, si bien el estrés por salinidad disminuye la

concentración de K^+ en los tejidos de las plantas, no necesariamente ello implicaría que disminuya su concentración en el citoplasma (Flowers *et al.*, 2014). Esto sugiere que para aquellas plantas que tienen una fuerte capacidad de compartimentalizar subcelularmente al Na^+ , la relación K^+/Na^+ a nivel de tejido no estaría asociada con su tolerancia a la salinidad, como sí ocurriría en otras especies vegetales que carecen de dicha capacidad. Esto es otro indicio de importancia que pone de manifiesto la relevancia de las proteínas transportadoras de membranas con función de regular la concentración iónica en los diferentes compartimentos intracelulares. Una mayor discusión al respecto se realizó en el siguiente apartado de esta tesis.

3.5.3. Regulación de genes vinculados a la compartimentalización subcelular de iones Na^+ y Cl^-

La expresión relativa de genes involucrados en la compartimentalización subcelular de los iones Na^+ y Cl^- se evaluó en la situación de estrés que más diferenció a las accesiones en cuanto a su respuesta general, es decir, el estrés mixto entre inundación y salinidad. Por ello, se estudiaron las expresiones relativas de dos genes que codifican para proteínas de membranas intracelulares con función de transportadoras de Na^+ y Cl^- : el gen *LtNHXI* que codifica para un intercambiador Na^+/H^+ y el gen *CLC-f* que lo hace para un canal de Cl^- en membranas del aparato de Golgi. De esta manera, pudo observarse la existencia de una inducción significativa en la expresión tanto de *LtNHXI* como de *CLC-f* en el material híbrido LtxLc en la condición del estrés mixto con respecto a su control (Figura 3.6). Esta capacidad, se la habría otorgado el parental LcD, ya que en las mismas condiciones de estrés, en dicha accesión también se indujo significativamente la expresión de *CLC-f*, y una tendencia similar pudo observarse para la expresión del gen *LtNHXI*. En contraste con estas respuestas, en el cultivar tetraploide LcT, no se observó un incremento en la expresión de estos transportadores de membrana con respecto a su control. Estos resultados sugieren que para aquellos materiales que acumulan cantidades elevadas de los iones nocivos en sus tejidos, existiría una fuerte asociación entre la inducción de estos genes y la tolerancia al estrés por salinidad. Por otro lado, en la accesión Lt no se indujo la expresión relativa de ninguno de los dos genes evaluados, lo que sugiere que su mayor tolerancia (con respecto a LcT) se debería a una menor acumulación de los iones en los tejidos, sin que se alcancen niveles tóxicos de los mismos. Esto último también indicaría que los mecanismos de “exclusión” de los iones en Lt resultan más eficientes que en las demás accesiones, aspecto que ya se discutió en el apartado anterior (3.5.2).

Por otra parte, y tal como se explicó en el apartado 3.3.7 de este capítulo, mediante análisis *in silico* se determinó que el canal de Cl^- (*CLC-f*) se localizaría en las membranas de vesículas del aparato de Golgi, lo que estaría vinculado a la compartimentalización de los iones Cl^- , excluyéndolos del citoplasma. Además podría estar conduciendo a su vez, a la incorporación de esos iones al sistema de secreción de desechos celulares (que el aparato de Golgi lleva a cabo) mediante la formación de vesículas de exportación de productos. Para comprobar estas hipótesis, se deberían realizar estudios de localización *in situ* de este canal transportador, y determinar que esté cumpliendo la función que sugieren nuestros datos, aspecto que tendríamos previsto como trabajo futuro. Con respecto a esto, los *CLCs* en general, ya han sido vinculados en la tolerancia a la salinidad para diferentes especies vegetales (Nakamura *et al.*, 2006; Jossier *et al.*, 2010), y particularmente para el gen ortólogo *CLC-f* en *vid*, especie en la cual se reportó una expresión constitutiva en las variedades tolerantes a la

salinidad, lo que se diferenci6 de lo observado en simult6neo en las accesiones clasificadas como sensibles (Henderson *et al.*, 2014).

Por otra parte, en trabajos recientes, se ha logrado mejorar significativamente la tolerancia a la salinidad en *L. corniculatus* (Bao *et al.*, 2014) y alfalfa (Bao *et al.*, 2016) mediante transg6nesis de plantas que co-expresaron dos genes de tonoplasto clonados a partir de la planta xer6fita suculenta *Zygophyllum xanthoxylum*. Se ha sugerido que dicha especie utiliza de manera muy efectiva la acumulaci6n de Na^+ en las vacuolas de todos los tejidos, para disminuir su potencial osm6tico y lograr extraer agua ajustando su potencial osm6tico a partir de suelos salinos y secos. Uno de estos genes codifica para una prote6na que facilitar6a la acumulaci6n de Na^+ en vacuolas, mientras que el otro gen, codificar6a para una H^+ -pifosfatasa. En las plantas transg6nicas, adem6s de la mayor tolerancia a la salinidad, se encontr6 mayor tolerancia a la sequ6a, y los autores asociaron estas respuestas a una mayor concentraci6n de Na^+ y K^+ en las hojas, sin haber presentado efectos de toxicidad como los que s6 se observaron en las plantas no transg6nicas. En base a estos resultados, los autores sugirieron que las plantas debieron haber compartimentalizado los iones en vacuolas, evitando as6 la toxicidad del Na^+ en el citosol y aumentando la capacidad osmorregulatoria vacuolar. Esto justificari6a la hip6tesis de que la capacidad diferencial de poder compartimentalizar los iones subcelularmente que se sugeri6 para las accesiones evaluadas en este trabajo de tesis, tambi6n estar6a asociada a los diferentes grados de tolerancia a la salinidad que pudieron determinarse.

Por otra parte, tambi6n es importante destacar que en los trabajos de muy diversos autores (Greenway y Munns, 1980; Morard y Silvestre, 1996; Barrett-Lennard, 2003; Munns, 2005; Teakle *et al.*, 2007), se pone de manifiesto la importancia de una adecuada regulaci6n en la energ6a necesaria para el transporte activo de los iones para poder tolerar condiciones de estr6s por salinidad. Es evidente que una exitosa compartimentalizaci6n de Na^+ y Cl^- en vacuolas, requiere intercambiadores de iones y bombas de H^+ ubicadas en el tonoplasto que generen una diferencia electroqu6mica de H^+ a trav6s del mismo, que a su vez, influye sobre la actividad de transporte de los canales de iones (Colmer y Flowers, 2008; Munns y Tester, 2008; Shabala, 2013). La deficiencia energ6tica en las ra6ces, entre otros efectos altera significativamente a dichos procesos de transporte activo de iones. Por lo tanto, la compartimentalizaci6n de los iones y tambi6n los mecanismos de exclusi6n de Na^+ y Cl^- podr6an verse comprometidos dependiendo de la respuesta de las plantas frente al estr6s por inundaci6n y en la consecuente tolerancia relativa al estr6s mixto de salinidad e inundaci6n entre las accesiones. Esto a menudo conduce a severas reducciones del crecimiento e incluso a la muerte de la planta (Barrett-Lennard, 2003; Teakle *et al.*, 2007), excepto en el caso de las plantas hal6fitas de humedales, en las cuales se ha reportado un menor incremento de Na^+ y Cl^- en los v6stagos, presumiblemente debido a una mejor oxigenaci6n, lo cual evitar6a las deficiencias energ6ticas severas, facilitando en consecuencia, la adecuada regulaci6n de la concentraci6n de los iones (Colmer y Flowers, 2008). En este sentido, para especies del g6nero *Lotus* frente a estr6s mixto de inundaci6n y salinidad a nivel de las ra6ces, se ha propuesto que la mayor aireaci6n lograda a trav6s de una mayor formaci6n de aer6nquima en *L. tenuis* con respecto a *L. corniculatus*, permitir6a mantener una adecuada generaci6n de ATP. De esta manera se asegurari6a el normal funcionamiento de los intercambiadores de Na^+/H^+ (demandantes de energ6a) como el *LtNHX1*, sin permitir que esos iones se trasladen al v6stago, como s6 suceder6a en *L. corniculatus* tetraploides (Teakle *et al.*, 2010). Esto concuerda con los resultados encontrados en esta tesis, ya que hemos observado que aquellas accesiones que presentaron mayor capacidad de generar aer6nquima en sumersi6n parcial, y por

ende mayor potencial de aireación de sus tejidos sumergidos (datos presentados en el capítulo 2, Figura 2.6), fueron las que mayor tolerancia presentaron al estrés mixto de inundación y salinidad. En contraste a esto, para la leguminosa *Melilotus siculus*, otros autores (Striker *et al.*, 2015) trabajando con 15 accesiones de esta especie, no encontraron correlación entre los diferentes grados de porosidad de los tejidos aerenquimáticos y la tolerancia al estrés mixto de hipoxia y salinidad. No obstante ello, esta especie constituye una especie anual altamente tolerante a este estrés mixto, por lo que las variaciones intra-específicas, quizás no sean suficientes para dejar en evidencia una correlación entre los distintos grados de tolerancia de las accesiones.

3.6. Conclusiones

En conclusión, las evidencias encontradas en este capítulo sugieren que *Lotus tenuis* fue capaz de activar principalmente los mecanismos de exclusión de los iones para hacer frente al estrés por salinidad, y que esos mecanismos persistieron en la situación de estrés mixto de inundación y salinidad. Si bien se afectó el crecimiento, en correspondencia con ello, no se observaron daños aparentes por fitotoxicidad. Por otro lado, la población diploide de *L. corniculatus* presentó evidencias que, sumado a lo descrito para *L. tenuis*, además activaría mecanismos de compartimentalización subcelular de los iones a nivel de hojas. Por su parte, los resultados obtenidos sugieren que el híbrido interespecífico podría “heredar” a partir de su parental *L. corniculatus* diploide, la capacidad de activar los mecanismos de compartimentalización de los iones frente a un estrés salino, pero presentando al mismo tiempo un mayor potencial de crecimiento que el observado para ese parental. Este mayor potencial de crecimiento posiblemente lo adquiriera a partir de su parental *L. tenuis*, siendo interesante también que, frente al estrés mixto, incluso presentó una clara tendencia a superar en crecimiento a este último parental, lo que podría derivar del carácter híbrido del material generado. Por otra parte, el cultivar comercial tetraploide de *L. corniculatus*, entre las accesiones evaluadas, fue el más afectado por el estrés mixto, sugiriendo que los mecanismos de exclusión activados frente al estrés provocado únicamente por la salinidad, no pudieron ser mantenidos frente al estrés mixto (inundación más salinidad), por lo que se duplicaron los niveles de iones nocivos en las hojas. Sumado a esto, tampoco demostró ser capaz de activar los mecanismos de compartimentalización subcelular de esos iones nocivos, dando como resultado final, efectos claramente visibles de toxicidad y muerte de tejidos, lo que conllevó a un fenotipo de la planta muy afectado por el estrés mixto de salinidad e inundación.

Finalmente es importante destacar que la sumersión parcial morigeró los efectos del estrés provocado por la salinidad en el material híbrido LtxLc y en la población diploide de *L. corniculatus*, cuando estos estreses se aplicaron simultáneamente.

4. CAPÍTULO 4. EFECTOS DE LA INUNDACIÓN SOBRE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO DE LA SIMBIOSIS MUTUALISTA ENTRE *Lotus* spp. - *Mesorhizobium loti*

4.1. Introducción

El nitrógeno (N) es el cuarto elemento más abundante (detrás de C, O y H) en la biomasa vegetal (Larcher, 1995). En los ecosistemas terrestres es paradójico que mientras la biomasa aérea de la planta está expuesta a una atmósfera la cual contiene alrededor del 78% de gas dinitrógeno (N_2), las raíces están constantemente explorando el suelo en busca de N asimilable y frecuentemente la falta de disponibilidad adecuada de este nutriente limita severamente el crecimiento. Más del 99,9% del N global existe como N_2 mientras que solo el 0,00001% del N es localizado en la biósfera (Hartwig, 1998).

El N en una escala global está sujeto a un rápido y constante reciclado, y es eventualmente liberado a la atmósfera como gas N_2 y otros gases a partir de microorganismos desnitrificantes, o de aquel depositado en sedimentos marinos. Los productores primarios (las plantas) no pueden utilizar directamente al N_2 atmosférico para incorporarlo a sus biomoléculas, por lo que se requiere una continua reducción-oxidación del mismo a moléculas aprovechables para las plantas, como el nitrato (NO_3^-) o el amonio (NH_4^+). La reducción del N_2 , constituye una reacción altamente demandante de energía y en la naturaleza se produce por dos vías: i) descargas eléctricas (tormentas) y luego depositados en el suelo por las precipitaciones; y ii) biológicamente catalizada por la enzima nitrogenasa que poseen ciertos microorganismos procariotas (fijadores).

Entre los microorganismos fijadores de N_2 , los más eficientes son los que establecen una simbiosis con plantas superiores, en el cual la energía para la fijación del N_2 y el sistema de protección a oxígeno son provistos por la planta hospedadora (Mylona *et al.*, 1995). En este tipo de simbiosis, la protección por parte de la planta es brindada por la formación de estructuras denominadas “nódulos”, generado a partir de una relación de reconocimiento específica entre la planta y la bacteria. En el interior del nódulo, la bacteria reduce N_2 atmosférico a NH_4^+ el cual la planta puede asimilar vía la enzima glutamina sintetasa para formar glutamina. Para romper el triple enlace del N_2 son necesarias grandes cantidades de energía, por lo que la nitrogenasa necesita 16 moléculas de ATP por cada molécula de N_2 reducida a NH_4^+ . Por su lado, la bacteria obtiene de la planta carbohidratos y principalmente malato como fuente de energía y carbono. Entre las plantas que son capaces de formar nódulos en simbiosis con procariotas fijadores de N_2 , sin duda la simbiosis mutualista entre las leguminosas y las bacterias denominadas comúnmente como rizobios, es la de mayor importancia del planeta. La fijación biológica del N_2 (FBN) producida por este tipo de asociación significa la fuente natural de N más importante tanto para sistemas ecológicos como para los agroecosistemas (Smil, 1999). Se ha estimado que mediante tal proceso son fijados anualmente 200 millones de toneladas de nitrógeno (Graham y Vance, 2003; Peoples *et al.*, 2009). Por otro lado, los eventos de inundación, provocan una gran disminución de la FBN en la mayoría de las leguminosas. Una causa de dicha disminución, puede radicar en la falta de energía que se generaría a partir de una alteración en la biosíntesis del ATP en los tejidos sumergidos. Sin embargo, las plantas tolerantes poseen procesos de adaptación, como la inducción de procesos metabólicos de fermentación. En este sentido, la fermentación metabólica constituye un proceso que permite la continuidad de los mecanismos fisiológicos esenciales, entre ellos la generación de ATP, y la obtención de energía, pero de forma mucho menos eficiente (Gibbs y Greenway, 2003). Esto se debe a que en condiciones de hipoxia, en la vía glicolítica, por cada unidad de hexosa, solo dos moléculas de ATP son originadas junto con dos moléculas de piruvato mientras que de forma simultánea se reduce el NAD^+ a

NADH. Con el fin de mantenerse la vía glucolítica en actividad, se debe regenerar continuamente el NAD^+ desde NADH y eso es logrado a través del metabolismo fermentativo. En este sentido, el piruvato puede originar lactato mediante la enzima lactato deshidrogenasa o generar etanol a través de dos reacciones posteriores catalizadas por la piruvato descarboxilasa y la enzima alcohol deshidrogenada (Tadege *et al.*, 1999).

