Leguminosas forrajeras bajo inundación: análisis del crecimiento y mecanismos fisiológicos asociados a la tolerancia y recuperación del estrés por sumersión

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

Florencia Belén Buraschi Lic. en Ciencias Ambientales - Facultad de Agronomía UBA - 2019

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la Agricultura (IFEVA) - Facultad de Agronomía – UBA – CONICET





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

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis **Gustavo G. Striker** Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires) Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Co-director

Federico P.O. Mollard Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires) Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

> Consejero de Estudios Agustín A. Grimoldi Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires) M. Sc. (Universidad de Buenos Aires) Doctor en Ciencias Agrarias (Technische Universität München, Alemania)

JURADO DE TESIS

JURADO

Carlos Alberto Acuña Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional del Nordeste) M. Sc. (University of Florida) Doctor of Philosophy (University of Florida)

JURADO

Julián Mario Peña Castro

Licenciado Químico Farmacobiólogo (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México) M. Sc. (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México) Doctor en Biotecnología y Bioingeniería (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México)

JURADO

Osvaldo Ramón Vignolio

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Mar del Plata) Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Fecha de defensa de la tesis: 23 de junio de 2025

AGRADECIMIENTOS

Agradezco por todo lo que me acompañó en estos años, eso que no se ve pero que está detrás de cada escrito en esta tesis. Las palabras de afirmación de mi director Gustavo cuando no confiaba en mí, y que siempre entendió y me hizo saber que detrás de una becaria hay un ser humano, y de eso voy a estar eternamente agradecida. La alegría y el apoyo de mis papás y mis hermanos en todo lo que pudieron, aun cuando no comprendían del todo el tema pero que igualmente me escuchaban con atención y eso siempre me pareció divertido y me hacía sentir bien. Las distracciones de mis amigos cuando me sentía frustrada o las cosas no salían como esperaba. Me hacía darme cuenta lo necesario que a veces es frenar y disfrutar el presente, para después ver (y escribir) todo con mejor claridad. Y por último, agradezco las incursiones de mi gato Otoño en el teclado, quien llegó en el último año en que escribí esto, asegurándose de que nunca me sintiera sola.

DECLARACION

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 esta u otra institución.

Florencia B. Buraschi

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Buraschi, F. B., Mollard, F. P. O., Grimoldi, A. A. y Striker, G. G. 2020. Ecophysiological traits related to recovery from complete submergence in the model legume *Lotus japonicus*. Plants, 9: 538.

Buraschi, F. B., Mollard, F. P. O., Di Bella, C. E., Grimoldi, A. A. y Striker, G. G. 2024. Shaking off the blow: plant adjustments during submergence and post-stress growth in *Lotus* forage species. Functional Plant Biology, 51: FP23172.

Buraschi, F. B., Mollard, F. P. O., Cordon, G., Grimoldi, A. A. y Striker, G. G. 2024. Submergence of forage legumes: *Lotus* species show better tolerance than *Trifolium* and *Melilotus* species due to their superior recovery after stress. Functional Plant Biology, FP24206.

| INDICE | | vi |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| INDICE DI | E TABLAS | ix |
| INDICE DI | E FIGURAS | x |
| ABREVIA | ΓURAS | . xiv |
| RESUMEN | | xv |
| ABSTRAC | Γ | . xvi |
| CAPÍTULO I | | 1 |
| 1.1) Ante | cedentes | 2 |
| 1.1.1) | La inundación como factor de estrés vegetal | 2 |
| 1.1.2) | Leguminosas forrajeras. Producción bajo condiciones de estrés | 7 |
| 1.1.3) | Recuperación luego de la sumersión | . 12 |
| 1.2) Objetivos e hipótesis de trabajo | | . 15 |
| 1.2.1) | Objetivo general | . 15 |
| 1.2.2) | Objetivos particulares | . 15 |
| 1.3) Hipó | tesis | . 16 |
| 1.4) Orga | nización de la tesis | . 17 |
| CAPÍTULO II | | . 18 |
| 2.1) Intro | ducción | . 19 |
| 2.2) Mate | riales y métodos | . 22 |
| 2.2.1) N | Material vegetal y condiciones de crecimiento | . 22 |
| 2.2.2) I | Diseño experimental | . 23 |
| 2.2.3) V | Variables medidas | . 25 |
| 2.2.4) A | Análisis estadísticos | . 27 |
| 2.3) Resu | ltados | . 28 |
| 2.3.1) \$ | Supervivencia de especies a la sumersión completa a corto y largo plazo | . 28 |
| 2.3.2) A | Acumulación de biomasa luego de la sumersión y su recuperación | . 29 |
| 2.3.3) I especies de | El análisis de componentes principales separa a las especies de <i>Lotus</i> de las e <i>Trifolium</i> en su recuperación del estrés por sumersión | . 31 |
| 2.3.4) I mejor recu | Las respuestas fisiológicas foliares después de la desumersión indican una peración en especies de <i>Lotus</i> en comparación con especies de <i>Trifolium</i> | . 34 |
| 2.4) Discu | 2.4) Discusión | |
| 2.4.1) I forrajeras | a supervivencia bajo sumersión completa varía entre las leguminosas | . 40 |

INDICE

| 2.4.2) Recuperación superior tras la sumersión en <i>Lotus</i> spp. en comparación <i>Trifolium</i> spp | con 40 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.4.3) Respuestas fisiológicas foliares durante la recuperación explican la mejo recuperación de <i>Lotus</i> spp. | or 42 |
| 2.4.4) La deficiencia de nitrógeno y su impacto en la fluorescencia de clorofila fotosíntesis | y 43 |
| 2.5) Conclusión | 44 |
| CAPÍTULO III | 45 |
| 3.1) Introducción | 46 |
| 3.2) Materiales y métodos | 49 |
| 3.2.1) Material vegetal y condiciones de crecimiento | 49 |
| 3.2.2) Diseño experimental | 50 |
| 3.2.3) Variables medidas | 51 |
| 3.2.4) Análisis estadísticos | 52 |
| 3.3) Resultados | 54 |
| | le <i>Lotus</i> |
| 3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta o <i>tenuis y L. corniculatus</i> bajo tratamiento de sumersión | |
| 3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta o tenuis y L. corniculatus bajo tratamiento de sumersión | rsión 56 |
| 3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta o tenuis y L. corniculatus bajo tratamiento de sumersión | ersión 56 omasa |
| 3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta o <i>tenuis</i> y <i>L. corniculatus</i> bajo tratamiento de sumersión | n 54 |
| 3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta o <i>tenuis</i> y <i>L. corniculatus</i> bajo tratamiento de sumersión | n 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 10 |
| 3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta o <i>tenuis</i> y <i>L. corniculatus</i> bajo tratamiento de sumersión | n 1000 |
| 3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta o <i>tenuis</i> y <i>L. corniculatus</i> bajo tratamiento de sumersión | ersión 56 omasa n 60 63 te el 63 |
| 3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta o <i>tenuis</i> y <i>L. corniculatus</i> bajo tratamiento de sumersión | ersión 56 omasa n 60 63 te el 63 de las 65 |
| 3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta o tenuis y L. corniculatus bajo tratamiento de sumersión | ersión 56 omasa n 60 63 te el 63 de las 65 as 67 |
| 3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta o tenuis y L. corniculatus bajo tratamiento de sumersión | ersión 56 omasa n |
| 3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta o tenuis y L. corniculatus bajo tratamiento de sumersión 3.3.2) Cambios en la asignación de biomasa debido a los tratamientos de sume 3.3.3) Correlación entre la recuperación de la sumersión y la asignación de bio 58 3.3.4) Evaluación de las compensaciones en la tasa intrínseca de crecimiento e condiciones de control y sumersión 3.3.5) Variación entre las especies y las accesiones de Lotus en respuesta a la sumersión parcial y completa 3.4) Discusión 3.4.1) Comportamientos contrastantes de Lotus tenuis y L. corniculatus duramperiodo de recuperación 3.4.2) Cambios en la asignación durante la sumersión afectan la recuperación plantas 3.4.3) Las accesiones tolerantes de Lotus a la sumersión completa difieren de la tolerantes a la sumersión parcial 3.5) Conclusión | ersión 56 omasa n |
| 3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta o tenuis y L. corniculatus bajo tratamiento de sumersión | rrsión 56 omasa n |
| 3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta o tenuis y L. corniculatus bajo tratamiento de sumersión 3.3.2) Cambios en la asignación de biomasa debido a los tratamientos de sume 3.3.3) Correlación entre la recuperación de la sumersión y la asignación de bio 58 3.3.4) Evaluación de las compensaciones en la tasa intrínseca de crecimiento e condiciones de control y sumersión 3.3.5) Variación entre las especies y las accesiones de <i>Lotus</i> en respuesta a la sumersión parcial y completa. 3.4.1) Comportamientos contrastantes de <i>Lotus tenuis</i> y <i>L. corniculatus</i> durant periodo de recuperación 3.4.2) Cambios en la asignación durante la sumersión afectan la recuperación plantas 3.5) Conclusión 3.5) Conclusión 2.4.1) Introducción. 4.2) Materiales y métodos. | rsión 56 omasa n 60 63 te el 63 de las 65 as 65 as 67 68 69 70 |
| 3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta o tenuis y L. corniculatus bajo tratamiento de sumersión 3.3.2) Cambios en la asignación de biomasa debido a los tratamientos de sume 3.3.3) Correlación entre la recuperación de la sumersión y la asignación de bio 58 3.3.4) Evaluación de las compensaciones en la tasa intrínseca de crecimiento e condiciones de control y sumersión 3.3.5) Variación entre las especies y las accesiones de <i>Lotus</i> en respuesta a la sumersión parcial y completa. 3.4.1) Comportamientos contrastantes de <i>Lotus tenuis</i> y <i>L. corniculatus</i> duram periodo de recuperación 3.4.2) Cambios en la asignación durante la sumersión afectan la recuperación plantas 3.4.3) Las accesiones tolerantes de <i>Lotus</i> a la sumersión completa difieren de la tolerantes a la sumersión parcial. 3.5) Conclusión 4.1) Introducción. 4.2) Materiales y métodos. 4.2.1) Material vegetal y condiciones de crecimiento | rsión 56 omasa n |
| 3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta o tenuis y L. corniculatus bajo tratamiento de sumersión | rsión 56 omasa n 60 63 te el 63 te el 63 de las 65 as 67 67 69 70 72 72 |

| 4.2.4) Análisis estadístico | . 77 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3) Resultados | . 77 |
| 4.3.1) Crecimiento de <i>Lotus japonicus</i> durante la sumersión completa | . 77 |
| 4.3.2) Recuperación de <i>Lotus japonicus</i> a la sumersión completa | . 79 |
| 4.3.3) Variables fisiológicas de la hoja relacionadas con la recuperación de <i>Lotus japonicus</i> | . 83 |
| 4.3.4) Correlaciones entre los rasgos que contribuyen en la recuperación de <i>Lotus japonicus</i> luego de la sumersión completa | . 88 |
| 4.4) Discusión | . 90 |
| 4.5) Conclusión | . 94 |
| CAPÍTULO V | . 94 |
| 5.1) Contraste de las hipótesis | . 95 |
| 5.2) Esquema integrador de la evaluación de tolerancia a la sumersión de las especies leguminosas forrajeras | ; . 97 |
| 5.3) Implicancias de la tesis para futuras investigaciones | 100 |
| 5.3.1) Aspectos fisiológicos potenciales para abordar frente a la sumersión | 101 |
| BIBLIOGRAFÍA | 108 |
| APENDICE | 130 |

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Especies de leguminosas forrajeras seleccionadas para el experimento. Para cada especie, se presentan el hábito de crecimiento, tipo de suelo, textura, pH, rendimiento de biomasa seca (rango o potencial), áreas actuales de distribución/uso y datos disponibles sobre la tolerancia al estrés abiótico.

Tabla 2.2 Porcentaje de supervivencia (%) de ocho especies de leguminosas, ordenadas de mayor a menor supervivencia bajo los tratamientos de Control, sumersión de 5 días y sumersión de 10 días, evaluadas al final del experimento (28 días después de la desumersión).

Tabla 2.3 Valores F del ANOVA de dos vías (factores: 'especie' y 'tratamiento') para la biomasa total como respuestas a los tratamientos de las 6 especies de leguminosas forrajeras. ^A***: $P \le 0,001$; **: $P \le 0,005$; *: $P \le 0,05$. Los análisis se realizaron por separado en los datos al final del periodo de estrés y del periodo de recuperación.

Tabla 2.4 Valores F del ANOVA de tres vías (factores: 'especie', 'tratamiento' y 'tiempo') para la conductancia estomática, Fv/Fm, ABS/RC y el verdor de las hojas de las plantas de las 6 especies de leguminosas forrajeras en recuperación tras los tratamientos de sumersión^A. ***: $P \le 0,001$; **: $P \le 0,01$; *: $P \le 0,05$.

Tabla 4.1 Coeficientes de correlación de Pearson para los rasgos morfofisiológicos medidos durante la fase de recuperación en 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20) sometidos a condiciones control (por encima de la diagonal) durante tres semanas, o condiciones de sumersión completa durante una semana (debajo de la diagonal) y se dejó crecer luego de la desumersión por otras 2 semanas. Solo se mostraron correlaciones para los rasgos morfo-fisiológicos que se correlacionaron significativamente con la TCR durante la recuperación de la sumersión (datos de las Figuras 3–7). Las abreviaturas son V/R (relación de biomasa seca de vástago y raíz en la sumersión), CHR (contenido hídrico relativo foliar) g_s (conductancia estomática), Fv/Fm (fluorescencia de la clorofila en hojas adaptadas a la oscuridad). Diferencias significativas: *, p < 0,05; **, p < 0,001; ns, p > 0,05.

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Biomasa total (g/planta) de tres especies de *Lotus* y tres especies de *Trifolium* después de la desumersión (a) y posterior recuperación de 28 días (b). Las barras grises representan el tratamiento de control (Control), las barras violetas representan la sumersión de 5 días (5-d-sum.), y las barras verdes representan la sumersión de 10 días (10d- sum.). Letras diferentes denotan diferencias significativas (p<0,05) entre tratamientos dentro de cada especie

Figura 2.2 Gráfico de Análisis de Componentes Principales (ACP) que muestra las variables y especies de *Lotus* y *Trifolium* bajo tratamientos de sumersión completa durante el periodo de estrés (a) y tras un periodo de recuperación de 28 días (b). Los análisis se generaron utilizando siete variables a través de la tasa de crecimiento relativo (TCR) de la biomasa total (BTotal), biomasa aérea (BAérea, que incluye hojas, tallos y estolones para *T. repens*), biomasa subterránea (BSubterránea, que incluye coronas y raíces), hojas (Hojas), tallos (Tallos), coronas (Coronas) y raíces (Raíces). Las especies de *Lotus* están representadas por triángulos: *Lotus tenuis* (LT), *Lotus corniculatus* (LC) y *Lotus japonicus* (LJ). Las especies de *Trifolium* están representadas por cuadrados: *Trifolium repens* (TR), *Trifolium fragiferum* (TF) y *Trifolium pratense* (TP). Los diferentes colores representan los tratamientos: control en gris, sumersión de 5 días en violeta y sumersión de 10 días en verde. El porcentaje de variabilidad explicada se indica en cada eje.

Figura 2.3 Conductancia estomática en hojas jóvenes completamente expandidas de especies de *Lotus* (paneles superiores: (a) *L. tenuis*, (b) *L. corniculatus* y (c) *L. japonicus*) y especies de *Trifolium* (paneles inferiores: (d) *T. repens*, (e) *T. fragiferum* y (f) *T. pratense*) durante el periodo de recuperación tras 5 y 10 días de sumersión completa. Nótese que los valores se presentan en relación con los controles, establecidos en 100%, para facilitar la observación de las respuestas a los tratamientos. Los símbolos/líneas violetas representan la sumersión de 5 días (5-d sumersión), y los símbolos/líneas verdes representan la sumersión de 10 días (10-d sumersión). Las barras dentro de las subfiguras representan los valores porcentuales de DSM en relación con el control, siendo 36% para la interacción especie * tratamiento y 33% para la interacción tratamiento * tiempo. La interacción entre estos factores no fue significativa (ver Tabla 2.4).