Rocha *et al.*, (2010), trabajando con *L. japonicus*, observaron que los genes *nifH* y *GS*, se reprimieron fuertemente después de 5 días de anegamiento. Estos genes codifican enzimas con roles esenciales en la FBN (*nifH*: codifica para una subunidad de la nitrogenasa y *GS*: codifica para la glutamina sintetasa). Sin embargo, James y Crawford (1998) evaluaron la FBN de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* en condiciones de anoxia, encontrando que *L. uliginosus* formó nódulos eficientes bajo dicha condición, sobre raíces y tallos. Además observaron que el oxígeno necesario para el bacteroide, es suministrado hacia los nódulos vía la red de aerénquima y lenticelas a lo largo de tallos, raíces y los propios nódulos. Simultáneamente dichos autores observaron que en *L. corniculatus* tetraploide, se desarrollaba una senescencia temprana de los nódulos. En otros trabajos, se ha reportado que *L. tenuis* mantiene los nódulos en condiciones de anegamiento pero disminuye su eficiencia de fijación de N_2 (Mendoza *et al.*, 2005; Real *et al.*, 2008). En ello radica la importancia de realizar un mayor número de estudios de los procesos involucrados en la simbiosis, con el fin último de mejorar la FBN en plantas cultivadas en zonas anegables.

Por lo descrito, surge como **objetivo particular** para este capítulo de la tesis: evaluar el efecto de la inundación sobre la FBN y el crecimiento, en dos especies del género *Lotus* contrastantes en cuanto a su tolerancia a la inundación.

4.2. Hipótesis

- a) La fisiología de la FBN llevada a cabo por la simbiosis mutualista entre bacterias fijadoras de N_2 y *Lotus* spp. bajo estrés por sumersión parcial, es más afectada en *L. japonicus* que en *L. tenuis*, en correspondencia con la tolerancia relativa reportada para ambas especies frente a dicho estrés.
- b) Los genes de enzimas claves en la FBN se reprimen bajo estrés por sumersión parcial en la especie más sensible *L. japonicus*, contribuyendo a la reducción de la eficiencia en la FBN en esta especie.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Material vegetal

Se utilizaron semillas de *L. japonicus* ecotipo MG-20 (Lj, menor tolerancia relativa al anegamiento, y es la especie modelo de estudio de leguminosas de nodulación determinada) y de una población de *L. tenuis* naturalizada en un bajo inundable de la Pampa Deprimida (Lt, mayor tolerancia relativa). Se utilizaron estas dos accesiones debido a que en estudios previos de este trabajo de tesis ha quedado comprobado que presentan tolerancias contrastantes frente a la sumersión parcial.

4.3.2. Sistema de cultivo y tratamientos

Las semillas de las dos especies se escarificaron químicamente de la misma manera que lo explicado en la sección 2.3.1.2 de este trabajo de tesis. Además se desinfectaron

utilizando hipoclorito de sodio al 10 % durante 6 minutos y posteriormente se sembraron en placa de Petri que contenían agar-agua al 0,8 % (p/v) y puestas a germinar en cámara de cultivo. Seis días después se transplantaron en macetas 300 cm³ conteniendo sustrato lavado constituido por arena y arena de cuarzo (1:1) y esterilizado mediante doble autoclavado. Inmediatamente transplantadas, las plántulas se inocularon con *Mesorhizobium loti* cepa NZP2213, la cual se seleccionó debido a que desarrolla nódulos efectivos con las dos especies de *Lotus* evaluadas (Pankhurst *et al.*, 1979, Pankhurst y Jones, 1979). Se utilizaron plantas “blanco”, sin inocular, y que se incluyeron solamente con el fin de asegurarse de no encontrar nódulos de rizobios “contaminantes” en el sistema de cultivo. Todas las plantas se cultivaron durante 21 días en cámara de cultivo en las mismas condiciones que lo explicado en el apartado 3.3.2 pero en este caso siendo regadas con solución nutritiva Evans 1 X sin agregado de N. De esta manera se asumió que las plantas obtuvieron el N necesario para su crecimiento, mediante la FBN.

Luego de los 21 días de crecimiento inicial, las plantas se separaron en 2 grupos y se sometieron durante 28 días a los siguientes tratamientos: -inundación (Inund), las plantas se sumergieron parcialmente (nivel de agua a 3 cm sobre el sustrato) con solución nutritiva Evans hipóxica sin nitrógeno; y tratamiento -control (Cont), en el cual las plantas se regaron también con solución nutritiva Evans sin nitrógeno pero con libre drenaje.

La solución nutritiva Evans 1 X hipóxica, se trató de la misma manera que lo explicado en la sección 3.3.2 de esta tesis.

4.3.3. Evaluación de biomasa

Luego de 28 días de tratamientos, se realizó la cosecha del total de la planta, lavándola cuidadosamente con agua destilada y separándola en 3 fracciones: vástagos, raíces y nódulos. Las fracciones así separadas se colocaron en sobres de papel y se secaron en estufa a 70 °C durante 3 días hasta peso constante. Luego de secadas las muestras, se pesaron con ayuda de una balanza analítica.

En el momento de la cosecha, parte de las muestras frescas de raíces y nódulos, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta su utilización para extracción de ARN.

4.3.4. Determinación de nitrógeno

La concentración de N total para las distintas fracciones de biomasa, se determinó mediante la técnica de Kjeldahl, propuesta por Nelson y Sommers (1973) que principalmente consta de tres etapas: digestión, destilación y titulación. Se utilizaron 50 mg de material seco y molido, se colocó en tubos de vidrio Pirex® y se les agregó 4 ml de H₂SO₄ y una alícuota del catalizador (K₂SO₄/CuSO₄ 1/15). Los tubos con la mezcla se calentaron a 460 °C durante 5 minutos. Posteriormente se agregó un volumen de 10 ml de H₂O₂ y se digirió 1 minuto más a 460 °C. Luego de la digestión completa de las muestras, se llevó a un volumen de 50 ml finales con agua miliQ. De ese volumen se tomó una alícuota de 10 ml para la destilación, a la cual, se le agregó 3 ml de NaOH para neutralizar la muestra. La destilación se realizó durante 5 minutos y el destilado obtenido se recogió dentro de un erlenmeyer conteniendo 10 ml de ácido bórico y un indicador para titulación (verde de bromocresol y rojo de metilo). Posteriormente, la

etapa de la titulación se realizó con H₂SO₄ 0,004 N y los valores se estimaron mediante una curva de calibración construida con glicina digerida y destilada de la misma manera que las muestras.

Con los datos obtenidos de N total y el peso seco de los nódulos, se estimó la “capacidad de fijación” o “eficiencia de fijación” de los nódulos de la siguiente manera: contenido de N fijado (mg) por planta por unidad de MS de nódulo (g).

4.3.5. Determinación de parámetros de la eficiencia del fotosistema II

El día previo a la cosecha de la biomasa, es decir a los 20 días de comenzado los tratamientos, se determinaron los parámetros Fv/Fm y Plabs en la cuarta hoja expandida contando a partir del ápice. El procedimiento se realizó de la misma manera que lo detallado en la sección 2.3.1.5 de la tesis.

4.3.6. Expresión relativa de genes

Para poder evaluar la expresión relativa de genes mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR), se obtuvo el ADN copia (ADNc) de muestras de raíces noduladas, tomando aproximadamente 100 mg de peso fresco. El procedimiento para obtener ADN copia se llevó a cabo siguiendo el protocolo explicado en la sección 3.3.7 de esta tesis. Los genes que se evaluaron mediante su expresión relativa fueron: i) *nifH*, que codifica para una unidad del complejo enzimático de la nitrogenasa del bacteroide; ii) *GS*, que codifica para la enzima glutamina sintetasa de la planta; iii) *PDC*, que codifica para la enzima piruvato descarboxilasa de la planta; iv) *ADH*, que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa de la planta. Las dos primeras son claves en la FBN y las dos últimas son enzimas que se inducen en aquellas plantas capaces de activar el metabolismo fermentativo.

Los niveles de transcritos se normalizaron contra el gen *EF-1α*, excepto el gen de la bacteria *nifH* el cual se normalizó contra el gen de expresión constitutiva *sigA*. Los cebadores utilizados son detallados en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Lista de cebadores utilizados

Nombre del gen	Dirección	Secuencia del cebador (5'→3')	Referencia
Subunidad H de la nitrogenasa (<i>nifH</i>)	Sentido	TCCAAGCTCATCCACTTCGTG	Ott <i>et al.</i> , 2005
	Antisentido	AGTCCGCGCATACTGGATTA	Ott <i>et al.</i> , 2005
Glutamina sintetasa 1 (<i>GS</i>)	Sentido	GGGAATTCCAAGTTGGCCCTTCAG	Rocha <i>et al.</i> , 2010
	Antisentido	AACGAGCAACCCACACCTCATC	Rocha <i>et al.</i> , 2010
Piruvato descarboxilasa (<i>PDC</i>)	Sentido	GCCTGCGAATTGTGGTTATGA	Andreadeli <i>et al.</i> , 2009
	Antisentido	TAGCGCCTACTGACCAACCAA	
Alcohol deshidrogenada (<i>ADH</i>)	Sentido	TCTTTGGACTTGGAGCTGTTGGC	Rocha <i>et al.</i> , 2010
	Antisentido	TGATGCACCAGAAACCCTTGCC	Rocha <i>et al.</i> , 2010
<i>sigA</i>	Sentido	GCCCTCTGCTCGACCTTTCC	Ott <i>et al.</i> , 2005
	Antisentido	AGCATCGCCATCGTGTCTCTC	Ott <i>et al.</i> , 2005
Factor de elongación 1-alfa (<i>EF-1α</i>)	Sentido	TGACAAGCGTGTGATCGAGAGG	Escaray <i>et al.</i> , 2014
	Antisentido	GATACCTCTTTCACGCTCAGCCTT	Escaray <i>et al.</i> , 2014

4.3.7. Diseño experimental y análisis de datos

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de los tratamientos en dos factores fijos. Los factores fueron: i) accesión, con dos niveles (Lj y Lt); ii) inundación, con dos niveles (sumersión parcial y libre drenaje o control).

El análisis estadístico constó de un ANVA a 2 vías y cuando se detectó interacción significativa ($p < 0,05$) entre los factores, se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan ($p < 0,05$). Previamente se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

Los análisis de los parámetros del fotosistema II y de la expresión relativa de genes se realizaron como lo explicado en el apartado 3.3.8 de esta tesis.

4.4. Resultados

4.4.1. Parámetros de crecimiento y formación de nódulos

Mediante la determinación de la biomasa total de cada planta, se observó que las accesiones respondieron de manera diferencial frente a la sumersión parcial en nuestras condiciones experimentales (se detectó interacción significativa entre los factores inundación y accesión). Las plantas de la especie modelo *Lotus japonicus* (Lj), sometidas al tratamiento de inundación, disminuyeron su biomasa un 48 % en promedio, con respecto a las plantas cultivadas en situación control. Esto contrasta con lo observado en simultáneo en la respuesta de la accesión de *L. tenuis* (Lt) evaluada (Figura 4.1.A). Además, se observó clorosis en las hojas de más edad (basales) y abscisión de alguna de ellas, únicamente en las plantas de la accesión Lj que se sometieron a inundación (Figura 4.1.B).

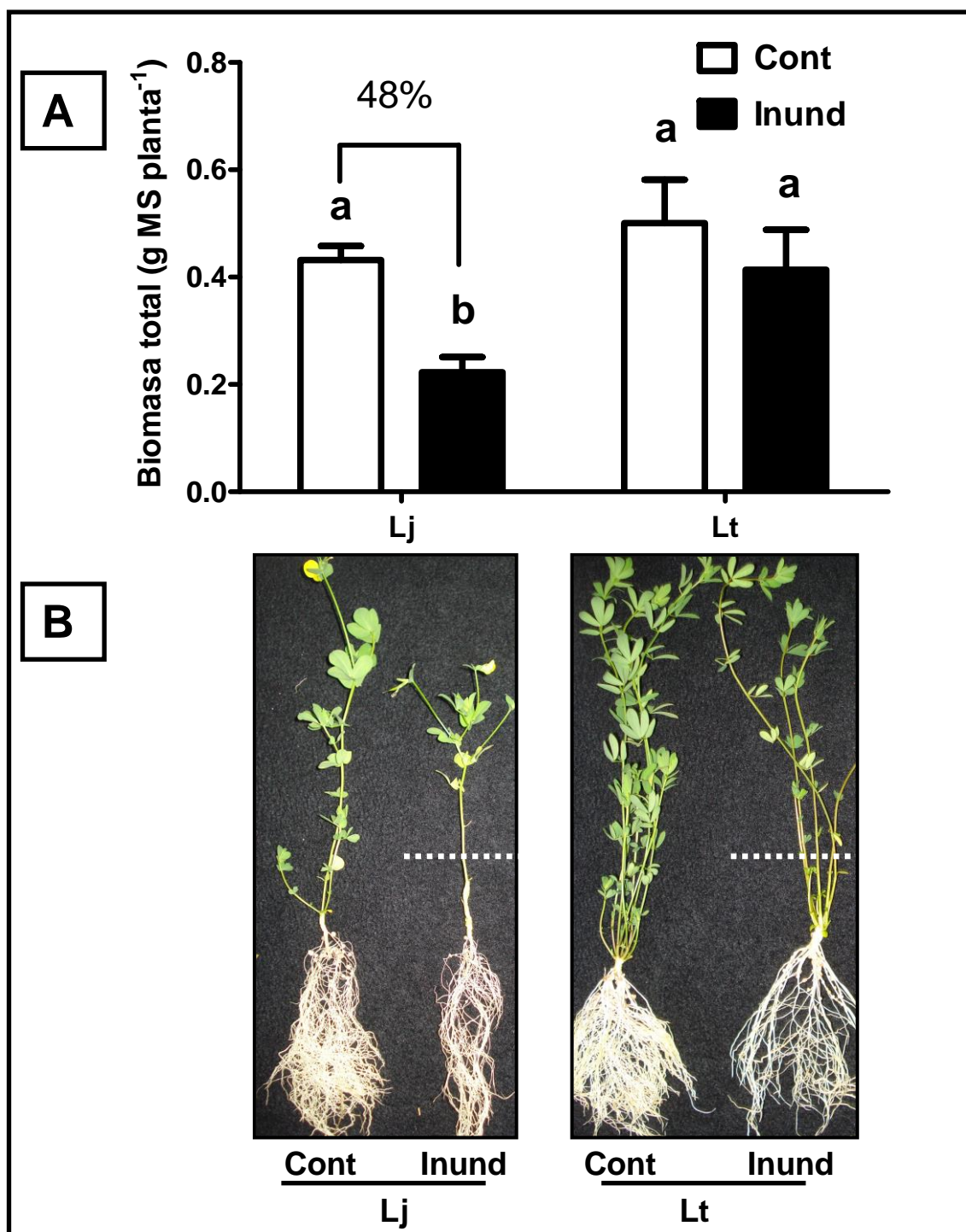


Figura 4.1. Efecto de 28 días de inundación en sumersión parcial sobre la biomasa de plantas de *Lotus japonicus* (Lj) y *L. tenuis* (Lt) en simbiosis con *Mesorhizobium loti*. A: Biomasa total por planta ($n=6 \pm DE$) en g de materia seca (MS). Barras sin ninguna letra en común difieren significativamente (Prueba de Duncan, $p < 0,05$). El porcentaje muestra la reducción de biomasa de las plantas inundadas con respecto a las controles. B: Fotografías de plantas representativas al momento de la cosecha. Las líneas punteadas blancas sobre las fotografías de las plantas tratadas representan el nivel de agua al cual se sometieron durante la sumersión parcial, y también representan 5 cm. Cont: tratamiento control; Inund: tratamiento de sumersión parcial.

Por otra parte, se determinó que la formación de nódulos en la accesión Lj, se afectó por el tratamiento de inundación aplicado. En este sentido, el número de nódulos y el peso de cada nódulo en promedio, se redujeron significativamente en Lj, mientras que esto

no ocurrió en Lt (Figura 4.2.B y C). Asimismo, la biomasa total de nódulos por planta, en Lj, se redujo en un 70 % con respecto a las plantas cultivadas en condición control (Figura 4.2.A).

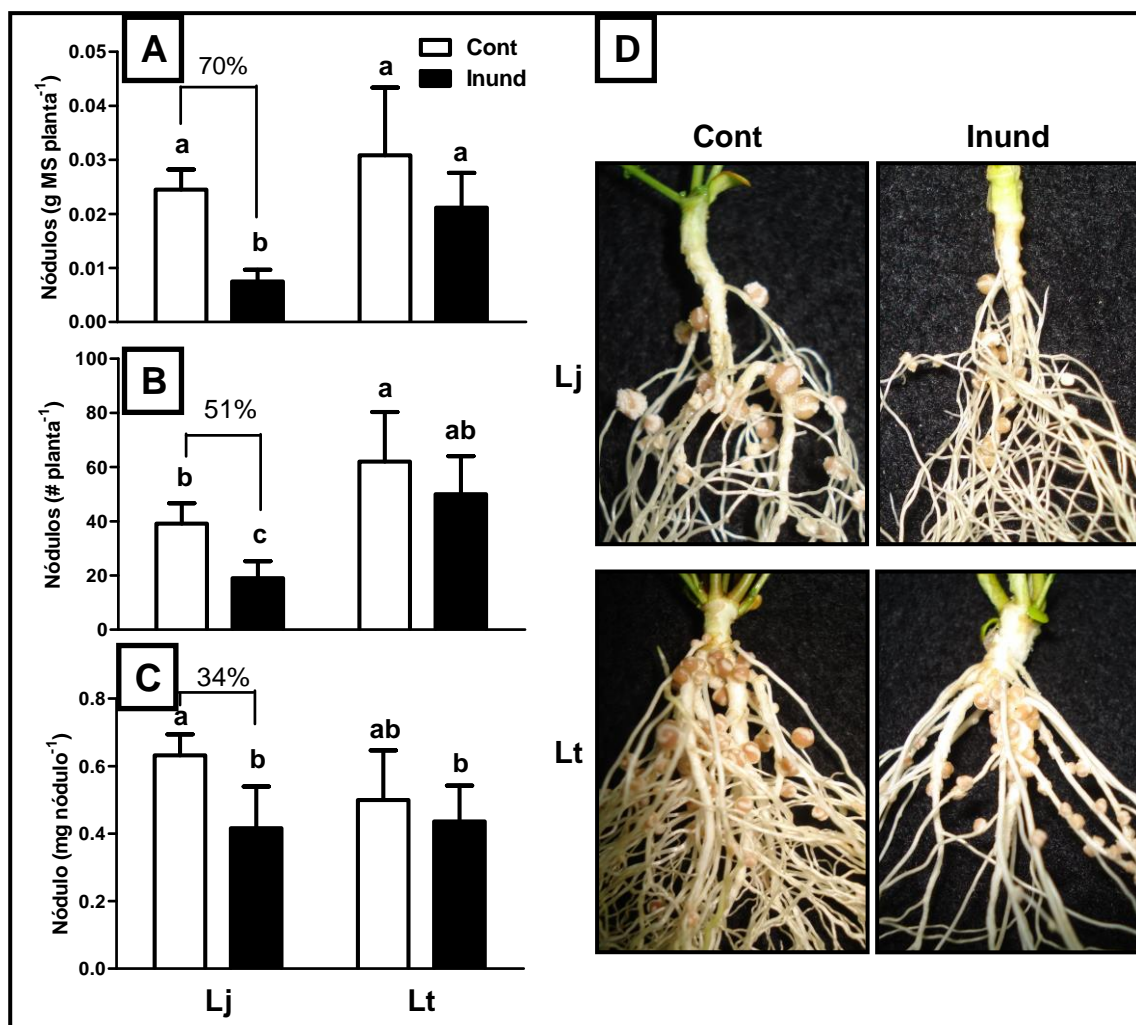


Figura 4.2. Efecto de 28 días de inundación en sumersión parcial sobre los nódulos de plantas de *Lotus japonicus* (Lj) y *L. tenuis* (Lt) en simbiosis con *Mesorhizobium loti*. A: biomasa de nódulos en g de MS por planta; B: número de nódulos por planta; C: biomasa media en mg de MS por nódulo. Barras sin ninguna letra en común difieren significativamente (Prueba de Duncan, $p < 0,05$; $n = 6 \pm DE$). Los porcentajes muestran la reducción de cada variable de las plantas inundadas con respecto a los controles. D: Fotografías de plantas representativas mostrando en detalle del estado de los nódulos al momento de la cosecha. Cont: tratamiento control; Inund: tratamiento de sumersión parcial.

4.4.2. Concentración de nitrógeno en la planta

En cuanto a la concentración de N total en planta entera, se observó que el tratamiento de inundación aplicado, redujo su concentración en ambas accesiones evaluadas, pero en diferentes magnitudes (se detectó interacción entre los factores inundación y accesión). En este sentido, se determinó que las plantas de Lj sometidas al tratamiento de inundación, en promedio redujeron un 41 % su concentración de N con respecto a las plantas cultivadas en situación control. Para el caso de Lt, bajo las mismas condiciones de estrés, la concentración de N, sólo se redujo el 20 % (Figura 4.3.A).

La capacidad o eficiencia de fijar N por unidad de peso seco de los nódulos, también se redujo en Lj en un 52 % en promedio en aquellas plantas sometidas al tratamiento por inundación. En Lt bajo idénticas condiciones de estrés, no se observó una reducción significativa de dicho parámetro (Figura 4.3.B).

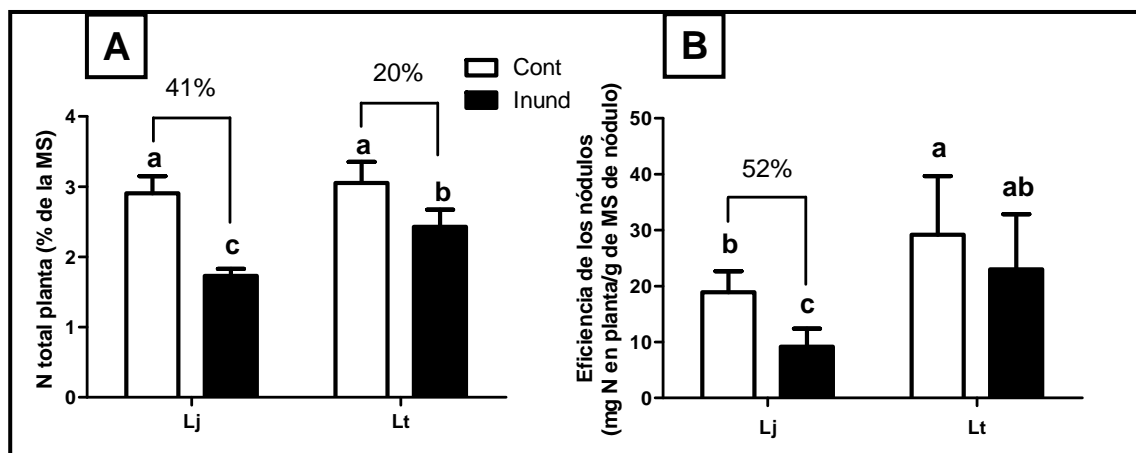


Figura 4.3. Efecto de 28 días de inundación en sumersión parcial sobre la FBN en plantas de *L. japonicus* (Lj) y *L. tenuis* (Lt) en simbiosis con *M. loti*. A: concentración porcentual de N total por planta. B: eficiencia de FBN de los nódulos (contenido en mg de N fijado por g de MS de nódulo). Los porcentajes muestran la reducción de la concentración de N de las plantas inundadas con respecto a las controles. Barras sin ninguna letra en común difieren significativamente (Prueba de Duncan, $p < 0,05$; $n = 6 \pm DE$). Cont: tratamiento control; Inund: tratamiento de sumersión parcial.

4.4.3. Expresión relativa de genes vinculados a la FBN y a la hipoxia en raíces

La expresión relativa de los genes *nifH* y *GS* (que codifican enzimas fundamentales para la FBN), se reprimió fuertemente en las raíces noduladas de plantas de Lj sometidas a la condición de inundación con respecto a las plantas cultivadas en situación control. En contraste, en la accesión Lt bajo la situación de inundación, no se reprimió la expresión relativa del gen *GS* y sí se observó una disminución en la expresión del gen *nifH*, pero en mucho menor grado que lo observado simultáneamente para Lj (Figura 4.4.A y B). Por otro lado, las expresiones relativas de los genes *PDC* y *ADH*, (que codifican enzimas del metabolismo fermentativo), se indujeron en ambas accesiones sometidas a las condiciones de inundación (Figura 4.4.C y D).

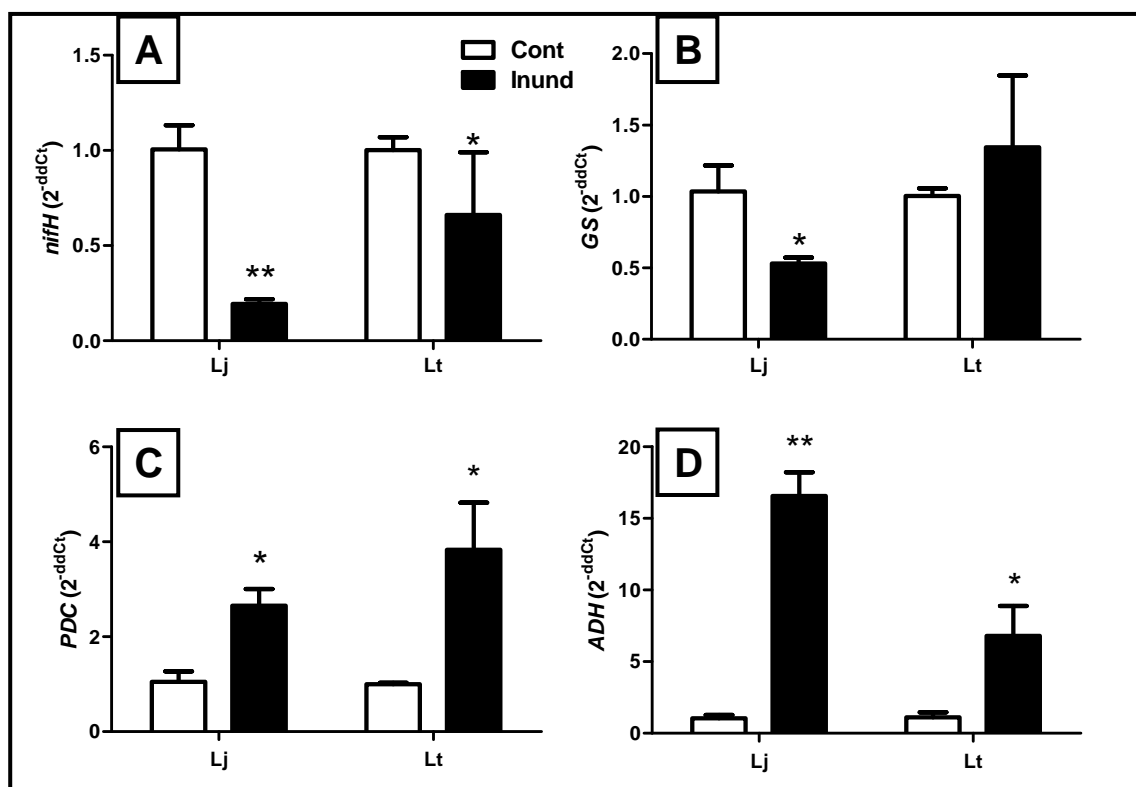


Figura 4.4. Efecto de 28 días de inundación en sumersión parcial sobre la expresión relativa de genes vinculados a enzimas de la FBN y del metabolismo fermentativo en plantas de *L. japonicus* (Lj) y *L. tenuis* (Lt) en simbiosis con *M. loti*. A: expresión relativa del gen (*nifH*) de una subunidad de la nitrogenasa. B: expresión relativa del gen *GS* de la glutamina sintetasa. C: expresión relativa del gen (*PDC*) de la piruvato descarboxilasa. D: expresión relativa del gen (*ADH*) de la alcohol deshidrogenasa. La presencia de los asteriscos sobre las barras correspondiente al tratamiento de inundación, representan diferencias significativas con respecto a su control (* p < 0,05; ** p < 0,01; n = 6 ± DE). Cont: tratamiento control; Inund: tratamiento de sumersión parcial.

4.4.4. Parámetros de la eficiencia del fotosistema II

Los parámetros F_v/F_m y PI_{abs} , que estiman la eficiencia del fotosistema II, obtenidos mediante la fluorescencia transitoria de la clorofila, disminuyeron en las plantas de Lj bajo condiciones de sumersión parcial con respecto a la situación control. Sin embargo, los mismos parámetros no se afectaron significativamente en la accesión Lt (Figura 4.5).

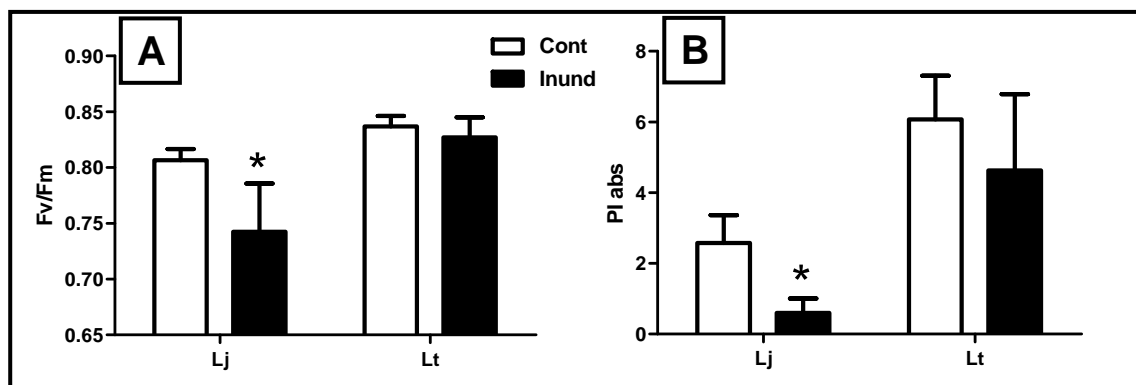


Figura 4.5. Efecto de 28 días de inundación en sumersión parcial sobre dos parámetros de la eficiencia del fotosistema II en plantas de *L. japonicus* (Lj) y *L. tenuis* (Lt) en simbiosis con *M. loti*. A: Eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (Fv/Fm). B: índice de performance (PI abs). Los asteriscos sobre las barras correspondientes a las plantas inundadas representan diferencias significativas con respecto a su control, de acuerdo a una prueba de t ($p < 0,05$; $n=6 \pm DE$).

4.5. Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo de tesis, junto con aquellos obtenidos en el capítulo 2 demostraron que las plantas de *L. tenuis* (Lt) y de *L. japonicus* (Lj), fueron diferencialmente afectadas por el estrés de sumersión parcial. Además, en este capítulo se observó que la FBN fue más afectada en la especie más sensible al estrés por inundación, es decir en *L. japonicus*. Esto se determinó mediante el análisis de la reducción de la biomasa, la disminución de la eficiencia del fotosistema II y por la aparición de clorosis con abscisión de hojas basales, rasgos típicos de la deficiencia por N (Figura 4.1 y Figura 4.5). Estos resultados también sugieren que la mayor tolerancia frente al estrés por sumersión parcial que se encuentra en *L. tenuis*, podría estar vinculada al hecho de que en tales condiciones estresantes continuaría fijando N₂ atmosférico, mientras que en la accesión menos tolerante no se podría mantener la FBN eficientemente. Una mayor discusión de este tipo de respuestas diferenciales encontradas frente a la sumersión parcial entre estas dos accesiones se realizó en el capítulo 2 de este trabajo de tesis.

Por otro lado, los resultados de la inducción de la expresión relativa de los genes que codifican para las enzimas del metabolismo fermentativo, indicaron que tanto Lj como Lt respondieron a la hipoxia producida por la sumersión parcial (Figura 4.4.C y D), siendo ampliamente reconocido que la inducción de estos genes son indicativos de tal condición metabólica (Bologa *et al.*, 2003; Ismond *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2010). En este mismo sentido, nuestros datos además sugieren que las dos accesiones activarían el metabolismo fermentativo para obtener energía bajo estas condiciones de estrés, lo cual constituye una respuesta metabólica característica que poseen las plantas tolerantes frente a la hipoxia provocada por la inundación (Gibbs y Greenway, 2003). De todas maneras, teniendo en cuenta que el metabolismo fermentativo es muy ineficiente desde el punto de vista de producción de ATP, este mecanismo no bastaría para mantener una adecuada FBN. En ese sentido, si bien las dos accesiones activarían el metabolismo fermentativo, la FBN disminuyó fuertemente sólo en Lj, lo que pondría en evidencia que en Lt se involucrarían otros mecanismos de compensación, para mantener una adecuada oferta de energía y carbono para los bacteroides.