Figura 2.4 Verdor foliar en hojas jóvenes/apicales de especies de *Lotus* (paneles superiores: (a) *L. tenuis*, (b) *L. corniculatus* y (c) *L. japonicus*) y especies de *Trifolium* (paneles inferiores: (d) *T. repens*, (e) *T. fragiferum* y (f) *T. pratense*) durante el periodo de recuperación tras 5 y 10 días de sumersión completa. Nótese que los valores se presentan en relación con los controles, establecidos en 100%, para facilitar la observación de las respuestas a los tratamientos. Los símbolos/líneas violetas representan la sumersión de 5 días (5-d sumersión), y los símbolos/líneas verdes representan la sumersión de 10 días (10-d sumersión). Las barras dentro de las subfiguras representan los valores porcentuales de DMS en relación con el control, siendo 10% para la interacción especie * tratamiento y 15% para la interacción especie * tiempo. La interacción entre estos factores no fue significativa (ver Tabla 2.4).

Figura 2.5 Rendimiento cuántico máximo de PSII (Fv/Fm) en hojas jóvenes completamente expandidas de especies de *Lotus* (paneles superiores: (a) *L. tenuis*, (b) *L. corniculatus* y (c) *L. japonicus*) y especies de *Trifolium* (paneles inferiores: (d) *T. repens*, (e) *T. fragiferum* y (f) *T. pratense*) durante el periodo de recuperación tras 5 y 10 días de sumersión completa. Los símbolos/líneas grises representan el tratamiento de control, los símbolos/líneas violetas representan la sumersión de 5 días (5-d sumersión), y los símbolos/líneas verdes representan la sumersión de 10 días (10-d sumersión). Las barras dentro de las subfiguras representan los valores de DMS (0,125) para la interacción especie * tratamiento * tiempo (ver Tabla 2.4).

Figura 2.6 Flujo de absorción de clorofilas antena por centro de reacción (ABS/RC) en hojas jóvenes completamente expandidas de especies de *Lotus* (paneles superiores: (a) *L. tenuis*, (b) *L. corniculatus* y (c) *L. japonicus*) y especies de *Trifolium* (paneles inferiores: (d) *T. repens*, (e) *T. fragiferum* y (f) *T. pratense*) durante el periodo de recuperación tras 5 y 10 días de sumersión completa. Los símbolos/líneas grises representan el tratamiento de control, los símbolos/líneas violetas representan la sumersión de 5 días (5-d sumersión), y los símbolos/líneas verdes representan la sumersión de 10 días (10-d sumersión). Las barras dentro de las subfiguras representan los valores de DMS (2,137) para la interacción especie * tratamiento * tiempo (ver Tabla 2.4).

Figura 3.1. Gráfico de Análisis de Componentes Principales (ACP) que representaron variables y accesiones de *Lotus tenuis* y *L. corniculatus* bajo tratamientos de sumersión parcial (a, b) y sumersión completa (c, d) durante el periodo de estrés (a, c) y el periodo de recuperación (b, d). Los gráficos fueron generados utilizando 9 variables y 10 accesiones. Las variables analizadas incluyeron la tasa de crecimiento relativo (TCR) de la biomasa total (BT), hojas (Hojas), tallos (Tallos) y raíces (Raíces), así como la variación en el número de tallos durante los periodos (Δ N Tallos), el número de tallos por planta (N Tallos), la relación vástago/raíz (V/R), la relación hoja:tallo (Hoja/Tallo) y la altura de la planta (H). Las accesiones de *L. tenuis* fueron indicadas por triángulos violetas: Aguape (A), Larrañaga (L), Chaja (C), Pampa INTA (P) y Esmeralda (E). Las accesiones de *Lotus corniculatus* fueron representadas por círculos verdes: San Gabriel (SG), Nilo (N), Inia Draco (IN), Kontac (K) y Toro (T). El porcentaje de variabilidad explicada se indica en cada eje.

Figura 3.2. Fracción de biomasa de hojas (a, b), fracción de biomasa de tallos (c, d) y fracción de biomasa de raíces (e, f) durante los períodos de estrés y recuperación bajo condiciones de control (C), sumersión parcial (SP) y sumersión completa (SC) en *Lotus tenuis* en color violeta (paneles izquierdos) y *L. corniculatus* en color verde (paneles derechos). Las mediciones se presentaron mediante diagramas de cajas, donde cada caja representó el 50% de los datos. La mediana se indicó con una línea horizontal dentro de cada caja, la media se denotó con '+', y las barras que se extienden desde cada caja representaron los percentiles 10 y 90. Las barras de error representaron valores por debajo del percentil 25 y aquellos que superaron el percentil 75 de los datos. Los datos de las accesiones (10 repeticiones para cada una de las 5 accesiones, n=50) se obtuvieron para cada tratamiento dentro de la especie. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey (p < 0,05) tanto para el período de estrés (letras minúsculas) como para el período de recuperación (letras mayúsculas) dentro de cada especie.

Figura 3.3. La tasa de crecimiento relativo (TCR) de plantas enteras de accesiones de *Lotus tenuis* (paneles izquierdos) y *L. corniculatus* (paneles derechos) durante el período de recuperación después de 11 días de sumersión completa se mostraron en función de la fracción de biomasa de hojas (a, b), la fracción de biomasa de tallos (c, d), la fracción de biomasa de raíces (e, f) y la relación vástago/raíz (V/R) (g, h) en la desumersión (es decir, al final del período de estrés). Las letras indican las siglas de las accesiones de *L. tenuis* en triángulos violetas: Aguape (A), Larrañaga (L), Chaja (C), Pampa INTA (P) y Esmeralda (E), mientras que para *L. corniculatus* se indican con círculos verdes: San Gabriel (SG), Nilo (N), Inia Draco (IN), Kontac (K) y Toro (T). Los parámetros de las regresiones se presentan dentro de cada gráfico.

Figura 3.4. Tasa de crecimiento relativo (TCR) de plantas enteras de accesiones de *Lotus tenuis* y *L. corniculatus* durante (a, c) o recuperándose de (b, d) la sumersión completa (SC), graficada en función de la TCR de las mismas accesiones durante (o recuperándose de) la sumersión parcial (SP). Las accesiones de *L. tenuis* están representadas por A (Aguape), L (Larrañaga), C (Chaja), P (Pampa INTA) y E (Esmeralda), indicadas por triángulos violetas, mientras que las accesiones de *L. corniculatus* están representadas por las siglas SG (San Gabriel), N (Nilo), IN (Inia Draco), K

(Kontac) y T (Toro), indicadas por círculos verdes. Las líneas verticales discontinuas indican la TCR promedio de las plantas bajo SP, mientras que las líneas horizontales discontinuas representan la TCR promedio de las plantas bajo SC, ya sea durante el estrés o durante la recuperación. Los cuadrantes conformados por estas líneas permitieron observar accesiones que muestran respuestas de TCR ya sea por encima o por debajo del promedio de la especie bajo estas condiciones.

Figura 4.1. (a) Tasa de crecimiento relativo de la planta (TCR, g g⁻¹ d⁻¹) de 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20) sometidos a condiciones control y sumersión en agua clara durante una semana. (b) Relación de biomasa seca de vástago/raíz (V/R) después de la primera semana del experimento, tanto en condiciones control como después de la desumersión. La diferencia mínima significativa (DMS) para la interacción genotipo x tratamiento se muestra en (a) (DMS TCR = 0,065) y (b) (DSM V/R = 3,7). Los valores son medias +/- errores estándar de 6–8 repeticiones.

Figura 4.2. Tasa de crecimiento relativo de la planta (TCR) durante la recuperación "temprana" y "tardía" vs. TCR durante la primera semana del experimento para una semana del tratamiento de sumersión (a, b) y del control (c, d) de 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20). La primera semana después de la desumersión se utilizó para explorar la relación entre estas variables en una fase de "recuperación temprana" (a, c) y la segunda semana después de la desumersión en una fase de "recuperación tardía" (b, d). Los valores son medias +/- errores estándar de 6 a 8 repeticiones.

Figura 4.3. Tasa de crecimiento relativo de la planta (TCR) durante la recuperación "temprana" y "tardía" vs. la relación de biomasa seca de vástago/raíz (V/R) al final de la primera semana del experimento durante una semana en tratamientos de sumersión (a, b) y control (c, d) de 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20). La primera semana después de la de-sumersión se utilizó para explorar la relación entre estas variables en una fase de "recuperación temprana" (a, c) y la segunda semana en una fase de "recuperación tardía" (b, d). El genotipo MG20 se lo consideró un valor atípico y no se incluyó en los parámetros de regresión mostrados en (a) y (b); Sin embargo, si se incluyera, los parámetros hubieran sido r² = 0,34, F_{1,10} = 5,33, y p = 0,043 y r² = 0,63, F_{1,10} = 17,50, y p = 0,0019, respectivamente. Los valores son medias +/- errores estándar de 6 a 8 repeticiones.

Figura 4.4. Tasa de crecimiento relativo de la planta (TCR) durante la recuperación 'temprana' y 'tardía' vs. el contenido relativo de agua (CHR, %) en las hojas superiores completamente expandidas en los días 2, 7, 10 y 14 después de la desumersión para 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20). La primera semana después de la desumersión se utilizó para explorar la relación entre estas variables en una fase de "recuperación temprana" (a, b) y la segunda semana en una fase de "recuperación tardía" (c, d). Los valores son medias +/- errores estándar (n= 6–8 para TCR y n= 5 para CHR de la hoja). Los valores del CHR de la hoja correspondientes al tratamiento control oscilaron entre 89,2% y 92,4% (todos los datos para cada genotipo y fechas de medición están disponibles en la Tabla S4.2).

Figura 4.5. Tasa de crecimiento relativo de la planta (TCR) durante la recuperación 'temprana' y 'tardía' vs. la conductancia estomática (g_s , mmol m⁻² s⁻¹) en las hojas superiores completamente expandidas en los días 2, 7, 10, y 14 después de la desumersión para 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20). La primera semana después de la desumersión se utilizó para explorar la relación entre estas variables en una fase de "recuperación temprana" (a, b) y la segunda semana en una fase de "recuperación tardía" (c, d). Los

valores son medias +/- errores estándar (n= 6–8 para TCR y n= 5 para g_s). Los valores de conductancia estomática correspondientes al tratamiento control oscilaron entre 187,2 y 208,8 mmol m⁻² s⁻¹ (todos los datos para cada genotipo y fechas de medición están disponibles en la Tabla S4.3).

Figura 4.6. Tasa de crecimiento relativo de la planta (TCR) durante la recuperación 'temprana' y 'tardía' vs. la fluorescencia de la clorofila en las hojas superiores completamente expandidas adaptadas a la oscuridad (Fv/Fm) a los días 2, 7 y 11 después de la desumersión para 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20). La primera semana después de la desumersión se utilizó para explorar la relación entre estas variables en una fase de "recuperación temprana" (a, b) y la segunda semana en una fase de "recuperación temprana" (a, b) y la segunda semana en una fase de "recuperación tardía" (c). Los valores son medias +/- errores estándar (n= 6–8 para TCR y n= 5 para Fv/Fm). Los valores de Fv/Fm correspondientes al tratamiento control oscilaron entre 0,803 y 0,816 (todos los datos para cada genotipo y fechas de medición están disponibles en la Tabla S4.4).

Figura 4.7. Tasa de crecimiento relativo de la planta (TCR) durante la recuperación 'temprana' y 'tardía' vs. el verdor (unidades SPAD) de hojas basales y apicales completamente expandidas en los días 2, 7, 10 y 14 después de la desumersión para 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20). La primera semana después de la desumersión se utilizó para explorar la relación entre estas variables en una fase de "recuperación temprana" (a, b) y la segunda semana en una fase de "recuperación tardía" (c, d). Los valores son medias +/- errores estándar (n= 6–8 para TCR y n= 5 para el verdor). Los valores del verdor de la hoja correspondientes al tratamiento control oscilaron entre 33,6 y 37,6 unidades SPAD para hojas basales, y 41,0 y 43,4 unidades SPAD para hojas apicales jóvenes completamente expandidas (todos los datos para cada genotipo y fechas de medición están disponibles en la Tabla S4.5).

ABREVIATURAS

ACP: Análisis de Componentes Principales

ABS: Flujo de energía absorbida.

RC: Centros de reacción de clorofila

ABS/RC: Flujo de absorción (de clorofilas de antena) por centro de reacción (RC) (también es una medida del tamaño aparente de la antena del fotosistema II).

F0: Fluorescencia mínima, cuando todos los centros de reacción (RCs) están abiertos.

FM: Fluorescencia máxima, cuando todos los centros de reacción (RCs) están cerrados.

 $FV \equiv (FM - F0)$: Fluorescencia variable máxima.

TCR: Tasa de crecimiento relativo.

V/R: Vástago sobre raíz

N Tallos: Numero de Tallos

Δ N Tallos: Variación del número de tallos en el tiempo.

H: altura de tallos.

SP: Sumersión parcial

SC: Sumersión completa

RESUMEN

Leguminosas forrajeras bajo inundación: análisis del crecimiento y mecanismos fisiológicos asociados a la tolerancia y recuperación del estrés por sumersión

El aumento en la frecuencia e intensidad de las inundaciones debido al cambio climático plantea un desafio para los sistemas pastoriles inundables, donde las leguminosas forrajeras son una fuente esencial de proteína en la dieta animal. Sin embargo, aún se conoce poco sobre los mecanismos de tolerancia y recuperación de estas especies frente a inundaciones severas. Los objetivos de esta tesis fueron: (i) evaluar la tolerancia interespecífica de leguminosas forrajeras (Lotus spp., Trifolium spp., Melilotus) expuestas a sumersión completa de corta y larga duración, (ii) analizar la variación intraespecífica en accesiones de Lotus tenuis y L. corniculatus ante sumersión parcial y completa, y su recuperación posterior, y (iii) estudiar la recuperación de 10 líneas recombinantes de Lotus japonicus con diferentes relaciones vástago/raíz, caracterizando parámetros fisiológicos como relaciones hídricas, verdor foliar, conductancia estomática y daño fotosintético (fluorescencia). En el experimento asociado al objetivo (i) se destacó Lotus, principalmente L. tenuis, por su mayor tolerancia y capacidad de recuperación, evidenciada en una mejor biomasa aérea, conductancia estomática y verdor foliar, en comparación con Trifolium y Melilotus. En el segundo experimento asociado al objetivo (ii) accesiones de L. tenuis mostraron una recuperación superior tras la sumersión completa, asociada a mayor biomasa foliar y menor asignación de biomasa a las raíces, mientras que L. corniculatus respondió mejor a la sumersión parcial, lo que sugiere diferentes estrategias adaptativas frente al estrés hídrico. Finalmente, el tercer experimento asociado al objetivo (iii) demostró que las líneas recombinantes de L. japonicus con una menor relación vástago/raíz se recuperaron más rápidamente en términos de estado hídrico, conductancia estomática y verdor foliar, mientras que aquellas con mayor relación vástago/raíz priorizaron el crecimiento aéreo, lo que afectó su recuperación posterior. En conjunto, estos resultados identificaron diferencias clave en la tolerancia y recuperación de leguminosas forrajeras ante inundaciones, destacando a L. tenuis como la especie más prometedora para ambientes inundables. Estos hallazgos proporcionan información valiosa para el mejoramiento genético y manejo de estas especies, donde variables como la relación biomasa aérea/raíz, la conductancia estomática, la fluorescencia y el verdor foliar son fundamentales para optimizar la recuperación post-inundación y reanudar eficazmente la fotosíntesis.

<u>Palabras clave:</u> leguminosas forrajeras, sumersión completa, tolerancia, recuperación postestrés, *Lotus*, *Trifolium*, *Melilotus*, verdor foliar, fluorescencia, conductancia estomática, relación vástago/raíz.

ABSTRACT

Forage legumes under flooding: growth analysis and physiological mechanisms associated with tolerance and recovery from submergence stress

The increase in the frequency and intensity of floods due to climate change poses a challenge for flood-prone pastoral systems, where forage legumes are an essential source of protein in animal diets. However, the mechanisms of tolerance and recovery of these species under severe flooding conditions are still poorly understood. The objectives of this thesis were: (i) to assess the interspecific tolerance of forage legumes (Lotus spp., Trifolium spp., Melilotus) exposed to complete submergence for short and long durations, (ii) to analyze intraspecific variation in accessions of Lotus tenuis and L. corniculatus under partial and complete submergence and their subsequent recovery, and (iii) to study the recovery of 10 recombinant inbred lines (RILs) of *Lotus japonicus* with different shoot/root ratios, characterizing physiological parameters such as water relations, leaf greenness, stomatal conductance, and photosynthetic damage (fluorescence). In the experiment associated with objective (i) Lotus, particularly L. tenuis, stood out for its higher tolerance and recovery capacity, as evidenced by better shoot biomass, stomatal conductance, and leaf greenness compared to Trifolium and Melilotus. In the second experiment associated with objective (ii), L. tenuis accessions showed superior recovery after complete submergence, associated with higher foliar biomass and lower biomass allocation to the roots, while L. corniculatus performed better under partial submergence, suggesting different adaptive strategies to water stress. Finally, the third experiment associated with objective (iii) demonstrated that RILs of L. japonicus with a lower shoot/root ratio recovered more quickly in terms of water status, stomatal conductance, and leaf greenness, while those with a higher shoot/root ratio prioritized shoot growth during submergence, which affected their later recovery. Together, these results identified key differences in the tolerance and recovery of forage legumes under flooding, highlighting L. *tenuis* as the most promising species for flood-prone environments. These findings provide valuable insights for the genetic improvement and management of these species, where variables such as the shoot/root biomass ratio, stomatal conductance, fluorescence, and leaf greenness are crucial for optimizing post-flood recovery and efficiently resuming photosynthesis.

<u>Keywords:</u> forage legumes, complete submergence, tolerance, post-stress recovery, *Lotus*, *Trifolium*, *Melilotus*, leaf greenness, fluorescence, stomatal conductance, shoot/root ratio.

Introducción general

1.1) Antecedentes

1.1.1) La inundación como factor de estrés vegetal

La ocurrencia de inundaciones de áreas agrícolas está registrando una tendencia mundial en aumento. Se prevé que los eventos climáticos extremos, como sequías e inundaciones, serán más frecuentes y aumentarán en intensidad y duración debido al cambio climático global (IPCC 2014; Kundzewicz et al. 2019). Esto podría elevar los niveles de agua freática y desencadenar inundaciones repentinas (Hirabayashi et al. 2013; Harrison et al. 2016). Además, la intensificación en el uso de la tierra, sumada al cambio climático, ha desplazado la ganadería hacia zonas marginales no adecuadas para la agricultura intensiva (Rebollo y Gómez-Sal 2003), ya sea por restricciones climáticas o edáficas, como las que imponen las inundaciones (Knapp et al. 2008; Joyce et al. 2016). De hecho, se ha demostrado que la expansión agrícola ha provocado un aumento significativo en los niveles de las napas freáticas, lo que incrementa la probabilidad de que se produzcan inundaciones más intensas y frecuentes (García et al. 2018). Estas condiciones impactan en la producción y seguridad alimentaria mundial debido al exceso de agua en el suelo (Harrison et al. 2014).

En general, las pasturas y pastizales naturales son el principal sustento forrajero de los herbívoros domésticos (Watkinson y Ormerod 2001), con la ganadería vacuna como su principal actividad económica (Henwood 2010). En este contexto, se está generando una situación de potencial degradación en estos ecosistemas debido al aumento de la presión del pastoreo y la carga animal. Estos ambientes son cruciales tanto para la conservación de la biodiversidad como para la producción, ya que proporcionan una gran cantidad de servicios ecosistémicos esenciales para la población humana (Lemaire et al. 2011). En Sudamérica, los pastizales de la denominada 'Pampa Deprimida' comprenden una vasta área de 90 mil km², propensa a sufrir inundaciones de diversa intensidad, duración y extensión (Sierra y Montecinos 1990), debido a la combinación de altas precipitaciones, una topografía extremadamente plana y la presencia de horizontes subsuperficiales arcillosos y alcalinos con baja permeabilidad y conductividad hidráulica (Taboada et al. 2009; Di Bella et al. 2016).

Las inundaciones en la Pampa Deprimida presentan una alta variabilidad espacial y temporal, con eventos que pueden durar desde unos pocos días hasta más de un mes, según la posición topográfica y las condiciones meteorológicas del año (Iriondo 1990; Di Bella et

al. 2016). Si bien los anegamientos prolongados son frecuentes en zonas bajas, los eventos de sumersión suelen ser de mucha menor duración. En ecosistemas agrícolas como los arrozales, se ha definido que la sumersión completa de corta duración es aquella que dura hasta aproximadamente 5-7 días, mientras que la sumersión prolongada supera este umbral (hasta 14 días; Colmer y Voesenek 2009 (véase Tabla 3 del artículo original); Striker 2012a (véase Fig. 3 del artículo citado); Ismail 2018). Esta clasificación resulta relevante para comprender distintos escenarios en que las especies vegetales enfrentan el exceso hídrico, e interpretar las respuestas fisiológicas y de crecimiento de las plantas frente a situaciones breves o prolongadas de estrés por inundación. En este contexto, y al igual que en otros pastizales del mundo, los principales factores de perturbación pueden generar cambios en la estructura y funcionamiento de la vegetación son el pastoreo vacuno y las inundaciones (Sala et al. 1986, Insausti et al. 1999; Camarao et al. 2004; Altesor et al. 2005; Striker et al. 2011a).

Se pueden identificar diferentes situaciones de inundación que consideran no solo la frecuencia, duración y extensión, sino también la altura del nivel del agua (Sasidharan et al. 2017). En primer lugar, puede ocurrir el anegamiento, donde el agua satura completamente los poros del suelo, pudiendo o no haber una capa muy fina (≤ 1 cm) de agua sobre la superficie, afectando únicamente las raíces de las plantas (Striker 2012a). Si la altura del agua aumenta, es posible que no solo las raíces queden sumergidas, sino también una porción de la parte aérea de las plantas (por ejemplo, tallos y hojas), lo que se conoce como sumersión parcial. Finalmente, si el agua de inundación es lo suficientemente profunda como para cubrir toda la planta, incluyendo vástagos y raíces, la literatura se refiere a esto como sumersión completa (Bailey-Serres et al. 2012; Striker 2012a). Si la especie vegetal no posee mecanismos adaptativos para tolerar estos tipos de eventos, su capacidad para seguir capturando oxígeno atmosférico, absorber agua y continuar el proceso de fotosíntesis se verá reducida (Bailey-Serres y Voesenek 2008), ya que los gases como el O₂, CO₂ y el etileno difunden mucho más lentamente en agua de inundación en comparación con el aire atmosférico (hasta 10⁴ veces más lento) (Ponnamperuma 1984). Como resultado, el nivel de O₂ celular podría disminuir tanto que limitaría la respiración aeróbica, y la energía solo podría obtenerse a través de vías fermentativas (muy ineficientes en la producción de ATP), lo que genera una situación estresante conocida como 'crisis energética' para las plantas (Gibbs y Greenway 2003).

En el suelo, la falta de O₂ conduce a una disminución del potencial redox, a la desnitrificación y a la acumulación de sustancias potencialmente tóxicas generadas por el metabolismo anaeróbico de bacterias (Ponnamperuma 1984; Koch y Mendelssohn 1989; Kozlowski 1997; Pezeshki 2001; Bailey-Serres y Voesenek 2008). Estos cambios en el suelo desencadenan respuestas de aclimatación en las plantas ante la nueva situación. A corto plazo, la fotosíntesis disminuye debido a la restricción en la entrada de CO₂, provocada por el cierre estomático en respuesta a la deshidratación, lo que provoca la pérdida de turgencia en las hojas (Striker et al. 2007). A medida que el evento de inundación se prolonga, puede ocurrir una pérdida de clorofila en las hojas, acompañado de un aumento de la emisión de fluorescencia de la clorofila a, principalmente desde el fotosistema II (PSII), indicando estrés; este parámetro es particularmente sensible a los cambios ambientales (Lazár y Schansker 2009). Sin embargo, este aumento en la fluorescencia puede ser temporal (fotoinhibición transitoria) antes de que se produzca un daño funcional y estructural irreversible del aparato fotosintético (Force et al. 2003). Cuando las condiciones anaeróbicas cambian a aeróbicas, como ocurre al descender el agua de inundación, pueden generarse especies reactivas del oxígeno que dañen el aparato fotosintético, activándose en las plantas sistemas de recuperación tendientes a continuar la fijación de carbono (Sone et al. 2012). Por lo tanto, los parámetros de fluorescencia pueden utilizarse como indicadores de la capacidad de recuperación de las plantas tras la sumersión (Mommer y Visser 2005; Panda et al. 2006, 2008).

Aunque muchas especies vegetales pueden coexistir en un mismo hábitat de condiciones ambientales similares, es posible que las mismas desarrollen diferentes estrategias de adaptación frente a eventos de inundación (Blom y Voesenek 1996). En condiciones de sumersión parcial, a nivel anatómico, las plantas tolerantes pueden generar aerénquima en sus raíces (Justin y Armstrong, 1987), un tejido especializado que facilita el transporte de oxígeno desde los tallos y hojas emergidos hacia las raíces sumergidas (Armstrong 1980; Colmer 2003; Striker 2023, 2024). Además, el aerénquima también puede formarse en órganos aéreos como vainas y tallos, proporcionando un sistema de canales interconectados que permiten el transporte difusivo de oxígeno desde las hojas hasta las raíces (Bailey-Serres y Voesenek 2008). La formación de aerénquima generalmente implica el colapso y muerte de células en la corteza de la raíz, creando espacios aerenquimáticos. Este proceso se desencadena en situaciones de baja concentración de oxígeno (hipoxia) y por la acumulación de etileno, una hormona clave en la respuesta a la inundación (Jackson 1985; Bailey-Serres y Voesenek 2008). El etileno se sintetiza constantemente en las células bajo condiciones normales y se libera hacia la atmósfera a través de los poros del suelo. Sin embargo, cuando un órgano, como las raíces, está rodeado de agua, el etileno queda atrapado en las células debido a su lento movimiento en el agua, lo que intensifica su biosíntesis (Bailey-Serres y Voesenek 2008).

Morfológicamente, las plantas tolerantes al estrés por sumersión parcial pueden desarrollar raíces adventicias en cuestión de días (Drew et al. 1979). Estas raíces, altamente porosas debido al aerénquima, suelen aparecer en la base de los tallos o en la parte superior de las raíces (zona de transición vástago-raíz; Striker et al. 2015). Debido a su ubicación, las raíces adventicias tienen la capacidad de explorar la columna de agua superficial y aeróbica, facilitando así la oxigenación de los tejidos, ya que el agua de inundación contiene más oxígeno que el suelo anegado (Naidoo y Mundree 1993; Blom y Voesenek 1996). Cuando la inundación por sumersión parcial se prolonga, estas raíces pueden reemplazar a las originales, que pueden estar en proceso de muerte y descomposición (Kozlowski y Pallardy 1984). El etileno también es el principal promotor de la aparición de raíces adventicias bajo condiciones de hipoxia (Drew et al. 1979; Jackson 1985), al aumentar la sensibilidad de los tejidos a las auxinas, fitohormonas que estimulan la división celular en tejidos donde ya existen grupos de células activamente en división (Liu y Reid 1992; Jordan y Casaretto 2006). Además, las especies vegetales pueden elongar sus órganos aéreos, como tallos y pecíolos, para que una mayor proporción de sus hojas emerjan por encima del nivel del agua. Esto se debe a un aumento en la actividad de las expansinas, proteínas reguladas por el etileno que promueven el ablandamiento de las paredes celulares (Vriezen et al. 2000). En especies dicotiledóneas, como las leguminosas Melilotus siculus o Lotus tenuis, pueden generarse hipertrofias del tallo a través de la formación de aerénquima secundario (phellem o felema), un tejido esponjoso con grandes espacios intercelulares que facilita el movimiento interno de oxígeno desde la parte aérea hacia las raíces (Striker et al. 2005, 2018; Teakle et al. 2011).

La sumersión completa es la situación de mayor estrés para las plantas en ambientes inundables. En este escenario, no solo se puede provocar una pérdida significativa de biomasa, sino que también, en muchas especies vegetales, se compromete la supervivencia de los individuos (Lenssen et al. 2004). La sumersión completa restringe tanto la disponibilidad de oxígeno y dióxido de carbono (gases que difunden lentamente en el agua) como la irradiancia. Incluso en agua con poca turbidez, la luz disponible se reduce drásticamente con una columna de agua de apenas unos pocos centímetros por encima de las hojas superiores de las plantas (Sand-Jensen 1989). Las posibilidades de supervivencia dependen de la tolerancia de las especies, así como de la profundidad y duración de la inundación (Blom y Voesenek 1996; Colmer y Voesenek 2009).

Cuando la sumersión completa se prolonga por más de dos semanas y es relativamente poco profunda, algunas especies vegetales pueden emplear la estrategia de exponer sus hojas por encima del agua mediante la elongación de entrenudos, pecíolos, tallos u hojas, un fenómeno conocido como el síndrome de escape al bajo oxígeno (LOES: Low-Oxygen Escape Syndrome; Bailey-Serres y Voesenek 2008); y pasar así a una situación de sumersión parcial. Esta respuesta de elongación, denominada 'escape,' permite a las plantas exponer sus hojas por encima de la capa de agua, facilitando el intercambio gaseoso a modo de "snorkels," donde las hojas se adelgazan y los cloroplastos se desplazan hacia la epidermis (Bailey-Serres y Voesenek 2008; Nagai et al. 2010). En el caso del arroz, se ha comprobado que la elongación de los entrenudos bajo bajas concentraciones de oxígeno es estimulada por el etileno, que activa la expresión de los QTLs *Snorkel1* (SK1) y *Snorkel2* (SK2) (Hattori et al. 2009), lo que a su vez promueve la biosíntesis de giberelinas, esenciales para la elongación de los entrenudos (Nagai et al. 2010). Esta estrategia ha sido estudiada en detalle, especialmente en *Rumex palustris, Alternanthera philoxeroides* y en arroz de aguas profundas (Hattori et al. 2008; Colmer y Voesenek 2009; Luo et al. 2009).

En cambio, cuando la sumersión completa es de corta duración (menos de dos semanas) y muy profunda, algunas especies vegetales adoptan la estrategia de "quiescencia" (LOQS: Low-Oxygen Quiescence Syndrome). Esta estrategia consiste en reprimir la elongación de tallos y hojas, manteniendo un metabolismo celular basal para conservar las reservas de carbohidratos, las cuales serán utilizadas para retomar el crecimiento cuando el agua descienda y se restablezcan las condiciones aeróbicas (Bailey-Serres y Voesenek 2008; Colmer y Voesenek 2009; Nagai et al. 2010; Striker 2012a; Voesenek y Bailey-Serres 2015). En arroz, el QTL denominado *Submergence1* (SUB1) es clave para conferir tolerancia a la sumersión completa (Xu et al. 2006). Sin embargo, solo uno de los tres genes dentro de la

región SUB1, el *SUB1A*, es responsable del carácter de quiescencia (Fukao et al. 2006). Estos genes codifican factores de transcripción que reprimen la síntesis de giberelinas, impidiendo la elongación de entrenudos, tallos y hojas (Fukao y Bailey-Serres 2008). Hasta ahora, la estrategia de quiescencia se ha identificado en arroz (Setter y Laureles 1996), *Hemarthria altissima* (Luo et al. 2011), *Ranunculus repens* (Lynn y Waldren 2003), *Rumex crispus* (Laan y Blom 1990), y en un cultivar de *Lotus tenuis* (cv. Pampa INTA) (Manzur et al. 2009). Sin embargo, solo en arroz se han identificado las bases genéticas que permiten comprender los mecanismos detrás de la quiescencia.

En esta tesis doctoral se evaluarán los rasgos y mecanismos de respuesta de especies leguminosas forrajeras frente a sumersión parcial y completa, considerando diferentes duraciones y realizando mediciones fisiológicas en la fase de recuperación al estrés. En los siguientes párrafos, se describirá lo que se conoce en la literatura internacional sobre las respuestas a estrés abiótico en las leguminosas forrajeras utilizadas en esta tesis, y se presentarán los antecedentes específicos relacionados con sus respuestas a la inundación.

1.1.2) Leguminosas forrajeras. Producción bajo condiciones de estrés

Las leguminosas forrajeras son un componente crucial en pasturas y pastizales naturales, siendo esenciales en estos ambientes (Striker y Colmer 2017). Cuando están presentes, mejoran significativamente la producción y calidad del forraje para el ganado, aumentando la digestibilidad y el contenido de proteína bruta, además de reducir los niveles de fibra detergente neutra en comparación con ambientes compuestos únicamente por gramíneas (Graham y Vance 2003; Rochon et al. 2004). Son particularmente eficientes en áreas con bajos o nulos insumos de fertilizantes nitrogenados (Marten 1989; Phelan et al. 2015). Además, las pasturas o pastizales basados en leguminosas pueden ofrecer una distribución de rendimiento más consistente a lo largo de la temporada de crecimiento. Sin embargo, existen pocos antecedentes sobre el impacto de la sumersión derivada de inundaciones de alta intensidad en este tipo de especies.