Nuestros resultados demostraron que la sumersión parcial provocó una fuerte disminución en la FBN en Lj en comparación a una situación de crecimiento en solución de riego con libre drenaje y también en comparación a Lt. Los resultados además sugieren, que la disminución en la cantidad de N fijado durante la simbiosis Lj-*M. loti*, estaría provocada por dos motivos: i) la menor biomasa de nódulos alcanzada en las plantas inundadas; ii) la disminución en la capacidad intrínseca de cada nódulo en fijar nitrógeno.

i) En el caso de la reducción de la biomasa total de nódulos por planta, se produjo tanto por la disminución del número total de nódulos como por la disminución del peso de cada nódulo en sí mismo (Figura 4.2). Considerando las posibles causas en la reducción del número de nódulos, previamente ha sido observado que en suelos anegados, la etapa más temprana de la formación del nódulo se dificulta en muchas plantas leguminosas, ya que la acumulación de etileno inhibe la formación de los pelos radiculares, siendo éstos muy importantes para realizar la primera fase de la infección mediante la curvatura del pelo radicular que será posteriormente infectado (Goormachtig *et al.*, 2004; Sprent, 2007). También ha sido reportado que la aplicación exógena de etileno o de alguno de sus precursores, inhibe la nodulación en varias leguminosas (Okasaki *et al.*, 2004) limitando su número (Ma *et al.*, 2004; Nukui *et al.*, 2006). Con respecto a la importancia que existe en el desarrollo de una determinada biomasa de nódulos, se sabe que existe una alta correlación positiva entre la biomasa de los mismos y la cantidad de N fijado por la simbiosis, lo que afecta en definitiva, el normal crecimiento de las plantas.

ii) La pérdida de funcionalidad de los nódulos, se observó en la reducción de la eficiencia de fijación de N por unidad de biomasa de los nódulos (Figura 4.3.B). Otro resultado que sugiere fuertemente la pérdida de la capacidad intrínseca de fijar N por parte de los nódulos en la condición de inundación de la accesión Lj, fue que se redujeron los niveles de expresión del gen de la nitrogenasa con respecto a las plantas cultivadas con libre drenaje (Figura 4.4.A). Esta observación concuerda con lo encontrado por Rocha *et al.* (2010), quienes trabajando con la especie modelo *L. japonicus* (aunque con el ecotipo Gifu-129) determinaron que el anegamiento redujo los niveles de expresión del gen *nifH*, y también, al igual que lo observado en nuestro trabajo, se redujo la expresión del gen *GS*. Las enzimas que codifican estos genes son claves en la FBN, y las expresiones de los mismos indicarían una falla metabólica, dejando en evidencia que en Lj existiría una incapacidad para mantener las condiciones necesarias en el nódulo para una FBN adecuada. Simultáneamente pudo también demostrarse que Lt tuvo una mayor capacidad para mantener el sistema en un funcionamiento adecuado, ajustando las condiciones fisiológicas para mantener una adecuada capacidad para la FBN. En este sentido, tendría un rol de relevancia la propiedad de las plantas tolerantes, para generar tejido aerenquimático de los órganos sumergidos. Con respecto a esto, los resultados presentados en el capítulo 2 (Figura 2.6) permitieron observar una respuesta contrastante para esta característica entre estas dos accesiones. Esta hipótesis estaría de acuerdo con lo encontrado para otras especies del género *Lotus* en que se le adjudicó la mejor respuesta de *L. uliginosus* a la mayor porosidad de las plantas hipóxicas con respecto a *L. corniculatus* tetraploide, en la cual se observó (a diferencia de lo observado para *L. uliginosus*) una senescencia más temprana de los nódulos (James y Crawford, 1998). Estas respuestas podrían deberse en gran medida a una mejor producción de ATP en aquellas plantas que poseen una mayor capacidad para formar y conectar sus tejidos aéreos y los sumergidos mediante el incremento de su porosidad (formación de aerénquima), y de esta manera transportar más eficientemente el O₂ a los distintos órganos sumergidos (base de tallos, raíces y

nódulos). Sin embargo, eso no explicaría la elevada inducción de los genes utilizados como indicadores de la situación de hipoxia (*PDC* y *ADH*). Una explicación posible es que la inundación pueda estar afectando la adquisición de algún otro elemento clave adicional requerido para una adecuada FBN, como podría ser por ejemplo el molibdeno (cofactor de la nitrogenasa).

4.6. Conclusiones

La concentración de nitrógeno en las plantas de *L. tenuis* fue mucho menos afectada por la inundación, que en las plantas de *L. japonicus*, en las cuales dicha concentración se redujo a la mitad. Por lo tanto, la FBN fue afectada diferencialmente según el nivel de tolerancia intrínseco de cada especie leguminosa considerada.

La sumersión parcial indujo la expresión relativa de los genes que codifican para enzimas del metabolismo fermentativo en ambas accesiones, indicando una situación de hipoxia en las raíces noduladas de ambas accesiones estudiadas (Lj y Lt).

La expresión relativa de genes, que codifican para enzimas importantes de la FBN, mostraron una clara vinculación con la concentración de N total de las plantas entre cada uno de los tratamientos (control vs estrés).

La reducción en la biomasa y de los parámetros que estiman la eficiencia del fotosistema II, también dejaron en evidencia que Lj fue menos tolerante a la sumersión parcial que Lt cuando se cultivaron en ausencia de suministro mineral de N, lo que condiciona su incorporación al obtenido por medio de la FBN.

5. CAPÍTULO 5. CONSIDERACIONES FINALES

Contraste de hipótesis planteadas

Partiendo del objetivo general propuesto de “*ampliar el conocimiento sobre el género Lotus y su relación simbiótica con rizobios frente a condiciones restrictivas de crecimiento, con énfasis en la finalidad de incrementar su aprovechamiento en áreas inundables tales como los de la Pampa Deprimida*”, se plantearon inicialmente diversas hipótesis, que se pusieron a prueba en los tres capítulos experimentales de este trabajo de tesis. El estudio consistió en evaluar el estrés provocado por sumersión parcial sobre diferentes accesiones del género *Lotus*.

En el **primer capítulo experimental** (capítulo 2 de la tesis), teniendo en cuenta el origen de las accesiones se plantearon 2 hipótesis: i) “*la población diploide de L. corniculatus de la Albufera de Valencia, por estar adaptada a zonas inundables en su lugar de origen, tiene características morfológicas y anatómicas más aptas para tolerar períodos prolongados de sumersión parcial que el cv. comercial tetraploide de L. corniculatus (San Gabriel)*” y ii) “*las características morfológicas y fisiológicas (la capacidad de generar abundante aerénquima y raíces adventicias entre otras) que le conceden a la especie L. tenuis una elevada tolerancia frente a la sumersión parcial son transferidas a la descendencia híbrida en el cruzamiento interespecífico con L. corniculatus de la Albufera de Valencia. De esta manera el híbrido interespecífico obtenido en procura de realizar una mejora de la calidad forrajera, posee también las características de tolerancia al estrés por sumersión parcial*”. Estas hipótesis se pusieron a prueba mediante el estudio las respuestas morfológicas, anatómicas, fisiológicas y de acumulación de biomasa, de plantas adultas de 5 accesiones del género *Lotus* frente a un estrés prolongado de sumersión parcial. Además, se evaluó un período de recuperación post-inundación. También se estudió el poder germinativo de las semillas de las mismas accesiones bajo sumersión. Teniendo esto en cuenta, y a partir de los resultados obtenidos a nivel de planta adulta, se pudo establecer que la primera de las hipótesis planteadas era correcta y por lo tanto concluir que la accesión diploide de *L. corniculatus* es más tolerante al estrés por sumersión parcial. Tomando en conjunto las respuestas de las diferentes accesiones referidas a la acumulación de biomasa, a la producción de raíces adventicias, a la formación de tejido aerenquimático, a las tasas de crecimiento relativo y de fotosíntesis neta, a la integridad de membranas, entre otras, frente al estrés por sumersión parcial en un período prolongado, las accesiones que se mostraron más tolerantes fueron en primer lugar *L. tenuis*, seguida por el material híbrido interespecífico. Luego se ubicaría la población diploide de *L. corniculatus*. Bajo idénticos criterios de tolerancia relativa, las accesiones más sensibles fueron el cv. tetraploide de *L. corniculatus* y la especie modelo *L. japonicus*. Además, y brindando un nuevo objetivo de estudio para lo mediano, también pudo establecerse que la germinación bajo una inundación de poca profundidad, estaría asociada al nivel de tolerancia en estado de planta adulta.

En el **segundo capítulo experimental** (capítulo 3 de la tesis) se plantearon las hipótesis de que “*la mayor tolerancia frente al estrés mixto de inundación y salinidad que poseen algunas accesiones de Lotus spp. se debe a la capacidad de mantener activos los mecanismos que tienen para tolerar al estrés por salinidad, aún bajo condiciones de sumersión parcial: i) mecanismos que evitan la acumulación perjudicial de iones en vástago; y ii) mecanismos de compartimentalización subcelular de iones nocivos*”. Las hipótesis de este capítulo se pusieron a prueba estudiando parámetros fisiológicos, de concentración de iones en las hojas, expresión de genes vinculados a la compartimentalización subcelular de los iones y la acumulación de biomasa. Dichas evaluaciones se realizaron en plántulas de diferentes accesiones del género *Lotus*

sometidas al estrés mixto de inundación y salinidad. A partir de los resultados obtenidos se pudo concluir que en las plantas de *Lotus* spp., que presentan tolerancia diferencial al estrés mixto de inundación y salinidad, son capaces de “ponerse en juego” mecanismos de tolerancia diferentes, lo cual brinda una nueva base de estudio para establecer novedosos criterios y parámetros de selección en los programas de mejoramiento en leguminosas. En este sentido se encontraron evidencias de que en la especie *L. tenuis* frente al estrés por salinidad, se prioriza la activación de los mecanismos de exclusión de los iones tóxicos, y que los mismos son eficazmente conservados aún frente al estrés mixto de inundación y salinidad. Por su parte, nuestros resultados sugieren que en la población diploide de *L. corniculatus* de colecta propia, además de los mecanismos de exclusión, se activan mecanismos adicionales de tolerancia mediante la compartimentalización subcelular de los iones tóxicos. En base a los resultados obtenidos, también se puede sugerir que el material híbrido interespecífico presentó la mejor respuesta general frente al estrés mixto entre inundación y salinidad, probablemente debido a adoptar características de tolerancia relacionadas con los mecanismos de compartimentalización subcelular de los iones de su parental *L. corniculatus* diploide y características de *L. tenuis* en cuanto a su mayor potencial de crecimiento. Por último, los resultados obtenidos permitirían hipotetizar que el cultivar comercial tetraploide de *L. corniculatus* frente al estrés mixto de inundación y salinidad, no es capaz de mantener activos los mecanismos de tolerancia, y por lo tanto, resulta fuertemente afectado por el mismo.

En el **tercer capítulo experimental** (capítulo 4 de la tesis) se plantearon las hipótesis de que i) “*la fisiología de la FBN llevada a cabo por la simbiosis mutualista entre bacterias fijadoras de N₂ y Lotus spp. bajo estrés por sumersión parcial, es más afectada en L. japonicus que en L. tenuis, en correspondencia con la tolerancia relativa reportada para ambas especies frente a dicho estrés*” y ii) “*los genes de enzimas claves en la FBN se reprimen bajo estrés por sumersión parcial en la especie más sensible L. japonicus, contribuyendo a la reducción de la eficiencia en la FBN en esta especie*”. Las mismas se pusieron a prueba mediante la evaluación de características fisiológicas, de crecimiento y de expresión de genes vinculados a la FBN frente al estrés por sumersión parcial, sobre dos accesiones del género *Lotus* contrastantes en cuanto a su tolerancia a dicho estrés según lo determinado en los estudios previos en este trabajo de tesis. Las accesiones estuvieron asociadas simbióticamente con una cepa microbiana efectiva para ambas especies. A partir de los resultados obtenidos, se concluyó que, si bien la sumersión parcial causa hipoxia en las raíces noduladas, la FBN es afectada diferencialmente entre las especies, y que la misma presenta una correspondencia con la tolerancia inherente de las especies vegetales, aceptando la hipótesis planteada.

Discusión general de los principales hallazgos y perspectivas derivadas

La obtención de leguminosas forrajeras de elevada calidad, y aptas para suelos anegables, es de gran interés debido a que este tipo de ambientes limitan en gran medida el cultivo de la mayoría de las especies leguminosas forrajeras más utilizadas a nivel global, como por ejemplo la alfalfa y el trébol blanco. Es sabido que ciertas poblaciones de especies forrajeras del género *Lotus* se destacan por su buena adaptabilidad a ambientes de baja aptitud agrícola (Escaray *et al.*, 2012), lo que favorece su implantación y su persistencia en este tipo de ecosistemas. El uso de especies del género *Lotus* con fines forrajeros a su vez, se vería favorecido si se pudiera contar con cultivares de mejor calidad forrajera, es decir, que a la producción de materia seca en

ambientes marginales, se le sumen otros atributos tales como un adecuado/óptimo nivel de taninos condensados foliares. Cabe destacar que los taninos condensados foliares en forrajeras, en niveles de hasta 45 mg por g de MS, han sido vinculados a numerosas ventajas para la alimentación de los rumiantes, incluyendo aquellos que demuestran que los mismos previenen el “meteorismo” o “empaste” (Li *et al.*, 1996; Waghorn y Shelton 1997) (dicha problemática es muy importante en otras leguminosas carentes de los taninos condensados como la alfalfa y el trébol blanco); aumentan la eficiencia en el aprovechamiento de las proteínas, ya que los taninos condensados forman complejos en el rumen con ellas evitando su degradación por las bacterias allí alojadas y como consecuencia, aumentando su aprovechamiento a nivel intestinal (Aerts *et al.*, 1999); disminuyen la carga de parásitos internos (Niezen *et al.*, 1995; Otero y Hidalgo, 2004) y reducen de la emisión de metano producido en la fermentación entérica: es menester recordar la creciente importancia en el ámbito de la investigación de esta última temática, por ser el metano un potente gas del efecto invernadero, ya que su incidencia se considera 25 veces más significativa en el cambio climático global, que las concentraciones equivalentes de CO₂ (Tavendale *et al.*, 2005; Patra y Saxena, 2010). En este sentido, los cultivares de *L. corniculatus* son considerados de mayor calidad forrajera que los materiales de *L. tenuis*, por poseer niveles adecuados de taninos condensados para la alimentación de rumiantes y por tener un mayor potencial de producción de biomasa forrajera, pero numerosos reportes (incluyendo nuestro trabajo) ha dejado en evidencia que dichos materiales no prosperan en suelos anegables, lo que establece un claro contraste con *L. tenuis*. En el capítulo 2 del presente trabajo de tesis se ha evaluado la respuesta frente a la inundación del híbrido interespecífico entre *L. tenuis* y *L. corniculatus* (LtxLc) obtenido en nuestro laboratorio, el cual posee características mejoradas desde el punto de vista de la calidad forrajera con respecto a su parental *L. tenuis*, teniendo en cuenta los niveles de taninos condensados que posee dicho material. Los resultados de este trabajo de tesis, tomados en conjunto sugieren que el híbrido LtxLc sería tan apto como *L. tenuis* en ofrecer forraje para el ganado en los suelos anegables, pues alcanza el mismo nivel de acumulación de biomasa aérea luego de 35 días de recuperación post-inundación. Asimismo, se observa que tanto el material híbrido como *L. tenuis* poseen mejores aptitudes forrajeras en ambientes marginales que *L. corniculatus* tetraploide, el cual, a pesar de sus reconocidas características forrajeras (buen aporte de MS y concentraciones adecuadas de taninos condensados foliares), no lograría una implantación efectiva en los ecosistemas donde predominan las condiciones de estrés evaluadas.