En los ambientes destinados a la ganadería, las especies leguminosas forrajeras del género *Trifolium* juegan un papel destacado. Este género comprende aproximadamente 290 especies, tanto anuales como perennes, de las cuales unas 20 son reconocidas por su valor forrajero. Entre las especies perennes más importantes se encuentran *T. repens*, *T. hybridum*, *T. pratense* y *T. ambiguum*, que están ampliamente distribuidas en regiones templadas y

subtropicales (Malaviya et al. 2008). Estas especies se cultivan extensamente como forraje para el ganado y como cultivos de abono verde, habiéndose naturalizado en gran medida en todo el mundo (Bennani et al. 2011). Por ejemplo, el trébol blanco (*T. repens*) es una de las leguminosas forrajeras templadas más cultivadas y la más común en pasturas ganaderas (Laidlaw y Teuber 2001). El trébol rojo (*T. pratense*), por su parte, es uno de los cultivos forrajeros más importantes para alimentar a los rumiantes (ovejas, ganado para carne y leche) debido a su alto valor proteico, utilizándose principalmente en la producción de silo para la alimentación invernal del ganado (Ravagnani et al. 2012). En general, los tréboles son altamente valorados por su calidad nutritiva y su capacidad de ensilado (Hoffman y Broderick 2001). Incluso pueden alcanzar o superar rendimientos comparables a forrajes de alta calidad como la alfalfa (*Medicago sativa*), lo que los convierte en un recurso crucial para promover la buena salud del ganado y mejorar la producción de forraje (Harris 1994; Marković et al. 2011).

En cuanto a la tolerancia a estreses abióticos, existe una considerable cantidad de estudios sobre el género *Trifolium* frente a desafíos como la sequía, la salinidad, el anegamiento o la combinación de estos factores (Rogers y West 1993; Nichols et al. 2012; Kotula et al. 2019; Hanley et al. 2020; Smith et al. 2023). Se sabe que *T. pratense* se utiliza a menudo como una alternativa a la alfalfa debido a su moderada tolerancia al anegamiento, gracias a su mayor porosidad radicular y raíces más profundas (Gibberd et al. 2001), así como su capacidad para almacenar reservas en las raíces antes del invierno, lo que le confiere tolerancia a bajas temperaturas (Caradus 1995). Por otro lado, el trébol frutilla (*T. fragiferum*) es considerado más tolerante a estreses abióticos en comparación con muchas otras leguminosas forrajeras perennes de clima templado (Tiver 1954; Dūmiņš et al. 2021), debido a su capacidad para desarrollar aerénquima y raíces adventicias, lo que le permite evitar el déficit de oxígeno en condiciones de anegamiento (Rogers y West 1993; Rogers et al. 2009). Sin embargo, ha sido menos estudiado que otros tréboles debido a su menor biomasa en comparación con el trébol blanco, su baja tolerancia a la sequía en contraste con la alfalfa, y su menor vigor en comparación con el trébol rojo.

El género *Melilotus*, que comprende aproximadamente 19 especies anuales o bienales, es otra leguminosa forrajera notable debido a su contenido de compuestos bioactivos, como la cumarina y los flavonoides, que contribuyen a su capacidad antioxidante. Esto es particularmente notable en especies como *Melilotus albus* y *M. officinalis* (Chen et al. 2022; Wu et al. 2022). Estos compuestos permiten inhibir la biohidrogenación de los ácidos grasos en el rumen del ganado, mejorando su dieta a través de la incorporación de ácidos grasos insaturados en sus tejidos (Al-Snafi 2020). En particular, *M. albus* es conocida por su alto rendimiento y capacidad de fijación de nitrógeno (McEwen y Johnston 1985). Además, es especialmente resistente a suelos alcalino-salinos, la sequía y las bajas temperaturas (Zabala et al. 2018; Wang et al. 2024). Sin embargo, hay pocas investigaciones sobre su tolerancia al anegamiento o la sumersión (Rogers et al. 2008).

Por último, el género *Lotus* es otra leguminosa forrajera que contribuye significativamente a la producción en pasturas y pastizales naturales. Este género incluye más de 180 especies distribuidas en todo el mundo (Pajuelo y Stougaard 2005; Escaray et al. 2012). Estas especies se utilizan para mejorar la producción de forraje en ambientes sujetos a marcadas condiciones de estrés abiótico donde leguminosas forrajeras tradicionales como la alfalfa o los tréboles no pueden crecer o sobrevivir (Striker y Colmer 2017), produciendo forraje de calidad similar o incluso comparable al de estas especies (Singh et al. 2007).

Las especies más representativas de este género son Lotus tenuis y L. corniculatus. Lotus corniculatus produce aproximadamente un 3% de materia seca en forma de proantocianidinas foliares (PA), también conocidas como taninos condensados, en comparación con el 0,8% que produce L. tenuis. Esta característica la convierte en una opción superior para mejorar la dieta de los rumiantes, ya que favorece una mayor asimilación de proteínas, reduce la fermentación entérica y disminuye la hinchazón en el ganado (Min et al. 2003; Sivakumaran et al. 2006; Escaray et al. 2012). Aunque L. corniculatus está adaptada a condiciones de sequía, salinidad, acidificación y altas concentraciones de aluminio en el suelo, gracias a la detoxificación a través de la quelación con fitoquelatinas (Dear et al. 2003; LOTASSA 2010), L. tenuis muestra una mayor tolerancia frente a eventos de inundación severos, tanto en intensidad (altura del agua) como en duración (Striker et al. 2012; Escaray et al. 2014). Por lo tanto, es más probable que L. corniculatus prospere en suelos situados en posiciones topográficas bajas que pueden anegarse ocasionalmente (Mazzanti et al. 1988). Lotus tenuis tiene la capacidad de "escapar" de la sumersión parcial maximizando la elongación de sus tallos por encima del agua. En caso de sumersión completa, posee la capacidad de cambiar su estrategia de crecimiento a un modo de quiescencia, utilizando las reservas de carbono almacenadas en la corona (Manzur et al. 2009; Striker et al. 2011b). Esta adaptabilidad a diferentes escenarios de sumersión, tanto del tipo parcial como completa, permite a *L. tenuis* sobrevivir en ambientes con inundaciones variables e impredecibles.

Striker et al. (2005) comprobaron que, ante eventos de inundación, *Lotus tenuis* mostró una mayor porosidad en sus tejidos, duplicó la proporción de aerénquima en las raíces, y presentó una mayor biomasa foliar por encima del agua, además de una reducción en la conductancia estomática y un mantenimiento de la tasa fotosintética en comparación con *L. corniculatus*. Estas respuestas permitirían mejorar la fijación y el transporte de oxígeno, así como mantener la producción de biomasa bajo condiciones de estrés. Por su parte, Vignolio et al. (1994) estudiaron la tolerancia al anegamiento invernal y estival de ambas especies y encontraron que *L. corniculatus* desarrolló clorosis y abscisión foliar tras el estrés, algo que no ocurrió en *L. tenuis*. Los autores sugirieron que esta menor retranslocación de nitrógeno desde las hojas adultas a las jóvenes en *L. corniculatus* podría deberse a su menor capacidad de absorción de nitrógeno a nivel radicular en suelos hipóxicos, atribuible a su menor porosidad (aerénquima).

Una desventaja experimental de las especies forrajeras del género *Lotus* mencionadas anteriormente es que sus genomas no están aún secuenciados y no se dispone de herramientas genéticas específicas (como RILs o mutantes) para estudiar y comprender los mecanismos de tolerancia a la sumersión causada por la inundación. Sin embargo, en los últimos años, ha surgido la posibilidad de utilizar infraestructura de última generación, diseñada originalmente para estudiar el proceso simbiótico de la nodulación en la planta modelo *L. japonicus*. La inversión realizada en la generación de recursos genéticos en esta especie modelo, como RILs, mutantes y colecciones de accesiones, además de su genoma mapeado, podría aprovecharse para comprender los mecanismos de respuesta a la inundación y aplicarlos a las especies forrajeras de *Lotus* estrechamente relacionadas. Es alentador que la mayoría de los marcadores moleculares identificados en *L. japonicus* funcionen correctamente en las especies forrajeras *L. corniculatus* y *L. tenuis*, como lo ha señalado el proyecto LOTASSA (2010) en relación con la sequía, acidez y toxicidad por aluminio. Sin embargo, los análisis específicos para el estrés por inundación y sumersión aún no han sido abordados en esta especie.

La especie modelo *Lotus japonicus* posee una cercanía filogenética con *L. tenuis* y *L. corniculatus*, lo que la convierte en un recurso valioso para demostrar que los hallazgos en la especie modelo pueden ser aplicables a la mejora de las especies forrajeras del género *Lotus* (Escaray et al. 2012). *Lotus japonicus* es diploide, tiene un genoma de tamaño modesto, lo que facilita su manipulación genética. Además, es una especie pequeña y de rápido ciclo de generación (Pajuelo y Stougaard 2005; Young et al. 2005). Cuenta con un conjunto de recursos genéticos, incluida la disponibilidad de accesiones, ecotipos, y el desarrollo de líneas mutantes y líneas endocriadas recombinantes (RILs) (Jiang y Gresshoff 1997; Mun et al. 2016). Recientemente, se realizó un estudio de mapeo de asociación en una población de *L. tenuis* compuesta por 100 genotipos para identificar QTLs implicados en la tolerancia a la sequía. La caracterización genética se llevó a cabo utilizando 88 marcadores moleculares SSR transferibles del genoma de *L. japonicus*, demostrando la posibilidad de transferir conocimientos de la especie modelo a la agronómicamente importante *L. tenuis* (Inostroza et al. 2019).

En cuanto a su tolerancia, L. japonicus ha mostrado ser resistente al anegamiento en plantas adultas, especialmente en las raíces, donde puede tolerar hasta tres semanas de anegamiento (Rocha et al. 2010; Striker et al. 2014). Sin embargo, poco se sabe sobre su tolerancia a la sumersión, ya sea parcial o completa. L. japonicus habita en una amplia gama de ambientes, que incluyen eventos esporádicos de excesos de agua (Pajuelo y Stougaard 2005). Un estudio comparativo entre L. corniculatus, L. tenuis y L. japonicus mostró que, ante un evento de sumersión parcial de 55 días, L. japonicus fue la especie más sensible, con una reducción de biomasa de vástagos y raíces del 66% y 64% respectivamente, en comparación con el control. Por su parte, L. corniculatus redujo la biomasa un 53% en vástagos y un 61% en raíces, mientras que L. tenuis presentó una reducción del 28% en vástagos y un 48% en raíces (Antonelli et al. 2019). En cuanto a la sumersión completa a nivel de plántula, se observó que un genotipo de L. japonicus (MG20) optó por la estrategia LOES, invirtiendo sus recursos en la elongación de los tallos y tolerando hasta 12 días de estrés, a diferencia de L. corniculatus y L. tenuis, que adoptaron la estrategia de quiescencia LOQS. Sin embargo, estas estrategias durante el evento de sumersión no siempre coinciden con un mejor crecimiento posterior al estrés (Striker et al. 2012).

A partir de lo expuesto es importante no limitar el análisis de las respuestas de tolerancia únicamente a la etapa de sumersión, sino extenderlo también al período de recuperación posterior al estrés. Una evaluación completa que abarque tanto el período de estrés como el de recuperación permitirá determinar la verdadera tolerancia a la sumersión, ya que es durante la recuperación cuando se define la supervivencia y la producción de biomasa foliar, aspectos cruciales para su uso como forraje (Luo et al. 2011; Striker 2012b; Striker et al. 2012). Es significativo notar que un trabajo de revisión relativamente reciente sobre la tolerancia al anegamiento en leguminosas forrajeras mostró que solo el 30% de los estudios publicados en la literatura internacional consideró la evaluación de la recuperación de las plantas después del estrés (Striker y Colmer 2017). Por ello, en esta tesis se ha puesto un énfasis especial en comprender las respuestas y mecanismos de recuperación tras la sumersión en leguminosas de los géneros *Lotus, Trifolium y Melilotus*, un área que hasta ahora no había sido abordada minuciosamente.

1.1.3) <u>Recuperación luego de la sumersión</u>

Las respuestas de las especies leguminosas forrajeras ante eventos de inundación han sido ampliamente estudiadas (Teakle et al. 2006; Colmer y Voesenek 2009; Striker et al. 2011a; Striker 2012a; entre otros), centrándose en el período de estrés. Sin embargo, a pesar de los distintos grados de tolerancia que muestran frente a estos estreses (James y Crawford 1998; Striker et al. 2005; Teakle et al. 2006; Striker y Colmer 2017 y referencias en esa revisión), la información sobre su capacidad para tolerar la sumersión completa es limitada. Es relevante destacar que la tolerancia al anegamiento no implica necesariamente una tolerancia a la sumersión (Manzur et al. 2009; 2020; Striker et al. 2017). Por lo tanto, es fundamental proporcionar nuevos conocimientos sobre la tolerancia a la sumersión en las especies leguminosas forrajeras pertenecientes a los géneros *Lotus, Trifolium y Melilotus*, presentes tanto en pasturas cultivadas como en pastizales naturales de todo el mundo.

El conocimiento sobre la tolerancia a la sumersión y la recuperación post-estrés en las especies de los géneros *Trifolium* y *Melilotus* es escaso (Striker et al. 2019; Enkhbat et al. 2021). En cuanto a las especies de *Lotus*, que desarrollan estrategias de 'escape' o 'quiescencia' ante la sumersión, se ha documentado que poseen diferentes capacidades de recuperación (Luo et al. 2011; Striker et al. 2011b, 2012; Imaz et al. 2012). Sin embargo, solo se han identificado algunos rasgos clave para su recuperación tras la sumersión.

Se ha observado que el estado hídrico de la planta podría ser crucial para facilitar una rápida recuperación. En este sentido, se sugiere que el crecimiento del vástago y una mayor relación vástago/raíz durante la sumersión pueden mejorar el equilibrio entre la capacidad de transporte de gases (fuente de oxígeno) y el consumo de oxígeno por las raíces (sumidero de oxígeno), especialmente cuando las plantas logran emerger sus hojas sobre el agua (estrategia de 'escape'; Herzog y Pedersen 2014; Pan et al. 2020). Sin embargo, un aumento en la relación vástago/raíz también puede limitar la recuperación de las plantas después de la sumersión si la pérdida de agua por transpiración no puede ser compensada por la absorción de agua de las raíces, las cuales podrían estar disminuidas o dañadas por la sumersión, independientemente de si las hojas emergieron con éxito. Esto se ha observado en el pasto forrajero *Chloris gayana* tras una semana de sumersión total (Striker et al. 2017).

Un caso similar se ha documentado en el arroz cv. IR42, cuya intolerancia a la sumersión completa se debe a la deshidratación de las hojas (es decir, caída en el contenido hídrico por disminución de la conductividad hidráulica en la vaina de la hoja) después de la sumersión, lo que provoca marchitamiento y muerte de las plantas (Setter et al. 2010). Por lo tanto, la relación de biomasa entre vástago y raíz después de la sumersión podría estar relacionada con el balance hídrico (es decir, la transpiración por parte de los vástagos y la absorción de agua por parte de las raíces), lo que podría influir en la recuperación de la planta (Tanguilig et al. 1987; Aroca et al. 2012).

Además, estudios pioneros (Luo et al. 2009; 2011) mostraron que la capacidad de reanudar el crecimiento después de 20 días de sumersión en la dicotiledónea *Alternanthera philoxeroides* y el pasto *Hemarthria altissima* dependió del rápido crecimiento de las hojas y la recuperación de la funcionalidad del aparato fotosintético. En dos accesiones contrastantes de *Arabidopsis thaliana* para la tolerancia a la sumersión (Bay-0, sensible, vs. Lp2, tolerante), se demostró que la rápida apertura estomática, una mayor retención de clorofila y el mantenimiento de la turgencia de las hojas fueron factores clave para que la accesión tolerante lograra una rápida recuperación después de la remoción del estrés (Yeung et al. 2018).

Hasta el momento, en el género *Lotus* existe un único estudio que muestra cómo las plántulas de *L. japonicus* cv. MG20, *L. corniculatus* cv. San Gabriel y *L. tenuis* cv. Chajá se recuperaron después de 12 días de sumersión completa (Striker et al. 2012). Al inicio del

período de recuperación, las tres especies respondieron de manera opuesta a lo esperado según su desempeño durante la sumersión: las plántulas de L. japonicus cv. MG20 presentaron una mayor relación vástago/raíz en comparación con las otras dos especies de Lotus. Además, el crecimiento de las raíces fue menos afectado que el de los tallos, lo que sugiere que la capacidad de recuperación frente a un evento de sumersión puede variar entre los diferentes órganos de la planta (Malik et al. 2001; 2002). Por otro lado, L. tenuis y L. corniculatus mostraron una mejor recuperación en términos de biomasa, lo que podría indicar que L. japonicus continúa creciendo durante la sumersión completa mediante la elongación de sus tallos (LOES), mientras que las otras dos especies optan por la quiescencia (LOQS) pero luego se recuperan mejor cuando el agua desciende. En un experimento posterior, se observó una amplia variabilidad en la relación vástago/raíz entre las RILs de L. japonicus, con valores tanto menores como mayores que los mostrados por el cv. MG20 (Striker et al. 2014). Se sabe que esta relación podría incrementarse bajo sumersión (en comparación con plantas control) debido a, al menos, dos tipos de respuestas: (i) un incremento en la biomasa de la parte aérea sin mayores cambios en la biomasa radical (Imaz et al. 2012), y (ii) el mantenimiento de la biomasa aérea con una disminución de la biomasa radical debido a la muerte de raíces por hipoxia (Liao et al. 2010). Se piensa que la relación vástago/raíz y su dinámica post-sumersión podrían ser clave para el ajuste de las plantas al ambiente de suelo drenado, en el cual el estado hídrico de la planta, resultado del balance entre las pérdidas de agua por transpiración (vástago) y su recuperación por absorción (raíces), es fundamental para facilitar el crecimiento post-estrés.

Debido a la importancia de evaluar la recuperación de las plantas después del estrés, en esta tesis todos los experimentos se centran en esta etapa para identificar las variables fisiológicas que confieren a las especies leguminosas forrajeras estudiadas su capacidad de retomar el crecimiento tras la sumersión.

1.2) Objetivos e hipótesis de trabajo

1.2.1) Objetivo general

En base a los antecedentes, se propuso como **objetivo general** de la tesis, el identificar rasgos y mecanismos de tolerancia a la sumersión y recuperación luego del estrés en especies leguminosas de interés forrajero abarcando los géneros *Lotus*, *Trifolium* y *Melilotus*, haciendo hincapié en especies del género *Lotus* para su análisis morfo-fisiológico.

1.2.2) Objetivos particulares

Como **primer objetivo específico** se evalúa la tolerancia a la sumersión completa de corta y larga duración en especies leguminosas forrajeras conspicuas de los géneros *Lotus, Trifolium* y *Melilotus* y su recuperación de la desumersión. Para ello se realizaron análisis de supervivencia, tasa de crecimiento relativo (TCR) de los diferentes órganos de la planta y mediciones fisiológicas de conductancia estomática, verdor foliar, y parámetros relacionados a la fluorescencia de la clorofila asociados al daño por sumersión.

Como **segundo objetivo específico** se analiza la variabilidad de respuesta en el crecimiento de accesiones de *Lotus tenuis* y *L. corniculatus* durante y luego de la sumersión parcial y completa. Para ello se analizaron características morfológicas asociadas a las tasas de crecimiento relativo de los diferentes órganos de la planta, evaluando así la capacidad de asignación de biomasa en cada una de las especies evaluadas cuando fueron sujetas a la sumersión.

Como **tercer objetivo específico** se identifican los rasgos y respuestas relacionadas con la capacidad de recuperación de la sumersión completa en RILs de *Lotus japonicus* con diferente relación constitutiva vástago/raíz (seleccionados en Striker et al. 2014). Para ello se cuantificaron variables asociadas con las relaciones hídricas, la conductancia estomática, la fluorescencia de la clorofila como indicativo de daño, y la acumulación de biomasa de tallos, hojas y raíces de las plantas.

1.3) Hipótesis

En relación con el primer objetivo, se ponen a prueba las siguientes hipótesis relacionadas con la evaluación de la tolerancia a sumersión completa en especies leguminosas forrajeras:

Hipótesis 1.1: Existe variabilidad en la tolerancia a la sumersión completa entre leguminosas forrajeras de los géneros *Lotus*, *Trifolium* y *Melilotus* manifestada en términos de supervivencia y de tasas de crecimiento post estrés.

Hipótesis 1.2: Las especies con mayor tolerancia a la sumersión completa presentan mayor capacidad de sostener su conductancia estomática, una menor caída en el verdor foliar y una recuperación rápida del rendimiento cuántico máximo del Fotosistema II y del flujo de energía absorbida por centro de reacción.

Con respecto al segundo objetivo, se formulan las siguientes hipótesis en relación con la tolerancia a la sumersión parcial y completa en accesiones de *Lotus tenuis* y *L. corniculatus*:

Hipótesis 2.1: Las accesiones de *Lotus tenuis* y *L. corniculatus* muestran variabilidad en su tasa de crecimiento después de la sumersión parcial y completa.

Hipótesis 2.2: La tasa de crecimiento post estrés se correlaciona positivamente con la proporción de hojas verdes remanentes al final de la sumersión.

Hipótesis 2.3: Existe un compromiso entre la tasa de crecimiento intrínseca en condiciones control y la capacidad de crecimiento durante o después del estrés por sumersión.

Hipótesis 2.4: No existe relación directa entre la tolerancia a la sumersión parcial y a la sumersión completa. Es decir, las accesiones que mejor toleran la sumersión parcial no necesariamente son aquellas que toleran mejor la sumersión completa.

Por último, teniendo en cuenta el tercer objetivo se plantea la siguiente hipótesis relacionada con la identificación de rasgos y mecanismos de tolerancia a la sumersión completa en accesiones de *Lotus japonicus*:

Hipótesis 3: Las accesiones de *Lotus japonicus* varían en su capacidad para recuperarse de la sumersión completa, lo cual está asociado a diferencias en la relación vástago/raíz, el

estado hídrico de la planta y el verdor de las hojas. Las accesiones con una baja relación vástago/raíz muestran una rápida recuperación del estado hídrico foliar, la conductancia estomática y el verdor de las hojas durante la fase de recuperación, lo que se traduce en una alta tasa de crecimiento post-sumersión.

<u>1.4) Organización de la tesis</u>

Esta tesis se compone de una introducción general (capítulo I), tres capítulos experimentales (II, III y IV) y un capítulo final de discusión general (V). Cada capítulo experimental incluye su propia introducción, materiales y métodos, resultados y discusión, con antecedentes específicos para cada caso. El capítulo introductorio aborda aspectos generales que conectan todos los capítulos experimentales. El capítulo II evalúa la tolerancia y recuperación de especies leguminosas forrajeras de Lotus, Trifolium y Melilotus ante sumersión completa de distintas duraciones. Los resultados mostraron que todas las especies sobrevivieron, excepto M. albus y T. michelianum. Las especies de Lotus mantuvieron mayor biomasa y mejores parámetros fisiológicos, como conductancia estomática y concentración de clorofila en hojas jóvenes, además de una rápida recuperación del Fotosistema II. Dentro de Trifolium spp., T. pratense demostró la menor tolerancia y recuperación. En Lotus, L. tenuis fue la especie más prometedora frente a la sumersión, seguida por L. corniculatus, especialmente en situaciones de inundación de corta duración (Buraschi et al. 2024a, Functional Plant Biology). El capítulo III se enfoca en el género Lotus debido a su mayor tolerancia a la sumersión, examinando las respuestas de 10 accesiones de L. tenuis y L. corniculatus ante sumersión parcial y completa. Se observó que los parámetros de crecimiento durante la sumersión se asociaron con accesiones de L. corniculatus, mientras que la recuperación se relacionó con accesiones de L. tenuis. En L. tenuis, la recuperación de la sumersión completa se correlacionó positivamente con la fracción de biomasa foliar y negativamente con la fracción de biomasa radicular. L. tenuis mostró accesiones con tolerancia tanto a la sumersión parcial como completa, mientras que L. corniculatus resultó más adecuado para la sumersión parcial (Buraschi et al. 2024b, Functional Plant Biology). En el capítulo IV, se profundiza en la identificación de las variables fisiológicas asociadas a la recuperación tras la sumersión, utilizando accesiones de L. japonicus con diferentes relaciones constitutivas vástago/raíz. Los resultados principales mostraron variación en la capacidad de recuperación entre genotipos tras una sumersión completa; una compensación entre el crecimiento durante y después del estrés; una relación inversa entre la tasa de crecimiento relativo durante la recuperación y la relación vástago/raíz tras la desumersión; y relaciones positivas entre la recuperación, el estado hídrico foliar y la conductancia estomática. Además, la retención de clorofila (verdor) facilitó una rápida recuperación (Buraschi et al. 2020, *Plants*). Finalmente, el capítulo V presenta la discusión integrada de los resultados experimentales obtenidos en la tesis, contrastando las hipótesis planteadas e incluyendo perspectivas futuras para profundizar en el conocimiento sobre el estrés por sumersión en especies leguminosas forrajeras abordadas en esta investigación.

Evaluación de accesiones de leguminosas forrajeras ante eventos de sumersión completa de corta y larga duración y su recuperación

<u>Articulo derivado de este capítulo</u>: Buraschi, F. B., Mollard, F. P. O., Cordon, G., Grimoldi, A. A. y Striker, G. G. 2024. Submergence of forage legumes: *Lotus* species show better tolerance than *Trifolium* and *Melilotus* species due to their superior recovery after stress. Functional Plant Biology, FP24206.

2.1) Introducción

El cambio climático está aumentando la frecuencia e intensidad de los eventos meteorológicos más extremos, como las lluvias torrenciales, que elevan los niveles de agua subterránea y desencadenan inundaciones repentinas (Hirabayashi et al. 2013; Harrison et al. 2016). Estas condiciones afectan significativamente la producción y seguridad alimentaria mundial debido al exceso de agua en el suelo que afecta a las plantas de cultivo (Harrison et al. 2014). De esta manera, se espera un aumento en la ocurrencia de inundaciones y diversos grados de sumersión de las pasturas y pastizales inundables. La sumersión completa del vástago es una de las situaciones más estresantes para las plantas en ambientes propensos a inundaciones (Voesenek et al. 2006). Los vástagos completamente sumergidos tienen una baja disponibilidad de oxígeno en los tejidos durante la noche debido a la respiración y a la lenta difusión del O₂ en un medio acuoso. Durante el día, ocurre el proceso de fotosíntesis, lo que eleva los niveles de oxígeno molecular, pero la fotosíntesis bajo el agua es mucho menor que en el aire debido a la baja difusión del dióxido de carbono y la extinción de la luz a través del agua de inundación (Colmer et al. 2011; Winkel et al. 2013). Esto puede llevar a una 'inanición de carbohidratos', agravando la 'crisis energética' por la baja disponibilidad de oxígeno y el agotamiento de azúcares en las plantas sumergidas (Bailey-Serres y Voesenek 2008; Colmer y Voesenek 2009).

Las leguminosas forrajeras juegan un papel crucial en los pastizales y en los sistemas de cultivo, como las rotaciones cereal-pastura, a través de su relación simbiótica con rizobios (bacterias fijadoras de N₂). Estas leguminosas mejoran significativamente la producción y calidad del forraje para el ganado, especialmente cuando se cultivan junto con gramíneas en áreas con insumos mínimos o nulos de fertilizantes nitrogenados (Marten, 1989; Phelan et al. 2015). La incorporación de leguminosas, que poseen un mayor contenido de proteínas en las hojas en comparación con las gramíneas, mejora la digestibilidad del alimento y la energía metabolizable, satisfaciendo considerablemente las necesidades proteicas de los animales (Rochon et al. 2004). Además, las pasturas basadas en leguminosas podrían ofrecer una distribución más uniforme del rendimiento de forraje a lo largo de la temporada de crecimiento.
Desde una perspectiva ecológica, la presencia de leguminosas también incrementa la disponibilidad de nitrógeno en el tapiz vegetal, favoreciendo indirectamente el crecimiento de especies acompañantes. Este efecto facilitador ha sido reportado, por ejemplo, entre *Lotus tenuis* y *Paspalum dilatatum* en pastizales bajos de Argentina, donde la leguminosa promovió un aumento significativo en la biomasa aérea de la gramínea, atribuido a la mejora del entorno edáfico y al mayor suministro de nitrógeno (Quinos, Insausti y Soriano 1998). A su vez, muchas leguminosas presentan sistemas radiculares profundos que facilitan el acceso al agua en capas inferiores del suelo, contribuyendo a una mayor estabilidad del sistema frente a déficits hídricos. Aunque se ha estimado que más del 85 % de la biomasa radical se concentra en los primeros 20 cm del suelo, estudios han mostrado que excavaciones de mesocosmos hasta los 35 cm capturaron la mayor parte de la biomasa subterránea en estos sistemas (Taboada y Lavado 1988; Soriano 1991; Striker et al. 2011a). Estas ventajas funcionales, sumadas a la complementariedad entre especies, contribuyen a un mayor potencial de secuestro de carbono en el suelo, reforzando así el papel ecosistémico de las leguminosas en los sistemas pastoriles.

A pesar de los diversos grados de tolerancia al anegamiento por parte de las leguminosas (James y Crawford, 1998; Striker et al. 2005; Teakle et al. 2006; Striker y Colmer 2017), existe una escasa información sobre su tolerancia a la sumersión completa (ver Buraschi et al. 2024b para algunas accesiones de *Lotus*). Es importante señalar que la tolerancia al anegamiento no equivale necesariamente a la tolerancia a la sumersión (Manzur et al. 2009; 2020; Striker et al. 2017). En este capítulo, se mostrarán nuevas perspectivas sobre la tolerancia a la sumersión de ocho especies de leguminosas pertenecientes a los géneros *Lotus*, *Trifolium y Melilotus*, que están ampliamente presentes en pasturas cultivadas y pastizales naturales en todo el mundo.

La tolerancia a la sumersión en plantas del género *Trifolium* no ha sido estudiada de manera exhaustiva. La mayor parte de la información disponible se limita a la tolerancia al anegamiento en un rango estrecho de especies agronómicamente importantes. Estudios previos han identificado a tres especies, *T. fragiferum, T. michelianum* y *T. repens*, como las más tolerantes al anegamiento en comparación con otras leguminosas forrajeras afines (Rogers y West 1993; Gibberd y Cocks 1997; Gibberd et al. 2001). Las especies tolerantes generalmente exhiben una mayor porosidad radicular y raíces más largas bajo condiciones

de anegamiento (Gibberd et al. 2001). Por el contrario, T. pratense a menudo se utiliza como especie sustituta cuando Medicago sativa (alfalfa) no puede desempeñarse bien debido a suelos poco profundos, así como también por condiciones húmedas o ácidas. Trifolium pratense se cultiva en suelos de textura gruesa y se considera sensible al anegamiento, caracterizado principalmente por una baja porosidad radicular y una reducida capacidad de aireación de los tejidos radiculares bajo excesos de agua (Striker y Colmer 2017; Striker 2023). De manera similar, varias especies de Lotus toleran el anegamiento, pero sus respuestas a la sumersión no están íntegramente estudiadas. Los pocos estudios sobre este estrés se han analizado en sumersión parcial y completa durante 1 semana en plántulas, y plantas de 1,5-2 meses de L. tenuis, L. corniculatus y el modelo de leguminosa L. japonicus (Striker et al. 2012; Di Bella et al. 2020; Buraschi et al. 2024b). Los resultados mostraron que todas las especies sobrevivieron a 1 semana de sumersión, donde L. corniculatus y L. japonicus promovieron su extensión del tallo bajo sumersión completa, mientras que L. tenuis la restringió. En este experimento dentro del capítulo II, se incluyeron especies forrajeras prominentes de Trifolium y Lotus, así como Melilotus albus, que a menudo se incorpora en suelos halomórficos. Sin embargo, ningún estudio ha evaluado la tolerancia a la sumersión en esta especie. En consecuencia, se examinarán dos escenarios de sumersión correspondientes a duraciones de corto y largo plazo (sumersión de 5 y 10 días, respectivamente) para evaluar la tolerancia de las plantas a este estrés.

La adecuada selección de especies es esencial para garantizar un rendimiento exitoso de pasturas en ambientes caracterizados predominantemente por condiciones de estrés (Nichols et al. 2010, 2012). Además, elegir accesiones que muestren variabilidad en sus respuestas a factores estresantes específicos, como la sumersión completa a corto y largo plazo, es crucial para optimizar genotipos en esas condiciones del suelo. Este enfoque ayuda a lograr un mejor rendimiento de las accesiones en los entornos específicos donde podrían ser cultivados. Para evaluar con precisión el rendimiento de las especies bajo sumersión, es imprescindible incluir una fase de recuperación tras el período de estrés, durante la cual se analiza la capacidad para reanudar su crecimiento. Enfocarse únicamente en el período de sumersión sin considerar la fase de recuperación puede llevar a conclusiones erróneas (Striker 2012b). Por lo tanto, se centrará no solo en el crecimiento y las respuestas de las plantas durante la sumersión, sino también en la capacidad de recuperación de cada especie después de que disminuya el nivel

del agua. Para lograr esto, se monitoreará la actividad fisiológica de las hojas (conductancia estomática, verdor de las hojas y fluorescencia de clorofila) durante 28 días tras dos escenarios de sumersión corta y larga, de 5 y 10 días respectivamente. Además, se medirá la acumulación de biomasa para identificar los rasgos que contribuyen a la tolerancia a la sumersión y para entender los mecanismos subyacentes involucrados en la recuperación de las plantas de este estrés en las leguminosas forrajeras mencionadas.