En virtud de explicar las diferencias observadas en cuanto a la tolerancia de los materiales vegetales evaluados, una de las respuestas que más se asoció a la misma en nuestros resultados fue la capacidad de generar tejido aerenquimático en los órganos sumergidos, y la generación y mantenimiento de raíces adventicias. Estas dos características y su vinculación con la tolerancia en anegamientos prolongados, apoyan a lo reportado anteriormente por otros autores para distintas especies vegetales (Armstrong, 1979; Colmer y Voesenek, 2009; Voesenek y Bailey-Serres, 2015).

Las respuestas adaptativas de las accesiones más tolerantes (*L. tenuis* y el material híbrido) incluyó que las mismas en estrés por sumersión parcial, mantuvieron una tasa de fotosíntesis neta similar a sus controles, lo que contrastó con lo observado en las accesiones menos tolerantes (el cultivar tetraploide de *L. corniculatus* y la especie modelo *L. japonicus*). Nuestros resultados referidos a la tasa fotosintética fueron consistentes con lo reportado previamente en *L. corniculatus* por otros autores (Striker *et al.*, 2005) y fueron coherentes con la biomasa que lograron acumular esas accesiones durante el período de inundación. Cabe destacar que el aquí presentado, es el primer

reporte de un híbrido interespecífico del género *Lotus* evaluado bajo estas condiciones de estrés, y entendemos como necesario, realizar una proyección de nuestros estudios mediante una evaluación equivalente a nivel de parcelas de campo para comprobar los resultados evaluados en invernáculo. Asimismo, también nos proponemos como objetivo de estudio inmediato, evaluar los aspectos relativos a la calidad forrajera del material híbrido vinculados al contenido de taninos condensados en cuanto a su potencial importancia a nivel de la mitigación de la producción de metano en rumiantes y en el control de parásitos. Además se evaluarían posibles fluctuaciones del nivel de taninos en el forraje cuando el material híbrido es afectado por el efecto de las inundaciones y por su eficiencia frente a ciclos alternantes del “agua útil”.

Con respecto a las respuestas frente al estrés mixto de salinidad e inundación de las accesiones de *Lotus* y que se detallaron en el capítulo 3 de este trabajo de tesis, es menester destacar que las evaluaciones tuvieron en cuenta muy diversos parámetros entre los que se incluyeron: la acumulación de biomasa; mecanismos fisiológicos tales como el intercambio neto de CO₂ y la eficiencia del fotosistema II; la determinación de la concentración de iones (Na⁺, Cl⁻ y K⁺), y respuestas moleculares a nivel de transcritos asociados a la compartimentalización subcelular de los iones nocivos. Como resultado de los mismos, hemos podido demostrar que los mecanismos de respuesta planteados en las hipótesis de trabajo difirieron entre las accesiones evaluadas. En este sentido, los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la expresión relativa de genes vinculados a la compartimentalización subcelular de los iones Na⁺ y Cl⁻, tuvieron como antecedente, lo observado para *L. tenuis* y *L. corniculatus* tetraploide (Teakle *et al.*, 2010) frente al estrés mixto de inundación y salinidad, que dejaron en evidencia que la expresión relativa del gen del intercambiador Na⁺/H⁺ (*LtNHXI*) era inducido en las raíces de *L. tenuis* y no las de *L. corniculatus* tetraploide. Los mismos autores sugirieron que una mayor compartimentalización de Na⁺ en las vacuolas de las raíces, evitaría que el Na⁺ sea transportado al vástago, y de esta manera ejerza, su reconocido efecto detrimental, lo que contrasta claramente con lo reportado para el *L. corniculatus* tetraploide. Sin embargo, estos mismos autores, no evaluaron la expresión de *LtNHXI* en vástago, y a partir de ello, una de nuestras hipótesis de trabajo consistió en que la mayor tolerancia relativa determinada para alguna de las accesiones evaluadas, podría estar relacionada con un uso más eficiente del mismo mecanismo de compartimentalización del Na⁺ a nivel de vástago, en correspondencia con los determinados en la raíz. Teniendo en cuenta que en dos de las accesiones que mejor toleraron el estrés mixto de inundación y salinidad (el material híbrido y su parental LcD) se acumularon niveles de Na⁺ que podrían haber sido tóxicos para los vástagos en crecimiento, y habiéndose determinado que simultáneamente se observó una inducción de la expresión relativa de *LtNHXI* en los ápices, podemos sugerir que existiría una compartimentalización de Na⁺ evitando así su efecto tóxico en el citoplasma. Por su parte, los evidentes fenotipos de toxicidad iónica observados en los vástago del *L. corniculatus* tetraploide bajo estrés mixto de inundación y salinidad, también permitirían sugerir que este mecanismo de tolerancia no se encontraría activo en esta accesión en tal condición, ni a nivel de raíces (Teakle *et al.*, 2010) ni en vástagos (este trabajo de tesis). Nuestro trabajo además incluyó el estudio, por primera vez para una leguminosa, de la expresión relativa del gen *CLC-f* el cual codifica para un canal de Cl⁻, que intervendría en su compartimentalización en las vesículas subcelulares del aparato de Golgi. El gen que codifica para dicho transportador, se indujo diferencialmente frente el estrés mixto de inundación y salinidad en las dos mismas accesiones que toleraron altas concentraciones de los iones tóxicos en vástagos sin mostrar daños por toxicidad (el material híbrido y su parental *L. corniculatus* diploide), lo que contrastó con lo

observado para las demás accesiones. De estas evidencias, surge la necesidad de más estudios que evalúen la localización y funcionalidad *in situ* de este canal de Cl^- para una mejor comprensión de las evidencias reportadas en nuestro trabajo. Es importante tener en cuenta, que los reportes actualmente disponibles en la literatura especializada, sugieren fuertemente que la tolerancia de las plantas leguminosas está más asociada a una adecuada regulación de la concentración citoplasmática del anión Cl^- que a la del catión Na^+ (revisado por Teakle y Tyerman, 2010). Por ello, entendemos como de particular relevancia, considerar como una futura aplicación biotecnológica lo observado para el gen *CLC-f*, evaluando su transferencia a leguminosas consideradas sensibles al estrés salino, en un procedimiento análogo a los trabajos llevados a cabo por Bao *et al.* (2014 y 2016) para intercambiadores de Na^+/H^+ y las bombas de H^+ discutidos en el apartado 3.5.3 de este trabajo de tesis.

Por otro lado, también nos interesa profundizar la evaluación de nuestras observaciones sobre el material híbrido interespecífico LtxLc bajo las condiciones de estrés mixto de inundación y salinidad, donde hemos podido determinar una mejor respuesta que frente al estrés inducido únicamente por la presencia de sales neutras (observación la cual es reportada por primera vez para una leguminosa). Este tipo de respuesta frente al estrés mixto de inundación y salinidad, ha sido escasamente reportada y a nuestro entender, resulta muy promisoria, ya que avalaría su posible utilidad como forrajera para ambientes donde se encuentran ambos estreses en forma simultánea. También entendemos que constituiría un interesante sistema de estudio para dilucidar comparativamente, los mecanismos de respuesta del material híbrido con respecto a sus parentales, ya que éstos parecen priorizar mecanismos diferentes entre ellos para hacer frente al estrés por salinidad y el estrés mixto provocado por la presencia simultánea de inundación y de salinidad.

Con respecto a la evaluación de la incidencia del estrés por inundación sobre el proceso de FBN (tema el cual se abordó en el capítulo 5 de este trabajo de tesis), se encontró que el mismo se afectó diferencialmente según el nivel de tolerancia de las especies leguminosas consideradas. Si bien la sumersión parcial indujo una situación de hipoxia en las raíces noduladas de ambas accesiones estudiadas (Lj y Lt), la FBN es afectada diferencial y significativamente entre las especies. Las claras diferencias observadas brindan un modelo experimental muy interesante que permitiría comprender con mayor profundidad, los mecanismos de respuesta y tolerancia asociados a la FBN en importantes especies leguminosas forrajeras bajo situaciones de estrés por inundación.

En síntesis, en vinculación con el objetivo general propuesto de profundizar el conocimiento sobre el género *Lotus* frente a condiciones restrictivas de crecimiento, con énfasis en la finalidad de incrementar su aprovechamiento en áreas inundables tales como los de la Pampa Deprimida, pudo cumplirse el mismo desde dos enfoques: i) desde un “punto de vista teórico” se logró ampliar el conocimiento en cuanto a las respuestas que diferencialmente ponen en juego las especies del género *Lotus* frente al estrés por inundación del tipo sumersión parcial, a la que se sumó la variante del estrés mixto por sumersión parcial y salinidad, estableciendo un nuevo modelo experimental que permite el diseño de nuevos estudios sobre la fisiología y los mecanismos de respuesta de la FBN frente a este tipo de estrés, lo cual no es frecuentemente evaluado. Asimismo entendemos que la hibridación interespecífica constituye una herramienta de elevada potencialidad de estudio en el género *Lotus* en particular, y eventualmente en leguminosas en general, teniendo quizás particular interés, en la evaluación de los mecanismos de las respuestas frente al estrés mixto de inundación y salinidad; y ii) desde un enfoque más “aplicado”, el uso potencial de la hibridación interespecífica permitiría obtener materiales con características mejoradas (por ejemplo, con respecto a

L. tenuis, con mejores niveles de taninos condensados foliares y la presencia de rizomas) aptos para ambientes inundables, lo que posibilitaría incrementar el aprovechamiento ganadero de grandes áreas restrictivas tales como los que frecuentemente se observan en la Pampa Deprimida, asegurando la persistencia de los recursos forrajeros necesarios. Esta aplicación tecnológica se suma a las expectativas que poseemos en cuanto a la obtención de nuevos criterios de mejora en el género *Lotus* spp., que se desprenderían de las técnicas de secuenciación masiva y la evaluación de los perfiles metabólicos que se encuentran en análisis. Entendemos que a partir de los mismos podríamos sumar novedosos elementos de selección de los materiales vegetales utilizados, en los actuales programas de mejoramiento de leguminosas forrajeras.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts, R.J., Barry, T.N. y McNabb, W. C. 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, ecosystems and environment*, 75: 1-12.
- Alamri, S.A., Barrett-Lennard, E.G., Teakle, N.L., y Colmer, T.D. 2013. Improvement of salt and waterlogging tolerance in wheat: comparative physiology of *Hordeum marinum-Triticum aestivum* amphiploids with their *H. marinum* and wheat parents. *Functional Plant Biology*, 40: 1168-1178.
- Andreadeli, A., Flemetakis, E., Axarli, I., Dimou, M., Udvardi, M.K., Katinakis, P. y Labrou, N.E. 2009. Cloning and characterization of *Lotus japonicus* formate dehydrogenase: a possible correlation with hypoxia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1794: 976-984.
- Annicchiarico, P. 2015. Alfalfa forage yield and leaf/stem ratio: narrow-sense heritability, genetic correlation, and parent selection procedures. *Euphytica*, 205: 409-420.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A. y Blumwald, E. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis*. *Science*, 285: 1256-1258.
- Armstrong W. 1979. Aeration in higher plants. Pp. 225-332 en Woolhouse, H.W. (ed) *Advances in Botanical Research*. 7th edition, Academic Press, London.
- Armstrong, W. y Drew, M.C. 2002. Root growth and metabolism under oxygen deficiency. *Plant roots: the hidden half*, 3, 729-761.
- Arnell, N. y Liu, C. 2001. Hydrology and water resources. Pp 191-234 en McCarthy, J.J. Canziani, O.F., Leary, N.A., Dokken, D.J. y White, K.S. (eds.) *Climate Change 2001: Impacts, Adaptation and Vulnerability*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Ashraf, M. 2003. Relationships between leaf gas exchange characteristics and growth of differently adapted populations of Blue panicgrass (*Panicum antidotale* Retz.) under salinity or waterlogging. *Plant science*, 165: 69-75.
- Ayers, R.S. y Westcot, D.W. 1985. *Water quality for agricultura* (Vol. 29). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Bacanamwo, M. y Purcell, L.C. 1999. Soybean dry matter and N accumulation responses to flooding stress, N sources and hypoxia. *Journal of Experimental Botany*, 50, 689-696.
- Bailey-Serres, J. y Voesenek, L.A.C.J. 2008. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 313-339.
- Bailey-Serres, J., Fukao, T., Gibbs, D.J., Holdsworth, M.J., Lee, S.C., Licausi, F., Perata, P., Voesenek, L.A.C.J. y van Dongen, J.T. 2012. Making sense of low oxygen sensing. *Trends in plant science*, 17, 129-138.
- Bajji, M., Kinet, J.M., y Lutts, S. 2002. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*, 36: 61-70.
- Bao, A.K., Wang, Y.W., Xi, J.J., Liu, C., Zhang, J. L. y Wang, S.M. 2014. Co-expression of xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* ZxNHX and ZxVP1-1 enhances salt and drought tolerance in transgenic *Lotus corniculatus* by increasing cations accumulation. *Functional Plant Biology*, 41: 203-214.
- Bao, A.K., Du, B.Q., Touil, L., Kang, P., Wang, Q.L., y Wang, S.M. 2016. Co-expression of tonoplast Cation/ H^+ antiporter and H^+ -pyrophosphatase from

- xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* improves alfalfa plant growth under salinity, drought and field conditions. *Plant biotechnology journal*, 14: 964-975.
- Barrett-Lennard, E.G. y Malcolm, C.V. 1999. Increased concentrations of chloride beneath stands of saltbushes (*Atriplex species*) suggest substantial use of groundwater. *Animal Production Science*, 39: 949-955.
- Barrett-Lennard, E.G. 2003. The interaction between waterlogging and salinity in higher plants: causes, consequences and implications. *Plant and Soil*, 253: 35-54.
- Barrett-Lennard, E.G. y Shabala, S.N. 2013. The waterlogging/salinity interaction in higher plants revisited—focusing on the hypoxia-induced disturbance to K⁺ homeostasis. *Functional Plant Biology*, 40: 872-882.
- Bennett, S.J., Barrett-Lennard, E.G. y Colmer, T. D. 2009. Salinity and waterlogging as constraints to saltland pasture production: a review. *Agriculture, Ecosystems y Environment*, 129: 349-360.
- Blumenthal, M.J. y McGraw, R.L. 1999. Lotus adaptation, use, and management. *Trefoil: the science and technology of Lotus*, (trefoilthescien), 97-119.
- Bologa, K.L., Fernie, A.R., Leisse, A., Loureiro, M.E. y Geigenberger, P. 2003. A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. *Plant Physiology*, 132: 2058-2072.
- Burkart, S.E., Garbulsky, M.F., Ghera, C.M., Guerschman, J.P., León, R.J.C., Oesterheld, M., Paruelo, J.M. y Perelman, S. B. 2005. Las comunidades potenciales del pastizal pampeano bonaerense. Pp 379-399 en Oesterheld, M., Aguiar, M.R., Ghera, C.M. y Paruelo, J.M. (eds) *La heterogeneidad de la vegetación en los agroecosistemas*. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires.
- Buwalda, F., Thomson, C.J., Steigner, W., Barrett-Lennard, E.G., Gibbs, J. y Greenway, H. 1988. Hypoxia induces membrane depolarization and potassium loss from wheat roots but does not increase their permeability to sorbitol. *Journal of Experimental Botany*, 39: 1169-1183.
- Buxton, D.R. 1996. Quality-related characteristics of forages as influenced by plant environment and agronomic factors. *Animal feed science and technology*, 59: 37-49.
- Byrt, C.S., Platten, J.D., Spielmeyer, W., James, R.A., Lagudah, E.S., Dennis, E.S. y Munns, R. 2007. HKT1; 5-like cation transporters linked to Na⁺ exclusion loci in wheat, *Nax2* and *Kna1*. *Plant Physiology*, 143: 1918-1928.
- Carter, J.L., Colmer, T.D. y Veneklaas, E.J. 2006. Variable tolerance of wetland tree species to combined salinity and waterlogging is related to regulation of ion uptake and production of organic solutes. *New Phytologist*, 169: 123-134.
- Castillo, A., Rebuffo, M., Rizza, M.D., Folle, G., Santiñaque, F., Borsani, O. y Monza, J. 2012. Generation and Characterization of Interspecific Hybrids of *Lotus uliginosus* X *Lotus corniculatus*. *Crop science*, 52: 1572-1582.
- Colmer, T.D. 2003. 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, T.D. y Greenway, H. 2005. Oxygen transport, respiration, and anaerobic carbohydrate catabolism in roots in flooded soils. Pp. 137-158 en Lambers, H., Rivas-Carbo, M. (eds) *Plant respiration: from cell to ecosystem*. Springer, The Netherlands.
- Colmer, T.D. y Flowers, T.J. 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 179: 945-963.

- Colmer, T.D. y Voesenek, L.A.C.J. 2009. Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Functional Plant Biology*, 36: 665-681.
- Datta, K.K. y De Jong, C. 2002. Adverse effect of waterlogging and soil salinity on crop and land productivity in northwest region of Haryana, India. *Agricultural Water Management*, 57: 223-238.
- Dear, B.S., Moore, G.A., y Hughes, S.J. 2003. Adaptation and potential contribution of temperate perennial legumes to the southern Australian wheatbelt: a review. *Animal Production Science*, 43: 1-18.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. y Robledo, C.W. 2011 InfoStat versión 2011, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Drew, M.C., Guenther, J. y Lauchli, A. 1988. The combined effects of salinity and root anoxia on growth and net Na⁺ and K⁺ accumulation in *Zea mays* grown in solution culture. *Annals of Botany*, 61: 41-53.
- Else, M.A., Tiekstra, A.E., Croker, S.J., Davies, W.J. y Jackson M.B. 1996. Stomatal closure in flooded tomato plants involves abscisic acid and a chemically unidentified anti-transpirant in xylem sap. *Plant Physiol* 112: 239-247.
- Escaray, F.J., Menendez, A.B., Gárriz, A., Pieckenstain, F.L., Estrella, M.J., Castagno, L.N., Carrasco, P., Sanjuán, J. y Ruiz, O.A. 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.
- Escaray, F.J., Passeri, V., Babuin, F.M., Marco, F., Carrasco, P., Damiani, F., Pieckenstain, F.L., Paolucci F. y Ruiz, O.A. 2014. *Lotus tenuis* x *L. corniculatus* interspecific hybridization as a means to breed bloat-safe pastures and gain insight into the genetic control of proanthocyanidin biosynthesis in legumes. *BMC plant biology*, 14: 1.
- FAO, 2008. FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>.
- Fernandes, A. 1981. Contribution à la connaissance des lotiers du groupe *Corniculatus* de la Péninsule Ibérique et des îles Baléares. *Bol Soc Brot sér.* 55: 29-86
- Flowers, T.J., Troke, P.F. y Yeo, A.R. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual review of plant physiology*, 28: 89-121.
- Flowers, T.J., Munns, R. y Colmer, T.D. 2015. Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Annals of botany*, 115: 419-431.
- Foyer, C. H. y Noctor, G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, 28: 1056-1071.
- Foyer, C.H. y Shigeoka, S. 2011. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant physiology*, 155: 93-100.
- Galloway, R. y Davidson, N.J. 1993. The response of *Atriplex amnicola* to the interactive effects of salinity and hypoxia. *Journal of Experimental Botany*, 44: 653-663.
- Gibbs, J. y Greenway, H. 2003. Review: mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Functional Plant Biology*, 30: 353-353
- Goormachtig, S., Capoen, W. y Holsters, M. 2004. Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. *Trends in plant science*, 9: 518-522.

- Graham, P.H. y Vance, C.P. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, 131: 872-877.
- Grant, W.F. 1999. Interspecific Hybridization and Amphidiploidy of as it Relates to Phylogeny and Evolution. *Trefoil: the science and technology of Lotus*, (trefoilthescien), 43-60.
- Greenway, H. y Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual review of plant physiology*, 31: 149-190.
- Greenway, H., Armstrong, W. y Colmer, T. D. 2006. Conditions leading to high CO₂ (> 5 kPa) in waterlogged-flooded soils and possible effects on root growth and metabolism. *Annals of Botany*, 98: 9-32.
- Grimoldi, A.A., Insausti, P., Roitman, G.G. y Soriano, A. 1999. Responses to flooding intensity in *Leontodon taraxacoides*. *New Phytologist*, 141: 119-128.
- Guignard, M.S., Nichols, R.A., Knell, R.J., Macdonald, A., Romila, C.A., Trimmer, M., Leitch, I.J. y Leitch, A.R. (2016). Genome size and ploidy influence angiosperm species' biomass under nitrogen and phosphorus limitation. *New Phytologist*, 210: 1195-1206.
- Haddadi, B.S., Hassanpour, H. y Niknam, V. 2016. Effect of salinity and waterlogging on growth, anatomical and antioxidative responses in *Mentha aquatica* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38: 1-11.
- Hagerman, A.E., y Butler, L.G. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 256: 4494-4497.
- Häring, D.A., Suter, D., Amrhein, N. y Lüscher, A. 2007. Biomass allocation is an important determinant of the tannin concentration in growing plants. *Annals of Botany*, 99: 111-120.
- Hartwig, U.A. 1998. The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 1: 92-120.
- Hatton, T.J., Ruprecht, J. y George, R.J. 2003. Preclearing hydrology of the Western Australia wheatbelt: target for the future. *Plant and soil*, 257: 341-356.
- Henderson, S.W., Baumann, U., Blackmore, D.H., Walker, A.R., Walker, R.R. y Gilliam, M. 2014. Shoot chloride exclusion and salt tolerance in grapevine is associated with differential ion transporter expression in roots. *BMC plant biology*, 14: 1.
- Hirabayashi, Y., Mahendran, R., Koirala, S., Konoshima, L., Yamazaki, D., Watanabe, S., Kim, H. y Kanae, S. 2013. Global flood risk under climate change. *Nature Climate Change*, 3: 816-821.
- Hirsch, A.M., Lum, M.R. y Downie, J.A. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiology*, 127: 1484-1492.
- Ismond, K.P., Dolferus, R., De Pauw, M., Dennis, E.S. y Good, A.G. 2003. Enhanced low oxygen survival in *Arabidopsis* through increased metabolic flux in the fermentative pathway. *Plant Physiology*, 132: 1292-1302.
- Imaz, J.A., Giménez, D.O., Grimoldi, A.A. y Striker, G.G. 2015. Ability to recover overrides the negative effects of flooding on growth of tropical grasses *Chloris gayana* and *Panicum coloratum*. *Crop and Pasture Science*, 66: 100-106.
- Insausti, P., Grimoldi, A.A., Chaneton, E.J. y Vasellati, V. 2001. Flooding induces a suite of adaptive plastic responses in the grass *Paspalum dilatatum*. *New Phytologist*, 152: 291-299.
- Irving, L.J., Sheng, Y.B., Woolley, D. y Matthew, C. 2007. Physiological effects of waterlogging on two lucerne varieties grown under glasshouse conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193: 345-356.

- Jackson, M.B. y Armstrong, W. 1999. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. *Plant Biology*, 1: 274-287.
- James, E.K. y Crawford, R.M.M. 1998. Effect of oxygen availability on nitrogen fixation by two *Lotus* species under flooded conditions. *Journal of Experimental Botany*, 49: 599-609.
- James, R.A., Davenport, R.J. y Munns, R. 2006. Physiological characterization of two genes for Na⁺ exclusion in durum wheat, Nax1 and Nax2. *Plant physiology*, 142: 1537-1547.
- Joseph, B., Jini, D. y Sujatha, S. 2010. Biological and physiological perspectives of specificity in abiotic salt stress response from various rice plants. *Asian Journal Agriculture Science*, 2: 99-105.
- Jossier, M., Kroniewicz, L., Dalmas, F., Le Thiec, D., Ephritikhine, G., Thomine, S. y Leonhardt, N. 2010. The Arabidopsis vacuolar anion transporter, AtCLC_c, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance. *The Plant Journal*, 64: 563-576.
- Justin, S.H.F.W. y Armstrong, W. 1987. The anatomical characteristics of roots and plant responses to soil flooding. *New Phytol* 106: 465-495.
- Kade, M., Pagani, E.A. y Mendoza, R.E. 2003. Phosphorus utilization efficiency in populations of narrow-leaf birdsfoot trefoil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 34: 271-284.
- Kephart, K.D., Buxton, D.R. y Hill, R.R. 1990. Digestibility and cell wall components of alfalfa following selection for divergent herbage lignin concentration. *Crop Science* 30: 207-212.
- Koyro, H.W., Hussain, T., Huchzermeyer, B. y Khan, M.A. 2013. Photosynthetic and growth responses of a perennial halophytic grass *Panicum turgidum* to increasing NaCl concentrations. *Environmental and Experimental Botany*, 91: 22-29.
- Kozłowski, T.T. y Pallardy, S.G. 1984. Effects of flooding on water, carbohydrate and mineral relations. Pp. 165-193 en Kosłowski T.T. (ed). Academia Press Inc., Orlando, Florida.
- Kramina, T.E. 1999. A contribution to the taxonomic revision of the *Lotus corniculatus* complex (Leguminosae, Loteae) in the European part of the former USSR. *Syst Geogr Pl* 68: 265-279.
- Kronzucker, H.J., Coskun, D., Schulze, L.M., Wong, J.R. y Britto, D.T. 2013. Sodium as nutrient and toxicant. *Plant and soil*, 369: 1-23.
- Laan, P., Berrevoets, M.J., Lythe, S., Armstrong, W. y Blom, C.W.P.M. 1989. Root morphology and aerenchyma formation as indicators of the flood-tolerance of *Rumex* species. *The Journal of Ecology*, 693-703.
- Laan, P., Tosserams, M., Blom, C.W.P.M. y Veen, B.W. 1990. Internal oxygen transport in *Rumex* species and its significance for respiration under hypoxic conditions. *Plant and Soil*, 122: 39-46.
- Lagler, J.C. 2003. *Lotus*: un género que no acaba en dos especies. *Revista Forrajes y Granos*, 62: 72-76.
- Larcher, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag. 506.
- Lee, T.M., Lur, H.S. y Chu, C. 1993. Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. I. Endogenous abscisic acid levels. *Plant Cell Environ*, 16: 481-490.

- Leigh, R.A. y Wyn Jones, R.G. 1986. Cellular compartmentation in plant nutrition: the selective cytoplasm and the promiscuous vacuole. *Advances in plant nutrition (USA)*.
- Lemaire, G. y Allirand J.M. 1993. Relation entre croissance et qualité de la luzerne: interaction génotype-mode d'exploitation. *Fourrages*, 134:183-198.
- León, R.J., Burkart, S.E. y Movia, C.P. 1979. Relevamiento fitosociológico del pastizal del norte de la depresión del Salado (Partidos de Magdalena y Brandsen, provincia de Buenos Aires). *La Vegetación de la República Argentina. Serie Fitogeográfica* 17. INTA. 90. Buenos Aires.
- León, R.J.C., Striker, G.G., Insausti, P. y Perelman, S.B. 2007. Río de la Plata grasslands and *Lotus tenuis*. *Lotus Newsletter*, 37: 67-68.
- Li, Y.G., Tanner, G. y Larkin, P. 1996. The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70: 89-101.
- Loureiro, M.D.F., James, E.K. y Franco, A.A. 2010. Nitrogen fixation by legumes in flooded regions. *Oecologia Australis*, 4: 195-233.
- Luo, Q., Yu, B. y Liu, Y. 2005. Differential sensitivity to chloride and sodium ions in seedlings of *Glycine max* and *G. soja* under NaCl stress. *Journal of plant physiology*, 162: 1003-1012.
- Ma, W., Charles, T.C. y Glick, B.R. 2004. Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 5891-5897.
- Maathuis, F.J. y Amtmann, A.N.N.A. 1999. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Annals of Botany*, 84: 123-133.
- Maiola, O., Gabellone, N. y Hernández, M. 2003. Inundaciones en la Región Pampeana Edulp, La Plata.
- Malik, A.I., Islam, A.K.M.R. y Colmer, T.D. 2011. Transfer of the barrier to radial oxygen loss in roots of *Hordeum marinum* to wheat (*Triticum aestivum*): evaluation of four *H. marinum*-wheat amphiploids. *New Phytologist*, 190: 499-508.
- Manuel-Navarrete, D., Gallopín, G.C., Blanco, M., Díaz-Zorita, M., Ferraro, D.O., Herzer, H., Lateral, P., Murmis, M.R., Podestá, G.P., Rabinovich, J., Satorre, E.H., Torres, F. y Viglizzo, E.F. 2007. Multi-causal and integrated assessment of sustainability: the case of agriculturization in the Argentine Pampas. *Environment, Development and Sustainability*, 11: 621-638.
- Manzur, M.E., Grimoldi, A.A., Insausti, P. y Striker, G.G. 2009. Escape from water or remain quiescent? *Lotus tenuis* changes its strategy depending on depth of submergence. *Annals of botany*, 104: 1163-1169.
- Martínez-Atienza, J., Jiang, X., Garciadeblas, B., Mendoza, I., Zhu, J. K., Pardo, J. M. y Quintero, F.J. 2007. Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiology*, 143: 1001-1012.
- Mazzanti, A., Montes, L., Muñón, D., Sarlangue, H. y Cheppi, C. 1988. Utilización de *Lotus tenuis* en establecimientos ganaderos de la Pampa Deprimida: Resultados de una encuesta. *Revista Argentina de Producción Animal*, 8: 301-305.
- McCarron, J.K., McLeod, K.W. y Conner, W.H. 1998. Flood and salinity stress of wetland woody species, buttonbush (*Cephalanthus occidentalis*) and swamp tupelo (*Nyssa sylvatica* var. *biflora*). *Wetlands*, 18: 165-175.
- Mendoza, R. 2001. Phosphorus nutrition and mycorrhizal growth response of broadleaf and narrowleaf birdsfoot trefoils. *Journal of plant nutrition*, 24: 203-214.

- Mendoza, R., Escudero, V. y García I. 2005. Plant growth, nutrient acquisition and mycorrhizal symbioses of a waterlogging tolerant legume (*Lotus glaber* Mill.) in a saline-sodic soil. *Plant and Soil*, 275: 305-315.
- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T. y McNabb, W.C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 106: 3-19.
- Montes, L. 1988. *Lotus tenuis*. *Revista Argentina de Producción Animal*, 8: 367-376.
- Morard, P. y Silvestre, J. 1996. Plant injury due to oxygen deficiency in the root environment of soilless culture: A review. *Plant and Soil*, 184: 243-254.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell and environment*, 25: 239-250.
- Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, 167: 645-663.
- Munns, R. y Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- Mylona, P., Pawlowski, K. y Bisseling, T. 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*, 7: 869.
- Naidoo, G. y Naidoo, S. 1992. Waterlogging responses of *Sporobolus virginicus* (L.) Kunth. *Oecologia*, 90: 445-450.
- Naidoo, G. y Mundree, S.G. 1993. Relationship between morphological and physiological responses to waterlogging and salinity in *Sporobolus virginicus* (L) Kunth. *Oecologia*, 93: 360-366.
- Nakamura, A., Fukuda, A., Sakai, S. y Tanaka, Y. 2006. Molecular cloning, functional expression and subcellular localization of two putative vacuolar voltage-gated chloride channels in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology*, 47: 32-42.
- Nelson, D.W. y Sommers, L.E. 1973. Determination of total nitrogen in plant material. *Agronomy Journal*, 65: 109-112.
- Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Charleston, W.A.G. y Waghorn, G.C. 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *The Journal of Agricultural Science*, 125: 281-289.
- Nukui, N., Minamisawa, K., Ayabe, S.I., y Aoki, T. 2006. Expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase gene requires symbiotic nitrogen-fixing regulator gene nifA2 in *Mesorhizobium loti* MAFF303099. *Applied and environmental microbiology*, 72: 4964-4969.
- Okazaki, S., Nukui, N., Sugawara, M. y Minamisawa, K. 2004. Rhizobial strategies to enhance symbiotic interactions: rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Microbes and Environments*, 19: 99-111.
- Otero, M. y Hidalgo, L. 2004. Condensed tannins in temperate forages species: effects on the productivity of ruminants infected with internal parasites (a review). *Livestock Research for Rural Development*, 16: 18-36.
- Ott, T., van Dongen, J.T., Gu, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H. y Udvardi, M.K. 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current biology*, 15: 531-535.
- Pannell, D.J., Ewing, M.A. y Ridley, A.M. 2004. Dryland salinity in Australia: overview and prospects. *Dryland salinity: economic issues at farm, catchment and policy levels*. CRC for Plant-based Management of Dryland Salinity, Perth.