2.2) Materiales y métodos

2.2.1) Material vegetal y condiciones de crecimiento

Para este experimento, se seleccionaron ocho especies de leguminosas forrajeras comúnmente utilizadas en todo el mundo (ver Tabla 2.1). Las especies seleccionadas fueron *Lotus tenuis* (cv. Esmeralda), *L. corniculatus* (cv. San Gabriel), *L. japonicus* (ecotipo MG20), *Trifolium repens* (cv. Diabolo), *T. fragiferum* (cv. La Lucila), *T. pratense* (cv. Vulcano), *T. michelianum* (cv. Viper) y *Melilotus albus* (cv. Faraón). Estas especies fueron elegidas en base a la revisión de Striker y Colmer (2017) sobre un ranking de tolerancia al anegamiento de leguminosas forrajeras. Aunque hay información disponible sobre la tolerancia al anegamiento (sistema radicular inundado) de estas especies, los datos sobre la sumersión de plantas (donde todo el vástago está bajo el agua) son limitados. Notablemente, solo el 30% de los estudios sobre este estrés incluyeron una fase de recuperación post-sumersión. En este experimento, todas las especies fueron expuestas a las mismas condiciones ambientales durante el período de sumersión, y se monitoreó su recuperación. Los cultivares específicos fueron seleccionados porque son comúnmente utilizados en condiciones de campo.

Tabla 2.1. Especies de leguminosas forrajeras seleccionadas para el experimento. Para cada especie, se presentan el hábito de crecimiento, tipo de suelo, textura, pH, rendimiento de biomasa seca (rango o potencial), áreas actuales de distribución/uso y datos disponibles sobre la tolerancia al estrés abiótico.

| Especies | Nombre común | Ciclo de vida y hábitos de crecimiento | Textura del suelo, pH y rendimiento de biomasa seca (t/ha) | Áreas actuales de distribución/uso | Tolerancia a estreses abióticos | Referencias |
|--------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Lotus tenuis | Trébol de hoja estrecha pata de pájaro | Perenne, Postrado | Franco, arcilloso (rara vez arenoso), pH de 5.5 a 8, rendimiento de BS: 5 a 9 t/ha. | Europa, Argentina y sur de Australia | Tolerante a alcalinidad, salinidad, inundaciones periódicas | 1, 2, 3, 4 |
| Lotus corniculatus | Trébol de pata de pájaro | Perenne, Mayormente erecta | Arenoso a arcilloso, pH superior a 6.2, rendimiento de BS: 6 a 14 t/ha. | Europa, Nueva Zelanda, América del Norte y del Sur, China e India | Tolerante a la salinidad, acidez, baja fertilidad y suelos mal drenados | 1, 3, 4, 5, 6 |
| Lotus japonicus | Trébol japonés | Perenne, de corta vida. Postrada- decumbente | Arenoso a arcilloso, sin datos disponibles sobre pH y rendimiento de BS. | Usado principalmente como especie modelo (no como forrajera) | Semi-tolerante al anegamiento y la sumersión | 7, 8 |
| Trifolium repens | Trébol blanco | Perenne, rastrero | Franco, arcilloso (rara vez arenoso), pH de 5.5 a 7, rendimiento de BS: 9 a 12 t/ha. | Nueva Zelanda, América del Norte, China, Australia y Sudamérica | Alta intolerancia a la sombra y suelos ácidos, alta persistencia con niveles elevados de nitrógeno. Ausente en suelos permanentemente anegados. | 9, 10, 11 |
| Trifolium fragiferum | Trébol frutilla | Perenne, rastrero | Arenoso, turba y arcilloso, pH de 5.5 a 9, rendimiento de BS: 3 a 6 t/ha. | Oeste de EE. UU., Nueva Zelanda y sur de Australia | Semi-tolerante a la sequía, salinidad, anegamiento y temperaturas extremas en comparación con el trébol blanco. | 12, 13 |
| Trifolium pratense | Trébol rojo | Perenne, erecto | Franco, franco limoso y arcilloso, pH de 6 a 7, rendimiento de BS: 4 a 18 t/ha. | Nueva Zelanda, Europa, América del Norte y del Sur, y Australia | Tolerante a salinidad, sequía y anegamiento, pero no en periodos prolongados. Tolerante a condiciones de baja luminosidad. | 9, 14 |
| Trifolium michelianum | Trébol balansa | Anual, Postrado a semi-erecto | Arenoso a arcilloso, pH de 4.5 a 8.0, rendimiento de BS: 5 a 8 t/ha. | Sur de Europa desde España hasta Turquía, sur y este de Australia | Tolerancia moderada al anegamiento, baja tolerancia a la salinidad. | 15, 16 |
| Melilotus albus | Trébol dulce | Anual o bienal, erecto- ramificado | Arenoso a arcilloso, pH de 6.5 a 7.5, rendimiento de BS: hasta 7-8 t/ha. | Europa central, Mediterráneo oriental, noroeste de Asia, EE. UU., Australia y Argentina | Moderadamente resistente al invierno y la sequía, tolerante a la salinidad, desarrolla phellem aerenquimático para la aireación interna de las raíces cuando está anegado. | 17, 18 |

<u>Referencias</u>: ¹Díaz et al. (2005); ² Dear et al. (2003); ³ Striker et al. (2005); ⁴ Striker et al. (2008); ⁵ Jones y Turkington (1986); ⁶ Bullard y Crawford (1995); ⁷ Pajuelo y Stougaard (2005), ⁸ Striker et al. (2012); ⁹ Marten (1989); ¹⁰ Jones y Kersten (1992); ¹¹ Burdon 1983; ¹² Smetham (1973); ¹³ Smith et al. (2023); ¹⁴ Satell et al. (1998); ¹⁵ Craig 1998; ¹⁶ Rogers y Noble, 1991; ¹⁷ Sparrow, Cochran y Sparrow (1993); ¹⁸ Rogers et al. 2008.

2.2.2) Diseño experimental

La obtención de las plantas para el desarrollo del experimento se logró mediante la germinación de semillas escarificadas de las ocho especies en bandejas de plástico con algodón y papel de filtro empapados en agua destilada. Las bandejas se colocaron en una

cámara de crecimiento a 25°C. Una vez germinadas, se transplantaron de dos a tres plántulas de cada especie en macetas de plástico de 0,5 L con un sistema de drenaje de tres agujeros, con sustrato Growmix (Growmix, Terrafertil, Buenos Aires, Argentina). Este sustrato consistía en compost de corteza fina, fertilizante, agente humectante, perlita y musgo Sphagnum con fibras finas, pH entre 5 y 5,8, 250-450 ppm de nitratos, 30-100 ppm de fosfatos y 200-300 ppm de potasio. Las macetas se colocaron en el jardín experimental de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Las plantas se dejaron crecer durante 60 días, lo que abarcó el período vegetativo evitando la floración. Se aplicaron tres tratamientos a estas plantas de 60 días durante períodos de 5 y 10 días (período de estrés), siguiendo un diseño completamente aleatorio con diez repeticiones: (i) control (C) - riego diario para mantener la capacidad de campo, (ii) sumersión completa de 5 días (sumersión corta - SC) y (iii) sumersión completa de 10 días (sumersión larga - SL). Los niveles de agua se mantuvieron aproximadamente 15-20 cm por encima de la altura de las plantas (excepto para Melilotus, que fue sumergido a un máximo de 5 cm debido a su altura mayor en comparación con las otras especies). Antes de aplicar estos tratamientos, se realizaron dos cosechas iniciales: primero, el día 0 antes de aplicar el tratamiento de sumersión larga a 5 repeticiones de las ocho especies, totalizando en 40 plantas de 60 días de edad (Fig. S2.1). Después de 5 días, se realizó otra cosecha inicial antes de aplicar el tratamiento de sumersión de corta duración a otras 5 repeticiones de las ocho especies, esta vez con 40 plantas de 65 días de edad (Fig. S2.1).

Se utilizaron un total de 15 contenedores plásticos de 1000 L (110 x 100 x 90 cm) para facilitar la aplicación de los tratamientos de sumersión y mantener niveles de agua estables durante todo el período experimental. Cada maceta se colocó en bandejas plásticas dentro de los contenedores, distribuidas al azar en cada contenedor. Cada uno de ellos contenía un total de 48 plantas, incluyendo seis unidades experimentales de cada una de las ocho especies, que se cosecharon en las determinadas fechas de cosecha para analizar los parámetros de crecimiento (Fig. S2.1). Por lo tanto, se utilizó un total de 720 plantas para aplicar los tratamientos. Para prevenir plagas, se colocaron finas redes de malla blanca sobre todos los contenedores, incluidos los controles, asegurando que la transmisión de luz no se viera interrumpida (transmisión > 95% de irradiancia). Primero, se aplicó el tratamiento de sumersión completa de 10 días. Después de 5 días, las macetas restantes que se mantuvieron bajo condiciones de control en el invernáculo y se trasladaron a los contenedores destinados al tratamiento de sumersión completa de 5 días, permitiendo que todos los tratamientos se cosecharan el mismo día (Fig. S2.1). Una vez transcurrido el tiempo requerido, las macetas se retiraron de los contenedores y se evaluó el rendimiento de las plantas durante 28 días adicionales post-sumersión para analizar el período de recuperación regadas a capacidad de campo. La temperatura diaria promedio del aire durante el experimento varió entre 20°C y 28°C.

2.2.3) Variables medidas

Las mediciones iniciales de biomasa se realizaron antes de aplicar el tratamiento de sumersión completa de larga duración (día 0) y nuevamente antes de aplicar el tratamiento de sumersión completa de corta duración (día 5). Tras el final de los tratamientos de sumersión, se monitorearon todas las plantas de cada especie para evaluar la supervivencia, ya que las plantas pueden marchitarse y morir si son intolerantes a este estrés (Striker 2012a; Zhang et al. 2017). Este monitoreo permitió separar cualitativamente las especies con supervivencia que no se vio comprometida de aquellas con varias plantas muertas debido a la sumersión. Posteriormente, se evaluó el rendimiento fisiológico de las plantas sobrevivientes durante el período de recuperación de 28 días siguiente a los tratamientos de sumersión (sumersión de 5 días y 10 días). Al final del experimento, se realizó la cosecha final. Durante todas las cosechas, las plantas se dividieron en los siguientes compartimentos: (i) biomasa foliar, (ii) biomasa de tallos (incluidos los estolones para T. repens), (iii) coronas y (iv) raíces. La biomasa aérea se calculó sumando (i) y (ii), mientras que la biomasa subterránea incluyó (iii) y (iv). Finalmente, la biomasa total de la planta se determinó sumando todos los compartimentos. El material cosechado se secó en una estufa a 60°C durante 4 días (hasta alcanzar un peso constante) y luego se pesó en una balanza de precisión.

2.2.3.1) Parámetros de crecimiento y partición de biomasa

Para cada especie, la tasa de crecimiento relativa (TCR) de las plantas se evaluó a lo largo de los períodos de tratamiento y las fases experimentales (sumersión y recuperación) utilizando la ecuación desarrollada por Hunt (1982):

TCR
$$(g g^{-1} d^{-1}) = [\ln(P_2) - \ln(P_1)] / (t_2 - t_1)$$

En la ecuación, P₂ y P₁ son los pesos secos de la biomasa vegetal correspondiente en los tiempos 2 y 1 respectivamente, siendo valor de P el promedio de biomasa del tratamiento (control, sumersión de 5 días y sumersión de 10 días), y t₂ - t₁ es el número de días entre los tiempos de muestreo (es decir, 10 días para el período de estrés y 28 días para el período de recuperación). Se calculó la TCR para las plantas enteras, así como la TCR de los diferentes compartimentos de la planta, incluyendo hojas, tallos y raíces, lo que permitió la comparación de los efectos diferenciales potenciales de los tratamientos en el crecimiento y la recuperación de la sumersión entre los órganos de la planta.

2.2.3.2) Variables fisiológicas

Las mediciones fisiológicas se realizaron después del período de sumersión para monitorear la conductancia estomática y el verdor de las hojas jóvenes expandidas, que indican síntomas de estrés. Estas mediciones incluyeron la fluorescencia de la clorofila a en las hojas jóvenes para evaluar el daño al aparato fotosintético después de 5 y 10 días de sumersión. El número de réplicas tomadas para las mediciones fisiológicas fue de 3 a 5 por especie y por combinación de tratamiento (3 réplicas para la conductancia estomática, 4 réplicas para la fluorescencia de la clorofila a y 5 réplicas para el verdor de las hojas).

Conductancia estomática

La conductancia estomática de las hojas jóvenes completamente expandidas en disposiciones superiores se midió cerca del mediodía utilizando un porómetro de hojas (modelo SC-1; Decagon Devices, Pullman, WA, EE. UU.). Esta variable permite evaluar la pérdida de agua a través de la transpiración y la facilitación de la difusión de CO₂ en las hojas para la fotosíntesis. Las mediciones se realizaron dos veces por semana durante las primeras semanas y una vez por semana posteriormente, con 3 réplicas por tratamiento y especie.

Verdor de las hojas jóvenes como indicador de estrés

El verdor de las hojas se midió en hojas jóvenes completamente expandidas utilizando un medidor de clorofila portátil (SPAD-502; Konica Minolta Sensing, Osaka, Japón). Este

parámetro puede indicar la ausencia de estrés si no hay cambios, o en el caso que disminuya, indica amarillamiento de las hojas siendo este un signo de degradación de la clorofila causada por el estrés por sumersión (ver Manzur et al. 2009). Se eligieron hojas jóvenes para la medición porque el nitrógeno suele exportarse de las hojas más viejas, incluso en plantas no estresadas o levemente estresadas. Por lo tanto, las caídas en los valores de verdor en las hojas jóvenes son verdaderos indicadores de un estrés severo. Las mediciones se realizaron en las mismas fechas que la conductancia estomática, con 5 réplicas por tratamiento y especie.

Fluorescencia de clorofila-a

La fluorescencia de clorofila *a* se midió en hojas superiores completamente expandidas tras un período de adaptación a la oscuridad de 20 minutos, utilizando pinzas de hoja y un fluorómetro portátil (PAR-Fluorpen FP 100-MAX-LM fluorómetro, Photon Systems Instruments, República Checa). A partir del test OJIP se pueden derivar varios parámetros fotosintéticos; en este caso, se enfocó en el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PSII), Fv/Fm, y ABS/RC, que es el flujo de luz absorbido por las clorofílas de la antena (ABS) por centro de reacción (RC). En la mayoría de las plantas, se obtienen valores óptimos en alrededor de 0.83 para Fv/Fm; donde valores menores podrían indicar exposición a estrés, en particular mostrando un grado de fotoinhibición debido a daño en el PSII (Maxwell y Johnson 2000). Mientras que el tamaño aparente de la antena del PSII se puede estimar mediante ABS/RC (Strasser et al. 2004). Un aumento en ABS/RC puede sugerir menos centros de reacción operacionales o una disminución en la eficiencia de captura de energía, a menudo en respuesta al estrés ambiental. Las mediciones se realizaron en los días 1, 5, 13 y 26 posteriores a la sumersión, con 4 réplicas por tratamiento y especie.

2.2.4) Análisis estadísticos

Las respuestas de biomasa total al final del experimento para las especies sobrevivientes se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), con 'especie' y 'sumersión' como factores principales. Cuando se detectaron interacciones significativas, se utilizaron pruebas *post hoc*, como la Diferencia Mínima Significativa (DMS) y las pruebas protegidas

de Fisher, para determinar el efecto de los tratamientos entre especies. Además, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para explorar el comportamiento de las especies de *Lotus* y *Trifolium*, utilizando la tasa de crecimiento relativa (TCR) de varias variables de respuesta de biomasa, incluyendo biomasa total de la planta, biomasa aérea y subterránea, y biomasa de componentes individuales (hojas, tallos, coronas y raíces). Estas evaluaciones se realizaron por separado para los períodos de estrés y recuperación, considerando los arriba mencionados escenarios de sumersión de 5 días y 10 días de duración. Los datos de conductancia estomática, verdor de las hojas y fluorescencia de clorofila *a* se analizaron mediante un ANOVA de tres vías, con 'especie', 'sumersión' y 'tiempo' como factores principales. Se aplicaron pruebas *post hoc* de DMS para comparaciones entre tratamientos cuando las interacciones fueron significativas. La normalidad y la homogeneidad de varianzas se verificaron antes de cada análisis y se transformaron los datos de ser necesario. Todos los resultados se presentan como medias \pm errores estándar. Las pruebas estadísticas y los análisis gráficos se realizaron con GraphPad Prism versión 9.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.).