- Parad, G.A., Zarafshar, M., Striker, G.G. y Sattarian, A. 2013. Some physiological and morphological responses of *Pyrus boissieriana* to flooding. *Trees*, 27: 1387-1393.
- Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O. y Quintero, F.J. 2006. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1181-1199.
- Paruelo, J.M. y Sala, O.E. 1990. Caracterización de las inundaciones en la Depresión del Salado (Buenos Aires, Argentina): Dinámica de la capa freática. *Turrialba*, 40: 5-11.
- Patra, A.K. y Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71: 1198-1222.
- Peoples, M.B., Brockwell, J., Herridge, D.F., Rochester, I.J., Alves, B.J.R., Urquiaga, S. y Sampet, C. 2009. The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis*, 48: 1-17.
- Ponnamperuma, F.N. 1984. Effects of flooding on soils. Pp. 10-42 en Koslowski T.T. (ed) Academic Press Inc., Orlando, Florida.
- Qureshi, R.H., Abdullah, M., Salim, M. y Pitman, M.G. 1982. *Diplachne fusca*: an Australian salt-tolerant grass used in Pakistani agriculture. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science (Australia)*.
- Real, D., Warden, J., Sandral, G.A. y Colmer, T.D. 2008. Waterlogging tolerance and recovery of 10 *Lotus* species. *Animal Production Science*, 48: 480-487.
- Rearte, D.H. 1997. La integración de la ganadería argentina. Secretaría de Agricultura, Pesca y Alimentación, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires (Argentina) pp. 48.
- Rearte, D. 2004. El futuro de la ganadería argentina, 2º Jornada de Actualización Ganadera, Balcarce. pp. 6-11.
- Rengasamy, P., Chittleborough, D. y Helyar, K. 2003. Root-zone constraints and plant-based solutions for dryland salinity. *Plant and Soil*, 257: 249-260.
- Rocha, M., Licausi, F., Araujo, W.L., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A.R. y van Dongen J.T. 2010. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 152: 1501-1513.
- Robinson, P.H., Grattan, S.R., Getachew, G., Grieve, C.M., Poss, J.A., Suarez, D.L. y Benes, S.E. 2004. Biomass accumulation and potential nutritive value of some forages irrigated with saline-sodic drainage water. *Animal Feed Science and Technology*, 111: 175-189.
- Rosenzweig, C., Tubiello, F.N., Goldberg, R., Mills, E. y Bloomfield, J. 2002. Increased crop damage in the US from excess precipitation under climate change. *Global Environ Change Part A* 12: 197-202.
- Rogers, M.E., Noble, C.L., Halloran, G.M. y Nicolas, M.E. 1997. Selecting for salt tolerance in white clover (*Trifolium repens*): chloride ion exclusion and its heritability. *New Phytologist*, 135: 645-654.
- Rubio, G., Casasola, G. y Lavado, R.S. 1995. Adaptations and biomass production of two grasses in response to waterlogging and soil nutrient enrichment. *Oecologia*, 102: 102-105.
- Sannazzaro, A.I., Ruiz, O.A., Albertó, E. y Menéndez, A.B. 2004. Presence of different arbuscular mycorrhizal infection patterns in roots of *Lotus glaber* plants growing in the Salado River basin. *Mycorrhiza*, 14: 139-142.

- Sánchez, C., Tortosa, G., Granados, A., Delgado, A., Bedmar, E.J. y Delgado, M.J. 2011. Involvement of *Bradyrhizobium japonicum* denitrification in symbiotic nitrogen fixation by soybean plants subjected to flooding. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 212-217.
- Shabala, S. y Cuin, T.A. 2008. Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 133: 651-669.
- Shabala, S. 2009. Salinity and programmed cell death: unravelling mechanisms for ion specific signalling. *Journal of Experimental Botany*, 60: 709-712.
- Shabala, S. 2013. Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Annals of Botany*, mct205.
- Shimamura, S., Mochizuki, T., Nada, Y. y Fukuyama, M. 2002. Secondary aerenchyma formation and its relation to nitrogen fixation in root nodules of soybean plants (*Glycine max*) grown under flooded conditions. *Plant Production Science*, 5: 294-300.
- Sibole, J.V., Cabot, C., Poschenrieder, C. y Barceló, J. 2003. Ion allocation in two different salt-tolerant Mediterranean *Medicago* species. *Journal of plant physiology*, 160: 1361-1365.
- Smedema, L.K. y Shiati, K. 2002. Irrigation and salinity: a perspective review of the salinity hazards of irrigation development in the arid zone. *Irrigation and drainage systems*, 16: 161-174.
- Smethurst, C.F. y Shabala, S. 2003. Screening methods for waterlogging tolerance in lucerne: comparative analysis of waterlogging effects on chlorophyll fluorescence, photosynthesis, biomass and chlorophyll content. *Functional Plant Biology*, 30: 335-343.
- Smil, V. 1999. Nitrogen in crop production: An account of global flows. *Global biogeochemical cycles*, 13: 647-662.
- Song, J., Shi, G., Gao, B., Fan, H. y Wang, B. 2011. Waterlogging and salinity effects on two *Suaeda salsa* populations. *Physiologia Plantarum*, 141: 343-351.
- Soriano, A. 1991. Río de la Plata Grasslands. Pp. 367-407 en Coupland, R.T. (ed), Elsevier, Amsterdam - London - New York - Tokio.
- Sprent, J.I. 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist*, 174: 11-25.
- Strasser, R.J., Srivastava, A. y Tsimilli-Michael, M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. Pp. 445-483 en Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P. (eds) *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Taylor and Francis, London.
- Strauss, A.J., Krüger, G.H.J., Strasser, R.J. y Van Heerden, P.D.R. 2006. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient OJIP. *Environmental and experimental botany*, 56: 147-157.
- Striker, G.G., Insausti, P., Grimoldi, A.A., Ploschuk, E.L., Vasellati, V. 2005. Physiological and anatomical basis of differential tolerance to soil flooding of *Lotus corniculatus* L. and *Lotus glaber* Mill. *Plant and Soil*, 276: 301-311.
- Striker, G.G., Insausti, P., Grimoldi, A.A. y Leon, R.J.C. 2006. Root strength and trampling tolerance in the grass *Paspalum dilatatum* and the dicot *Lotus glaber* in flooded soil. *Functional Ecology*, 20: 4-10.
- Striker, G.G., Insausti, P. y Grimoldi, A.A. 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, G., Mollard, F., Grimaldi, A., León, R. e Insausti, P. 2011. Increasing defoliation frequency constrains regrowth of *Lotus tenuis* under flooding. The role of crown reserves. *Applied Vegetation Science*, 14: 95-106.
- Striker, G.G. 2012. Time is on our side: the importance of considering a recovery period when assessing flooding tolerance in plants. *Ecological Research*, 27: 983-987.
- Striker, G.G., Izaguirre, R.F., Manzur, M.E. y Grimoldi, A.A. 2012. Different strategies of *Lotus japonicus*, *L. corniculatus* and *L. tenuis* to deal with complete submergence at seedling stage. *Plant Biology*, 14: 50-55.
- Striker, G.G., Casas, C., Manzur, M.E., Ploschuk, R.A. y Casal, J.J. 2014. Phenomic networks reveal largely independent root and shoot adjustment in waterlogged plants of *Lotus japonicus*. *Plant, Cell and Environment*, 37: 2278-2293.
- Striker, G.G., Teakle, N.L., Colmer, T.D. y Barrett-Lennard, E.G. 2015. Growth responses of *Melilotus siculus* accessions to combined salinity and root-zone hypoxia are correlated with differences in tissue ion concentrations and not differences in root aeration. *Environmental and Experimental Botany*, 109: 89-98.
- Striker, G.G., y Colmer, T.D. 2016. Flooding tolerance of forage legumes. *Journal of Experimental Botany*, erw239.
- Sultan, S.E. 2000. Phenotypic plasticity for plant development, function, and life-history. *Trends in Plant Science*, 5: 537-542.
- Tadege, M., Dupuis, I. y Kuhlemeier, C. 1999. Ethanolic fermentation: new functions for an old pathway. *Trends in Plant Science*, 4: 320-325.
- Tanou, G., Molassiotis, A. y Diamantidis, G. 2009. Hydrogen peroxide-and nitric oxide-induced systemic antioxidant prime-like activity under NaCl-stress and stress-free conditions in citrus plants. *Journal of plant physiology*, 166: 1904-1913.
- Tavendale, M.H., Meagher, L.P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G.T. y Sivakumaran, S. 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 123: 403-419.
- Teakle, N.L., Real, D. y Colmer, T.D. 2006. Growth and ion relations in response to combined salinity and waterlogging in the perennial forage legumes *Lotus corniculatus* and *Lotus tenuis*. *Plant and Soil*, 289: 369-383.
- Teakle, N.L., Flowers, T.J., Real, D. y Colmer, T.D. 2007. *Lotus tenuis* tolerates the interactive effects of salinity and waterlogging by 'excluding' Na⁺ and Cl⁻ from the xylem. *Journal of Experimental Botany*, 58: 2169-2180.
- Teakle, N.L., Amtmann, A., Real, D. y Colmer, T.D. 2010. *Lotus tenuis* tolerates combined salinity and waterlogging: maintaining O₂ transport to roots and expression of an *NHX1-like* gene contribute to regulation of Na⁺ transport. *Physiologia Plantarum*, 103: 358-374.
- Teakle, N.L. y Tyerman, S.D. 2010. Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. *Plant, Cell and Environment*, 33: 566-589.
- Teakle, N.L., Armstrong, J., Barrett-Lennard, E.G. y Colmer, T.D. 2011. Aerenchymatous phellem in hypocotyl and roots enables O₂ transport in *Melilotus siculus*. *New Phytologist*, 190: 340-350.
- Tester, M. y Davenport, R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of botany*, 91: 503-527.
- Udvardi, M.K., Tabata, S., Parniske, M. y Stougaard, J. 2005. *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *Trends in Plant Science*, 10: 222-228.

- Van Heerden, P.D., Strasser, R.J. y Krüger, G.H. 2004. Reduction of dark chilling stress in N_2 - fixing soybean by nitrate as indicated by chlorophyll a fluorescence kinetics. *Physiologia Plantarum*, 121: 239-249.
- Verboven, P., Pedersen, O., Herremans, E., Ho, Q.T., Nicolai, B.M., Colmer, T.D. y Teakle, N. 2012. Root aeration via aerenchymatous phellem: three-dimensional micro-imaging and radial O_2 profiles in *Melilotus siculus*. *New Phytologist*, 193: 420-431.
- Vervoorst, F.B. 1967. La vegetación de la República Argentina. VII. Las comunidades vegetales de la Depresión del Salado, Prov. de Buenos Aires. INTA. Serie Fitogeográfica N 7.
- Vignolio, O.R., Maceira, N.O. y Fernández, O.N. 1994. Efectos del anegamiento en invierno y verano sobre el crecimiento y la supervivencia de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus*. *Ecología Austral*: 4, 19-28.
- Vignolio, O.R., Maceira, N.O. y Fernández, O.N. 1995. Efectos del anegamiento sobre el poder germinativo de las semillas de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus*. Implicancias para su propagación diferencial en la Depresión del Salado (Buenos Aires, Argentina). *Ecología Austral*, 5: 63.
- Vignolio, O.R., Maceira, N.O. y Fernández, O.N. 1999. Flooding tolerance in five populations of *Lotus glaber* Mill. (Syn. *Lotus tenuis* Waldst. et. Kit.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 50: 555-560.
- Vignolio, O.R., Fernández, O.N. y Maceira N.O. 2002. Biomass allocation to vegetative and reproductive organs in *Lotus glaber* and *L. corniculatus* (Fabaceae). *Australian Journal of Botany*, 50: 75-82.
- Voesenek, L.A.C.J. y Blom, C.W.P.M. 1989. Growth responses of *Rumex* species in relation to submergence and ethylene. *Plant Cell Environ*, 12: 433-439.
- Voesenek, L.A., y Bailey-Serres, J. 2015. Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytologist*, 206: 57-73.
- Volkov, V. Amtmann, A. 2006. *Thellungiella halophila*, a salt - tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, has specific root ion - channel features supporting K^+/Na^+ homeostasis under salinity stress. *The Plant Journal*, 48: 342-353.
- Waghorn, G.C. y Shelton, I.D. 1997. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on the nutritive value of pasture for sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 128: 365-372.
- White, P.J. y Broadley, M.R. 2001. Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Annals of Botany*, 88: 967-988.
- Wiengweera, A., Greenway, H. y Thomson, C.J. 1997. The use of agar nutrient solution to simulate lack of convection in waterlogged soils. *Annals of Botany*, 80: 115-123.
- Winter, E. 1982. Salt tolerance of *Trifolium alexandrinum* L. III. Effects of salt on ultrastructure of phloem and xylem transfer cells in petioles and leaves. *Functional Plant Biology*, 9: 239-250.
- Xie, Y.J., Xu, S., Han, B., Wu, M.Z., Yuan, X.X., Han, Y. y Shen, W.B. 2011. Evidence of *Arabidopsis* salt acclimation induced by up - regulation of HY1 and the regulatory role of RbohD - derived reactive oxygen species synthesis. *The Plant Journal*, 66: 280-292.
- Xu, G., Magen, H., Tarchitzky, J. y Kafkafi, U. 1999. Advances in chloride nutrition of plants. *Advances in Agronomy*, 68: 97-150.
- Xue, Z.Y., Zhi, D.Y., Xue, G.P., Zhang, H., Zhao, Y.X. y Xia, G.M. 2004. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar

- Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺. *Plant Science*, 167: 849-859.
- Yamauchi, T., Shimamura, S., Nakazono, M. y Mochizuki, T. 2013. Aerenchyma formation in crop species: a review. *Field Crops Research*, 152: 8-16.
- Yensen, N.P., Yensen, S.B. y Weber, C.W. 1985. A review of *Distichlis spp.* for production and nutritional values. *Arid Land Today and Tomorrow*. Westview Press, Boulder, CO, 809-822.
- Young, N.D., Mudge, J. y Ellis, T.N. 2003. Legume genomes: more than peas in a pod. *Current opinion in plant biology*, 6: 199-204.
- Zhu, J.K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current opinion in plant biology*, 6: 441-445.

7. ANEXO

Figuras y tablas suplementarias correspondientes al capítulo 2

Tabla S.2.1. Efecto de 35 días de recuperación post 55 días de sumersión parcial (Inund) sobre distintas fracciones de biomasa (g de materia seca/planta) en plantas adultas de 5 accesiones (Acc) de *Lotus* spp. (Lt: *L. tenuis*; LtxLc: híbrido *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide; LcD: *L. corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide y Lj: *L. japonicus*).

Tratamientos		Hojas		Tallos		Raíces				
(Acc x Inund)		media	± DE	media	± DE	media	± DE			
Lt	Cont	6,05	± 1,28	b	13,32	± 2,19	a	8,40	± 2,50	b
	Inund	4,82	± 1,67	c	9,13	± 1,79	c	4,37	± 1,79	d
LtxLc	Cont	7,09	± 1,86	a	11,07	± 2,18	b	5,95	± 1,60	c
	Inund	3,32	± 1,45	d	5,67	± 1,75	e	2,55	± 0,83	e
LcD	Cont	5,42	± 1,68	bc	5,29	± 1,16	ef	2,57	± 0,81	e
	Inund	2,08	± 1,14	e	2,99	± 0,82	g	1,02	± 0,75	f
LcT	Cont	7,37	± 1,37	a	8,95	± 2,26	cd	12,32	± 4,08	a
	Inund	1,62	± 0,89	ef	4,37	± 0,80	f	1,47	± 0,93	ef
Lj	Cont	3,17	± 0,70	d	7,83	± 1,71	d	2,61	± 0,88	e
	Inund	0,99	± 0,37	f	2,73	± 0,41	g	0,93	± 0,27	f

Los valores son las medias de 14 plantas ± el desvío estándar. Para cada fracción de biomasa (columnas), las medias sin ninguna letra en común son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

Tabla S.2.2. Efecto de 35 días de recuperación post 55 días de sumersión parcial (Inund) sobre distintas fracciones de biomasa (g de materia seca/planta) en plantas adultas de 5 accesiones (Acc) de *Lotus* spp. (Lt: *L. tenuis*; LtxLc: híbrido *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide; LcD: *L. corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide y Lj: *L. japonicus*).

Tratamientos		Hojas		Tallos		Raíces				
(Acc x Inund)		media	± DE	media	± DE	media	± DE			
Lt	Cont	4,94	± 1,03	b	19,45	± 2,46	a	9,18	± 2,54	b
	Inund	5,46	± 0,99	ab	15,19	± 2,55	b	5,78	± 1,49	c
LtxLc	Cont	5,55	± 1,23	ab	19,32	± 2,54	a	6,68	± 1,84	c
	Inund	4,93	± 0,66	b	13,60	± 3,11	b	5,08	± 2,33	c
LcD	Cont	4,96	± 2,68	b	9,29	± 1,33	cd	5,44	± 2,15	c
	Inund	2,04	± 0,60	c	6,94	± 1,95	de	1,48	± 0,33	d
LcT	Cont	6,85	± 3,05	a	16,09	± 2,65	b	13,83	± 4,24	a
	Inund	3,90	± 1,49	b	6,56	± 2,02	e	2,75	± 1,41	d
Lj	Cont	1,44	± 0,38	c	10,05	± 1,25	c	2,10	± 0,64	d
	Inund	0,86	± 0,27	c	2,81	± 0,73	f	0,96	± 0,32	d

Los valores son las medias de 10 plantas ± el desvío estándar. Para cada fracción de biomasa (columnas), las medias sin ninguna letra en común son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

Tabla S.2.3. Efecto de 55 días de sumersión parcial (Inund) sobre las tasas de crecimiento relativo en peso seco (TCR, $g\ g^{-1}\ día^{-1}$) de plantas adultas de 5 accesiones (Acc) de *Lotus* spp. (Lt: *L. tenuis*; LtxLc: híbrido *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide; LcD: *L. corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide y Lj: *L. japonicus*).

Tratamientos		TCR Hojas		TCR Tallos		TCR Raíces				
(Acc x Inund)		media	± DE	media	± DE	media	± DE			
Lt	Cont	0,022	± 0,004	bc	0,034	± 0,003	cd	0,033	± 0,006	b
	Inund	0,018	± 0,007	c	0,028	± 0,003	e	0,020	± 0,007	d
LtxLc	Cont	0,040	± 0,005	a	0,056	± 0,003	a	0,044	± 0,005	a
	Inund	0,025	± 0,008	b	0,043	± 0,007	b	0,028	± 0,006	bc
LcD	Cont	0,022	± 0,006	bc	0,037	± 0,004	c	0,025	± 0,006	cd
	Inund	0,003	± 0,011	e	0,027	± 0,005	e	0,004	± 0,014	e
LcT	Cont	0,019	± 0,003	c	0,028	± 0,004	e	0,032	± 0,006	b
	Inund	-0,012	± 0,013	f	0,016	± 0,003	f	-0,009	± 0,011	f
Lj	Cont	0,010	± 0,004	d	0,032	± 0,004	d	0,023	± 0,007	cd
	Inund	-0,012	± 0,008	f	0,013	± 0,003	f	0,004	± 0,005	e

Los valores son las medias de 14 plantas ± el desvío estándar. Para cada TCR (columnas), las medias sin ninguna letra en común son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

Tabla S.2.4. Efecto de 35 días de recuperación post 55 días de sumersión parcial (Inund) sobre las tasas de crecimiento relativo en peso seco (TCR, $g\ g^{-1}\ día^{-1}$) de plantas adultas de 5 accesiones (Acc) de *Lotus* spp. (Lt: *L. tenuis*; LtxLc: híbrido *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide; LcD: *L. corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide y Lj: *L. japonicus*).

Tratamientos		TCR Hojas		TCR Tallos		TCR Raíces*				
(Acc x Inund)		media	± DE	media	± DE	media	± DE			
Lt	Cont	-0,006	± 0,006	c	0,011	± 0,003	bc	0,001	± 0,008	b
	Inund	0,003	± 0,005	bc	0,014	± 0,005	b	0,007	± 0,007	b
LtxLc	Cont	-0,008	± 0,006	c	0,016	± 0,004	b	0,002	± 0,008	ab
	Inund	0,011	± 0,004	b	0,024	± 0,007	a	0,017	± 0,013	ab
LcD	Cont	-0,005	± 0,015	c	0,016	± 0,004	b	0,020	± 0,013	a
	Inund	-0,001	± 0,009	c	0,023	± 0,008	a	0,010	± 0,007	a
LcT	Cont	-0,004	± 0,011	c	0,016	± 0,005	b	0,002	± 0,009	ab
	Inund	0,023	± 0,013	a	0,010	± 0,009	bc	0,014	± 0,017	ab
Lj	Cont	-0,024	± 0,010	d	0,007	± 0,004	c	-0,007	± 0,009	c
	Inund	-0,005	± 0,008	c	0,000	± 0,008	d	-0,001	± 0,009	c

Los valores son las medias de 10 plantas ± el desvío estándar. Para cada TCR (columnas), las medias sin ninguna letra en común son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

* En la TCR de raíces no hubo interacción. La inundación no tuvo efecto y el factor accesión sí lo tuvo (se muestran las diferencias por accesión).

Tabla S.2.5. Efecto de 55 días de sumersión parcial (Inund) sobre diferentes parámetros morfológicos de plantas adultas de 5 accesiones (Acc) de *Lotus* spp. (Lt: *L. tenuis*; LtxLc: híbrido *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide; LcD: *L. corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide y Lj: *L. japonicus*).

Tratamientos		Tallos 1°		Tallos 2°		Longitud de tallos				
(Acc x Inund)		media	± DE	media	± DE	media	± DE			
Lt	Cont	59,21	± 15,43	a	37,71	± 24,07	b	77,54	± 11,09	b
	Inund	30,21	± 7,90	c	22,07	± 13,68	c	57,37	± 9,02	c
LtxLc	Cont	34,71	± 8,57	bc	52,93	± 21,04	a	88,16	± 12,68	a
	Inund	17,93	± 6,63	d	22,79	± 19,39	c	60,40	± 10,11	c
LcD	Cont	22,43	± 7,61	d	36,36	± 16,70	b	56,54	± 8,88	c
	Inund	21,79	± 5,01	d	12,50	± 6,28	cde	43,81	± 6,16	de
LcT	Cont	37,93	± 9,97	bc	18,71	± 11,03	cd	59,51	± 11,82	c
	Inund	20,57	± 6,32	d	5,57	± 5,09	e	38,53	± 5,78	ef
Lj	Cont	8,29	± 1,07	e	19,64	± 6,81	cd	46,60	± 2,94	de
	Inund	8,14	± 1,46	e	9,71	± 1,73	de	35,11	± 2,31	f

Los valores son las medias de 14 plantas ± el desvío estándar. Para cada parámetro (columnas), las medias sin ninguna letra en común son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

Tabla S.2.6. Efecto de 35 días de recuperación post 55 días de sumersión parcial (Inund) sobre diferentes parámetros morfológicos en plantas adultas de 5 accesiones (Acc) de *Lotus* spp. (Lt: *L. tenuis*; LtxLc: híbrido *L. tenuis* x *L. corniculatus* diploide; LcD: *L. corniculatus* diploide; LcT: *L. corniculatus* tetraploide y Lj: *L. japonicus*).

Tratamientos		Tallos 1°		Tallos 2°		Longitud de tallos*				
(Acc x Inund)		media	± DE	media	± DE	media	± DE			
Lt	Cont	63,70	± 17,7	a	79,1	± 23,45	bc	88,6	± 16,4	b
	Inund	32,50	± 5,2	bc	127,5	± 26,23	a	58,8	± 9,1	
LtxLc	Cont	48,00	± 31,4	b	84,7	± 22,79	b	113,3	± 16,8	a
	Inund	22,30	± 9,4	cde	87,1	± 21,64	b	91,7	± 20,0	
LcD	Cont	27,33	± 6,7	cd	61,3	± 6,66	cd	72,3	± 4,6	bc
	Inund	15,00	± 4,6	de	40,3	± 3,21	d	60,0	± 4,6	
LcT	Cont	43,20	± 11,0	b	45,5	± 15,02	d	71,3	± 12,8	c
	Inund	18,60	± 5,7	cde	45,3	± 17,45	d	46,8	± 5,1	
Lj	Cont	10,50	± 1,5	e	15,7	± 4,32	e	48,7	± 4,0	d
	Inund	7,60	± 1,5	e	9,8	± 2,35	e	34,5	± 3,3	

Los valores son las medias de 10 plantas ± el desvío estándar. Para cada parámetro (columnas), las medias sin ninguna letra en común son significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

* En la variable "longitud de los 5 tallos 1° más largos", no hubo interacción y los dos factores fueron significativos. La inundación disminuyó la variable y el en factor accesión son mostradas las diferencias con una letra por accesión.

Figuras suplementarias correspondientes al capítulo 3

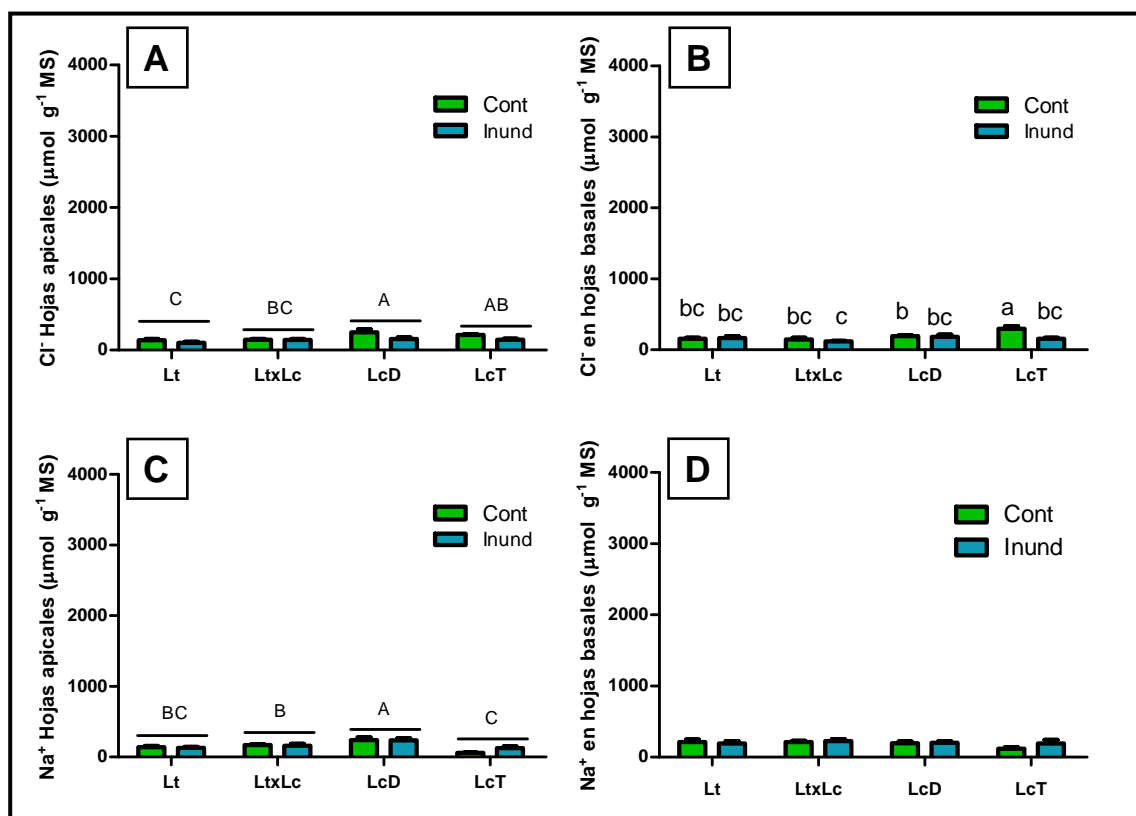


Figura S.3.1. Concentración de iones Na⁺ y Cl⁻ en hojas apicales y basales (en μmol por g de MS) de plantas de 4 accesiones del género *Lotus* sometidas a 21 días de tratamientos de sumersión parcial (Inund) y condición control (Cont). A y B: concentración del ion Cl⁻ en hojas apicales y basales respectivamente. C y D: concentración del ion Na⁺ en hojas apicales y basales respectivamente. Dentro de cada gráfico, las barras que no tienen ninguna letra en común, son significativamente diferentes (Prueba de Duncan, $p < 0,05$, $n=5$, $\pm\text{DE}$). En los gráficos A y C, la interacción del ANVA (entre accesión e inundación) no fue significativa y los efectos del factor accesión fueron significativos (las diferencias se muestran en letras mayúsculas). En D no hubo interacción ni efecto de los factores accesión e inundación. Lt: *Lotus tenuis*; LtxLc: híbrido interespecífico entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*; LcD: *L. corniculatus* diploide y LcT: *L. corniculatus* tetraploide.

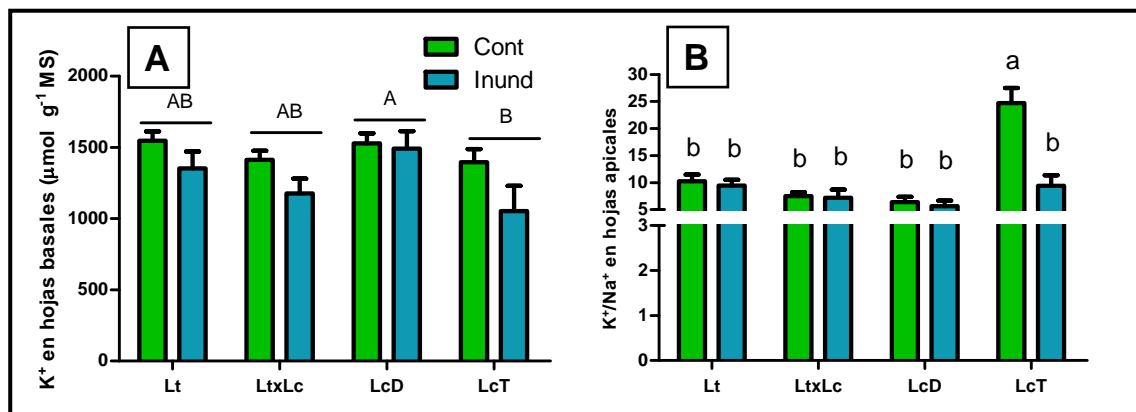


Figura S.3.2. Concentración de K⁺ en hojas basales (en μmol por g de MS) y relación molar K⁺/Na⁺ en hojas apicales de plantas de 4 accesiones del género *Lotus* sometidas a 21 días de tratamientos de sumersión parcial (Inund) y condición control (Cont). En A: no se detectó interacción entre accesión e inundación y las diferencias entre accesiones se muestran con letras mayúsculas. El factor inundación disminuyó la concentración de K⁺. En B: dentro de cada gráfico, las barras que no tienen ninguna letra en común, son significativamente diferentes (Prueba de Duncan, p<0,05, n=5, ±DE). Lt: *Lotus tenuis*; LtxLc: híbrido interespecífico entre *L. tenuis* y *L. corniculatus*; LcD: *L. corniculatus* diploide y LcT: *L. corniculatus* tetraploide.