Nota: En las figuras y tablas, los valores numéricos con punto decimal (.) deben interpretarse como si utilizaran coma decimal (,), de acuerdo con la convención numérica empleada en el resto del documento.

2.3) Resultados

2.3.1) Supervivencia de especies a la sumersión completa a corto y largo plazo

El análisis de supervivencia de ocho especies de leguminosas bajo tratamientos de control, 5 días de sumersión y 10 días de sumersión reveló una variabilidad significativa entre especies (Tabla 2.2). Todas las especies de *Lotus—Lotus tenuis*, *Lotus corniculatus* y *Lotus japonicus*—mostraron un 100% de supervivencia en todas las condiciones de estrés, lo que demuestra una alta tolerancia a la sumersión, evaluada al final del experimento (28 días después de la desumersión). De manera similar, *Trifolium repens* y *Trifolium fragiferum* mantuvieron una supervivencia del 100%. En contraste, *Trifolium pratense* mostró sensibilidad moderada, con tasas de supervivencia que bajaron al 70% en ambos tratamientos de sumersión. *Trifolium michelianum* mostró una alta sensibilidad, con una disminución de

la supervivencia del 60% después de 5 días de sumersión y al 10% después de 10 días. *Melilotus albus* fue la leguminosa forrajera más sensible, mostrando una ausencia total de supervivencia bajo sumersión. En las secciones siguientes, se presentarán los resultados de la acumulación de biomasa y la actividad fisiológica de las hojas únicamente para las especies que sobrevivieron.

| Supervivencia (%) Especies/Tratamientos | Control | 5d-sumersión | 10d-sumersión |
|---------------------------------------------------|---------|--------------|---------------|
| Lotus tenuis | 100 | 100 | 100 |
| Lotus corniculatus | 100 | 100 | 100 |
| Lotus japonicus | 100 | 100 | 100 |
| Trifolium repens | 100 | 100 | 100 |
| Trifolium fragiferum | 100 | 100 | 100 |
| Trifolium pratense | 100 | 70 | 70 |
| Trifolium michelianum | 100 | 60 | 10 |
| Melilotus albus | 100 | 0 | 0 |

Tabla 2.2. Porcentaje de supervivencia (%) de ocho especies de leguminosas, ordenadas de mayor a menor supervivencia bajo los tratamientos de Control, sumersión de 5 días y sumersión de 10 días, evaluadas al final del experimento (28 días después de la desumersión).

2.3.2) Acumulación de biomasa luego de la sumersión y su recuperación

Inmediatamente después de la desumersión, los resultados de biomasa total para las tres especies de *Lotus* y las tres especies de *Trifolium* bajo tratamientos de control, 5 días de sumersión y 10 días de sumersión, revelaron patrones distintos (Fig. 2.1a, Tabla 2.3). Las condiciones de control generalmente resultaron en tener la mayor acumulación de biomasa en la mayoría de las especies. En *Lotus tenuis*, la biomasa bajo 5 días de sumersión fue un 23% menor que en el tratamiento de control, y un 31% menor bajo 10 días de sumersión. *Lotus corniculatus* y *Lotus japonicus* no mostraron diferencias significativas entre el control y los 5 días de sumersión, pero su biomasa fue 41% y 42% menor bajo 10 días de sumersión, respectivamente. Entre las especies de *Trifolium*, *Trifolium repens* mostró una reducción de biomasa del 41% bajo 5 días de sumersión y del 57% bajo 10 días de sumersión. *Trifolium fragiferum* tuvo una reducción del 32% bajo 5 días de sumersión y del 51% bajo 10 días. *Trifolium pratense* experimentó la mayor reducción, con una biomasa 55% menor en ambos tratamientos de sumersión en comparación con el control.

Durante la fase de recuperación, los resultados de biomasa total mostraron una capacidad de recuperación diferencial entre las especies (Fig. 2.1b, Tabla 2.3). *Lotus tenuis* no mostró diferencias significativas en su biomasa entre el control y el tratamiento con 5 días de sumersión, mientras que bajo 10 días de sumersión su biomasa se redujo en un 47 %. *Lotus corniculatus* mostró una biomasa aproximadamente 53% menor bajo 5 días de sumersión y 46% menor bajo 10 días de sumersión. *Lotus japonicus* mostró una disminución de biomasa del 8% y 52% bajo 5 y 10 días de sumersión, respectivamente. Entre las especies de *Trifolium, Trifolium repens* tuvo una biomasa 50% y 75% menor bajo 5 días y 10 días de sumersión. *Trifolium fragiferum* mostró una disminución de aproximadamente 60% y 76% en los mismos tratamientos. *Trifolium pratense* experimentó la mayor reducción, con una biomasa aproximadamente 80% menor en ambos tratamientos de sumersión. En general, las especies de *Lotus* demostraron una mejor tolerancia a la sumersión que las especies de *Trifolium*, según la evaluación después del período de recuperación de 28 días.





Tabla 2.3. Valores F del ANOVA de dos vías (factores: 'especie' y 'tratamiento') para la biomasa total como respuestas a los tratamientos de las 6 especies de leguminosas forrajeras. ^A***: $P \le 0,001$; **: $P \le 0,005$; *: $P \le 0,05$. Los análisis se realizaron por separado en los datos al final del periodo de estrés y del periodo de recuperación.

| | Ι | Periodo de estrés | Período de recuperación | | | |
|-------|----------------|-------------------|-------------------------------|----------------|-----------------|----------------|
| | Especies (Esp) | Tratamiento (T) | $\operatorname{Esp} \times T$ | Especies (Esp) | Tratamiento (T) | $Esp \times T$ |
| Total | 3.71** | 57.59*** | 2.07^{*} | 8.42*** | 72.69*** | 2.58* |

^A. Los grados de libertad para cada fuente de variación fueron: 5 ('especie'), 2 ('tratamiento'), 10 ('especie × tratamiento') y 162 ('error').

2.3.3) El análisis de componentes principales separa a las especies de *Lotus* de las especies de *Trifolium* en su recuperación del estrés por sumersión

El gráfico de Análisis de Componentes Principales (ACP) (Fig. 2.2a) ilustra la distribución de tres especies de Lotus y tres de Trifolium basadas en siete variables relacionadas con la tasa de crecimiento relativo (TCR) de diferentes compartimentos de la planta (hojas, tallos, coronas, raíces, biomasa total, y agrupados en biomasa aérea y subterránea) durante los tratamientos de sumersión completa. Para el período de sumersión, el primer componente principal (CP1) explica el 72,5% de la variabilidad, mientras que el segundo componente principal (CP2) explica el 17,2%, lo que suma un total de 89,7% de la varianza total. Lotus tenuis y L. corniculatus están posicionados hacia el lado derecho del gráfico, asociados a altos valores en las variables relacionadas con la biomasa, lo que indica una fuerte tolerancia a la sumersión. Lotus japonicus se sitúa más cerca del origen, mostrando una asociación moderada con las variables de biomasa. En contraste, especies de Trifolium como Trifolium repens y T. fragiferum se encuentran cerca del origen, pero ligeramente hacia el lado negativo del CP1, lo que indica una tolerancia moderada. Trifolium pratense está más a la izquierda, especialmente bajo condiciones de sumersión, resaltando su bajo rendimiento. Los tratamientos de control están generalmente más cerca de las variables de biomasa, lo que indica un mejor rendimiento general, mientras que los tratamientos de sumersión de 5 y 10 días muestran un mayor desplazamiento, especialmente este último estrés.

El ACP durante la fase de recuperación (Fig. 2.2b) muestra que el primer componente principal explica el 76,3% de la variabilidad, mientras que el segundo componente principal

explica el 11,3%, sumando un total de 87,6% de la varianza total. *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus* se sitúan más cerca de las variables relacionadas con la biomasa, lo que indica un buen rendimiento en la recuperación. *Lotus japonicus* se posiciona hacia la parte superior derecha, asociado con altos valores en las coronas, lo que indica una recuperación positiva. En contraste, *Trifolium repens* y *Trifolium fragiferum* están cerca del origen, lo que indica una recuperación moderada, mientras que *Trifolium pratense* se encuentra más hacia la izquierda, destacando su pobre rendimiento en la fase de recuperación.

A lo largo de ambas fases, las especies de *Lotus* mantienen una asociación más cercana con las variables relacionadas con la biomasa, lo que indica mejor tolerancia y recuperación. *Lotus tenuis* y *L. corniculatus* exhiben una fuerte recuperación tras la sumersión, mientras que *L. japonicus* muestra una mejora significativa durante la recuperación, particularmente en el mantenimiento del crecimiento de las coronas. En contraste, las especies de *Trifolium* muestran un rendimiento moderado a bajo en condiciones de sumersión, con leves mejoras durante la recuperación. *Trifolium repens* y *T. fragiferum* exhiben una recuperación moderada, mientras que *Trifolium pratense* presenta consistentemente un rendimiento más bajo. En general, los gráficos de ACP destacan la superior tolerancia y recuperación de las especies de *Lotus* en comparación con las de *Trifolium* bajo estrés por sumersión.



Figura 2.2. Gráfico de Análisis de Componentes Principales (ACP) que muestra las variables y especies de *Lotus* y *Trifolium* bajo tratamientos de sumersión completa durante el periodo de estrés (a) y tras un periodo de recuperación de 28 días (b). Los análisis se generaron utilizando siete variables a través de la tasa de crecimiento relativo (TCR) de la biomasa total (BTotal), biomasa aérea (BAérea, que incluye hojas, tallos y estolones para *T. repens*), biomasa subterránea (BSubterránea, que incluye coronas y raíces), hojas (Hojas), tallos (Tallos), coronas (Coronas) y raíces (Raíces). Las especies de *Lotus* están representadas por triángulos: *Lotus tenuis* (LT), *Lotus corniculatus* (LC) y *Lotus japonicus* (LJ). Las especies de *Trifolium* están representadas por cuadrados: *Trifolium repens* (TR), *Trifolium fragiferum* (TF) y *Trifolium pratense* (TP). Los diferentes colores representan los tratamientos: control en gris, sumersión de 5 días en violeta y sumersión de 10 días en verde. El porcentaje de variabilidad explicada se indica en cada eje.

2.3.4) Las respuestas fisiológicas foliares después de la desumersión indican una mejor recuperación en especies de *Lotus* en comparación con especies de *Trifolium*

La conductancia estomática varió según la especie, en respuesta a los tratamientos de sumersión a lo largo del tiempo tras la desumersión (interacción especie x tratamiento y tratamiento x tiempo ambas significativas; Tabla 2.4). Como era de esperar, dadas las mejores respuestas de crecimiento, todas las especies de *Lotus* mostraron una conductancia estomática más alta que el control (establecido en 100% para facilitar la comparación) al inicio de ambos tratamientos de desumersión (Fig. 2.3a, b, c). Sin embargo, a medida que avanzaron los días de recuperación, los valores convergieron gradualmente hacia los del control hasta el final del experimento. En las especies de *Trifolium*, la conductancia estomática fue menor (*T. repens* y *T. pratense*) o similar (*T. fragiferum*) a los controles, en contraste con lo observado en las especies de *Lotus* (Fig. 2.3d, e, f). Posteriormente, los valores se asemejaron a los controles y disminuyeron hacia el final del experimento, lo que indica una recuperación más pobre en comparación con las especies de *Lotus*.



Figura 2.3. Conductancia estomática en hojas jóvenes completamente expandidas de especies de *Lotus* (paneles superiores: (a) *L. tenuis*, (b) *L. corniculatus* y (c) *L. japonicus*) y especies de *Trifolium* (paneles inferiores: (d) *T. repens*, (e) *T. fragiferum* y (f) *T. pratense*) durante el periodo de recuperación tras 5 y 10 días de sumersión completa. Nótese que los valores se presentan en relación

con los controles, establecidos en 100%, para facilitar la observación de las respuestas a los tratamientos. Los símbolos/líneas violetas representan la sumersión de 5 días (5-d sumersión), y los símbolos/líneas verdes representan la sumersión de 10 días (10-d sumersión). Las barras dentro de las subfiguras representan los valores porcentuales de DMS en relación con el control, siendo 36% para la interacción especie * tratamiento y 33% para la interacción tratamiento * tiempo. La interacción entre estos factores no fue significativa (ver Tabla 2.4).

El verdor foliar se midió en hojas apicales para evaluar los niveles de estrés, ya que las hojas jóvenes reflejan con mayor precisión los síntomas de estrés severo. El verdor foliar dependía de la combinación de especies y tratamientos, y varió con el tiempo tras la desumersión (Fig. 2.4; Tabla 2.4). Curiosamente, se encontró que las especies de *Lotus*, particularmente las sometidas a sumersión prolongada, exhibieron valores de verdor más altos que los controles durante al menos dos semanas después de la desumersión, lo que indica una mayor concentración de nitrógeno en las hojas jóvenes de estas especies de *Lotus* (Fig. 2.4a, b, c). Por el contrario, en las especies de *Trifolium*, los valores de verdor foliar fueron más bajos (*T. repens* y *T. pratense*; Fig. 2.4d, f) que los controles, lo que indica estrés por sumersión, o fueron similares a los controles en *T. fragiferum* (Fig. 2.4e).



Figura 2.4. Verdor foliar en hojas jóvenes/apicales de especies de *Lotus* (paneles superiores: (a) *L. tenuis*, (b) *L. corniculatus* y (c) *L. japonicus*) y especies de *Trifolium* (paneles inferiores: (d) *T. repens*,

(e) *T. fragiferum* y (f) *T. pratense*) durante el periodo de recuperación tras 5 y 10 días de sumersión completa. Nótese que los valores se presentan en relación con los controles, establecidos en 100%, para facilitar la observación de las respuestas a los tratamientos. Los símbolos/líneas violetas representan la sumersión de 5 días (5-d sumersión), y los símbolos/líneas verdes representan la sumersión de 10 días (10-d sumersión). Las barras dentro de las subfiguras representan los valores porcentuales de DMS en relación con el control, siendo 10% para la interacción especie * tratamiento y 15% para la interacción especie * tiempo. La interacción entre estos factores no fue significativa (ver Tabla 2.4).

El rendimiento cuántico máximo del PSII (Fv/Fm) y el flujo de absorción de luz por centro de reacción (ABS/RC) en las hojas jóvenes totalmente expandidas dependieron de la combinación de especies y tratamiento, y variaron con el tiempo después de la desumersión (Tabla 2.4; Fig. 2.5 y 2.6). En las especies de *Lotus, L. tenuis* y *L. japonicus* exhibieron valores de Fv/Fm consistentemente similares entre todos los tratamientos con variaciones menores (Fig. 2.5a, b, c). *L. corniculatus* experimentó una notable disminución en Fv/Fm inmediatamente después de la desumersión, particularmente en el tratamiento de 5 días, pero rápidamente se recuperó a niveles similares al control. Entre las especies de *Trifolium, T. repens* no mostró diferencias entre tratamientos en ninguna fecha posterior a la sumersión (Fig. 2.5d). *T. fragiferum* mostró un aumento en Fv/Fm, especialmente en el tratamiento de 10 días, pero demostró una recuperación a medida que todos los tratamientos convergieron (Fig. 2.5e). *T. pratense*, la especie menos tolerante, experimentó una caída inicial pronunciada en Fv/Fm tras la desumersión, pero siguió una trayectoria de recuperación similar a la del control solo hacia el final del experimento (Fig. 2.5f).



Días luego de la desumersión

Figura 2.5. Rendimiento cuántico máximo de PSII (Fv/Fm) en hojas jóvenes completamente expandidas de especies de *Lotus* (paneles superiores: (a) *L. tenuis*, (b) *L. corniculatus* y (c) *L. japonicus*) y especies de *Trifolium* (paneles inferiores: (d) *T. repens*, (e) *T. fragiferum* y (f) *T. pratense*) durante el periodo de recuperación tras 5 y 10 días de sumersión completa. Los símbolos/líneas grises representan el tratamiento de control, los símbolos/líneas violetas representan la sumersión de 5 días (5-d sumersión), y los símbolos/líneas verdes representan la sumersión de 10 días (10-d sumersión). Las barras dentro de las subfiguras representan los valores de DMS (0,125) para la interacción especie * tratamiento * tiempo (ver Tabla 2.4).

En cuanto a ABS/RC (Fig. 2.6), *T. pratense* mostró la respuesta más considerable, con plantas previamente sumergidas exhibiendo valores superiores a los controles, lo que indica síntomas de estrés prolongados al menos durante las primeras dos semanas después de que el agua retrocedió. *L. corniculatus* y *T. fragiferum* mostraron valores altos de ABS/RC para ambos tratamientos de sumersión (5 y 10 días) en el primer día de medición después del estrés, pero rápidamente se ajustaron a valores equivalentes a los controles durante el resto del período de recuperación.



Días luego de la desumersión

Figura 2.6. Flujo de absorción de clorofilas antena por centro de reacción (ABS/RC) en hojas jóvenes completamente expandidas de especies de *Lotus* (paneles superiores: (a) *L. tenuis*, (b) *L. corniculatus* y (c) *L. japonicus*) y especies de *Trifolium* (paneles inferiores: (d) *T. repens*, (e) *T. fragiferum* y (f) *T. pratense*) durante el periodo de recuperación tras 5 y 10 días de sumersión completa. Los símbolos/líneas grises representan el tratamiento control, los símbolos/líneas violetas representan la sumersión de 5 días (5-d sumersión), y los símbolos/líneas verdes representan la sumersión de 10 días (10-d sumersión). Las barras dentro de las subfiguras representan los valores de DMS (2,137) para la interacción especie * tratamiento * tiempo (ver Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Valores F del ANOVA de tres vías (factores: 'especie', 'tratamiento' y 'tiempo') para la conductancia estomática, Fv/Fm, ABS/RC y el verdor de las hojas de las plantas de las 6 especies de leguminosas forrajeras en recuperación tras los tratamientos de sumersión^A. ***: $P \le 0,001$; **: $P \le 0,01$; *: $P \le 0,05$.

| Variables | Especies (Es | p) Tratamiento (T) | Tiempo | $Esp \times T$ | Esp × tiempo | T × tiempo | $Esp \times T \times tiempo$ |
|----------------------------|--------------|--------------------|----------|----------------|--------------|------------|------------------------------|
| Conductancia estomática | 20.00*** | 12,72*** | 1,47 | 2.58** | 1.19 | 2.59** | 0.98 |
| Verdor foliar | 23.94*** | 5.23** | 12.15*** | 10.93*** | 1.93** | 1.29 | 0.98 |
| Fv/Fm | 10.33*** | 5.79** | 87.67*** | 3.92*** | 1.31 | 1.04 | 1.51* |
| ABS/RC | 6.98*** | 0.38 | 48.73*** | 5.67*** | 1.91* | 2.74** | 2.78*** |

^A. Los grados de libertad para cada fuente de variación fueron: 5 ('especie'), 2 ('tratamiento'), 10 ('especie × tratamiento'). 4, 20, 8, 40 y 180-255-258 ('tiempo', 'especie × tiempo', 'tratamiento × tiempo', 'especie × tratamiento × tiempo' y 'error' para conductancia estomática, Fv/Fm y ABS/RC, respectivamente), 6, 30, 12, 60, 493 ('tiempo', 'especie × tiempo', 'tratamiento × tiempo', 'especie × tratamiento × tiempo' y 'error' para el verdor foliar).

2.4) Discusión

Los resultados demuestran que las especies de Lotus, en particular la especie L. tenuis, exhiben una tolerancia superior a la sumersión completa y una mejor recuperación en comparación con las tres especies forrajeras de Trifolium que sobrevivieron a la inundación, como lo separa el análisis de componentes principales (ACP). Durante la fase de recuperación, las especies de *Lotus* mantuvieron una biomasa significativamente mayor y mostraron mejores parámetros fisiológicos, a través de una mayor conductancia estomática y un aumento en la concentración de clorofila (es decir, el verdor) en las hojas jóvenes, junto con una rápida recuperación del rendimiento cuántico máximo del PSII y el flujo de luz absorbida por centro de reacción. En contraste, T. pratense, dentro de aquellas especies que lograron recuperarse tras la sumersión, mostró la peor tolerancia y recuperación en estos parámetros fisiológicos. Estos hallazgos indican que las especies de Lotus poseen características inherentes que les permiten tolerar y recuperarse del estrés por sumersión de manera más efectiva que las especies de Trifolium. Algunas especies, como Melilotus albus y T. michelianum, demostraron ser intolerantes a la sumersión completa, marchitándose y muriendo poco tiempo después de que el agua retrocediera. T. michelianum muestra una supervivencia comprometida a medida que aumenta la duración de la sumersión. En las siguientes secciones se discuten los principales hallazgos, incluidos los mecanismos novedosos de tolerancia y recuperación frente a la sumersión y sus implicancias.

2.4.1) La supervivencia bajo sumersión completa varía entre las leguminosas forrajeras

La supervivencia de las plantas es crítica al considerar el establecimiento de pasturas y el mantenimiento del stand en condiciones de estrés. La sumersión comprometió la supervivencia de tres de las nueve especies en diferentes grados (Tabla 2.2): Melilotus albus, Trifolium michelianum y T. pratense. Es importante destacar que el anegamiento y la sumersión son estreses distintos, y las plantas pueden tolerar uno, pero no el otro. Por ejemplo, T. michelianum es considerado tolerante al anegamiento e incluso se utiliza como control en evaluaciones de tolerancia en otras especies de leguminosas con tolerancia desconocida (véase Striker et al. 2015 para Melilotus siculus, Kidd et al. 2020 para Ornithopus spp. y Enkhbat et al. 2021 para Trifolium subterraneum). Sin embargo, los resultados muestran que la supervivencia de T. michelianum disminuye significativamente cuando el período de sumersión se extiende de 5 a 10 días, lo que provoca marchitamiento y muerte sin reanudar su crecimiento. En contraste, T. pratense, considerado sensible al anegamiento (Striker y Colmer 2017), mostró una tolerancia considerable a la sumersión en este experimento, con un 70% de las plantas sobreviviendo tanto a los períodos de sumersión de 5 días como los de 10 días. Por otro lado, M. albus, que se considera de tolerancia intermedia al anegamiento (Rogers et al. 2008), demostró ser completamente sensible a la sumersión. Ninguna de las plantas de M. albus sobrevivió a los 5 ni a los 10 días de sumersión completa, señalando a esta especie como inadecuada para áreas propensas a inundaciones que puedan llevar a la sumersión de las plantas.

2.4.2) Recuperación superior tras la sumersión en *Lotus* spp. en comparación con *Trifolium* spp.

Las especies de *Lotus*, en particular *L. tenuis*, mostraron una notable recuperación después del retroceso del agua, lo que coincide con su reputación de ser tolerante tanto al anegamiento (Striker et al. 2005; 2011) como a la sumersión (Manzur et al. 2009; Striker et al. 2012; Di Bella et al. 2020; Buraschi et al. 2024b). Esta especie experimentó la menor reducción de biomasa foliar al final de la sumersión, lo que favoreció el rebrote (74% y 50% respecto a

los controles, después de 5 y 10 días de sumersión, respectivamente; Tabla S2.1), reforzando la noción de que la biomasa foliar remanente es crucial para la recuperación de *L. tenuis* tras la sumersión completa (ver también Buraschi et al. 2024b). *L. corniculatus* y *L. japonicus* fueron menos tolerantes que *L. tenuis*, pero todas las especies de *Lotus* mostraron una biomasa final entre el 72% y el 52% respecto a los controles, lo que demostró un mejor rendimiento que las especies de *Trifolium*, que solo alcanzaron entre el 38% y el 22% de la biomasa en comparación con los controles (Fig. 2.1). Este estudio indica que *L. japonicus*, con su alta tolerancia a 5 días de sumersión, es una especie modelo adecuada para estudiar este estrés. *L. japonicus* ha emergido como un modelo para leguminosas, respaldado por recursos genéticos disponibles como ecotipos, líneas mutantes, mapas genéticos y líneas recombinantes endogámicas (Striker et al. 2014; Buraschi et al. 2020). Además, *L. japonicus* está estrechamente relacionado con las especies forrajeras de *Lotus* (Young et al. 2005), lo que sugiere que los mecanismos descubiertos en esta especie pueden ser transferibles a otras especies forrajeras relacionadas.

Entre las especies de Trifolium, T. repens mostró una tendencia a un mayor crecimiento tras la sumersión, especialmente después de un estrés de corta duración. Trifolium fragiferum experimentó una reducción moderada en la biomasa, mientras que T. pratense mostró la recuperación más pobre, independientemente de la duración de la sumersión (Figs. 2.1 y 2.2). A diferencia de Lotus spp., la recuperación diferencial en Trifolium spp. no estuvo relacionada con diferencias en la biomasa foliar restante como indicador de la fijación de carbono potencial, ya que estos valores fueron similares entre las especies: T. repens (65% y 61%), T. fragiferum (69% y 55%) y T. pratense (65% y 52% de biomasa foliar en comparación con los controles bajo 5 y 10 días de sumersión, respectivamente; Tabla S2.1). Un patrón similar se observó en la biomasa de las raíces, con reducciones dentro de un rango similar entre las especies de Trifolium (65-69% de los controles después de 5 días y 52-61% de los controles después de 10 días de sumersión; Tabla S2.1). Por lo tanto, en lugar de un impacto en la cantidad de raíces que sustentan la absorción de agua o en la biomasa foliar que fija carbono mediante la fotosíntesis, el comportamiento de recuperación diferencial de estas especies probablemente esté más relacionado con la funcionalidad fisiológica de estos tejidos remanentes. Finalmente, la originalidad de estos hallazgos se ve realzada por el hecho de que existe poca literatura sobre la recuperación de estas especies tras la sumersión, con la excepción de Huber et al. (2009), quienes encontraron que el rebrote de *T. repens* y *T. fragiferum* después de la fragmentación bajo inundación estaba influenciado por el tamaño de la planta, con entrenudos más grandes correlacionados negativamente con la supervivencia y el crecimiento tras la fragmentación.

2.4.3) Respuestas fisiológicas foliares durante la recuperación explican la mejor recuperación de *Lotus* spp.

La superior tolerancia de las especies de Lotus a la sumersión puede atribuirse a varios mecanismos fisiológicos. La alta conductancia estomática observada en L. tenuis y L. corniculatus tras la desumersión sugiere un restablecimiento rápido del equilibrio hídrico y de la actividad fotosintética, lo cual es crucial para la recuperación (Luo et al. 2009; 2011; Striker y Ploschuk 2018). Además, los altos valores de Fv/Fm y los bajos valores de ABS/RC indican una mínima fotoinhibición en estas especies, lo que permite un uso eficiente de la energía durante el período de recuperación (Figs. 2.5 y 2.6). Estos rasgos fisiológicos probablemente contribuyen a la mayor acumulación de biomasa observada, especialmente en L. tenuis, durante la fase de recuperación en comparación con las especies de Trifolium. Así, se observó que luego de la sumersión de 10 días, las tres especies de Trifolium mostraron, durante la primera semana de recuperación, una baja conductancia estomática con respecto a los controles, hecho que puede derivar en limitaciones estomáticas a la asimilación de CO₂. La evolución de la conductancia estomática tras la sumersión ha sido monitoreada en especies de pastos (Striker y Ploschuk 2018); a diferencia de este estudio, donde las especies de Lotus desumergidas presentaron valores iniciales incluso más altos que los controles (valores que luego se mantuvieron cerca de los niveles de control, Fig. 2.3), pastos sensibles como Bromus catharticus y Dactylis glomerata no pudieron alcanzar una recuperación completa incluso dos semanas después de la desumersión. Además, entre las especies de Lotus, L. corniculatus mostró la recuperación más lenta de Fv/Fm, tardando 5 días en alcanzar valores similares al control. En contraste, entre las especies de Trifolium, T. pratense experimentó fotoinhibición (bajos valores de Fv/Fm) durante 13 días después del retroceso del agua. Sin embargo, es notable que todas las especies de Lotus y Trifolium recuperaron sus valores de Fv/Fm al final del período de recuperación. Estos datos sugieren diferentes capacidades entre las especies para recuperar la funcionalidad fotosintética. Esto es consistente con las observaciones de Luo et al. (2009; 2011), donde Alternanthera philoxeroides (una maleza hidrófita perenne invasora C3) reanudó el crecimiento foliar tres días después de la desumersión, acompañado de la restauración de la capacidad fotosintética máxima, mientras que *Hemarthria altissima* (un pasto perenne C4) tardó más días en alcanzar una recuperación máxima.

2.4.4) La deficiencia de nitrógeno y su impacto en la fluorescencia de clorofila y fotosíntesis

La deficiencia de nitrógeno es conocida por afectar la fluorescencia de clorofila y la fotosíntesis, reduciendo la eficiencia fotoquímica máxima del PSII, como se ha observado en las leguminosas *T. alexandrinum* y *Sulla carnosa* (Barhoumi 2024). La sumersión también afecta la dinámica del nitrógeno en las hojas jóvenes de especies de *Lotus* y *Trifolium*, como lo indican los valores variables de SPAD después de la desumersión. En las especies de *Lotus*, el verdor de las hojas, correlacionada con la concentración de clorofila y utilizada como *proxy* para el nitrógeno, fue mayor que en las plantas de control, particularmente en las primeras dos semanas tras el tratamiento de sumersión de 10 días (Fig. 2.4). Esta mayor concentración de nitrógeno podría explicar el mejor rendimiento fotosintético de *Lotus* en comparación con las especies de *Trifolium*, así como la rápida recuperación de la eficiencia fotoquímica máxima (Fv/Fm) después de la desumersión. Este aparente aumento del nitrógeno en las leguminosas de *Lotus* podría servir como un mecanismo que refuerza la recuperación de la planta frente el estrés y como un almacenamiento de nitrógeno removilizado de raíces y hojas senescentes para generar un crecimiento adicional.

En contraste, las especies menos tolerantes a la sumersión, como *T. pratense* y *T. repens*, mostraron, en promedio, valores más bajos de verdor foliar, indicando un reducido potencial para recuperar rápidamente su capacidad fotosintética. Esto podría estar vinculado a lesiones por estrés en las hojas causadas por la acumulación de especies reactivas del oxígeno, lo que lleva a lesiones oxidativas en las membranas y pérdida de proteínas, como se observó en *T. pratense* bajo estrés de hipoxia (Simova-Stoilova et al. 2012). Además, el sistema radical más reducido después de la sumersión (Tabla S2.1) podría haber disminuido la captación y el transporte de nitrógeno, lo que finalmente resultó en un menor verdor y, por ende, en menores valores de nitrógeno foliar observados en tejidos jóvenes. De manera similar, se observó un bajo y persistente verdor en las hojas jóvenes tras la desumersión en el pasto *Dactylis glomerata* sensible a la sumersión (Striker y Ploschuk 2018). Se requiere una investigación adicional sobre la generación del estrés oxidativo y el potencial de

captación de nitrógeno después de la sumersión para comprender efectivamente los mecanismos detrás de las consecuencias de este estrés.

2.5) Conclusión

Las especies de *Lotus*, especialmente *L. tenuis*, exhiben una superior tolerancia y capacidad de recuperación tras la sumersión completa en comparación con las especies de *Trifolium*. Esta mejor tolerancia se puede atribuir a varios mecanismos fisiológicos, incluyendo una mayor conductancia estomática al desumergirse, una rápida recuperación del rendimiento cuántico máximo del PSII (Fv/Fm) y un aumento en la concentración de nitrógeno (es decir, verdor) en las hojas jóvenes, lo que ayuda a la fotosíntesis y al crecimiento después del estrés. *Lotus japonicus*, como modelo de leguminosa, parece ser prometedora para estudiar mecanismos específicos de tolerancia a la sumersión, que podrían transferirse potencialmente a especies forrajeras de *Lotus*.

Desde una perspectiva práctica, *T. pratense* no se recomienda para áreas propensas a inundaciones. *T. repens* puede ser útil en condiciones de inundación a corto plazo, pero su hábito de crecimiento postrado puede resultar en sumersión incluso en aguas poco profundas. *L. corniculatus* muestra una tolerancia intermedia y es más prometedor debido a su mayor altura. *L. tenuis* presenta una notable capacidad de recuperación tras la sumersión, por lo que su incorporación en pasturas y pastizales naturales sometidos a inundaciones intensas puede mejorar la resistencia y productividad de los sistemas de pastoreo. Finalmente, *T. michelianum* y *Melilotus albus* no se consideran adecuadas para tolerar condiciones de sumersión, ya sean de corta o larga duración. Estos hallazgos informarán a los productores ganaderos sobre la leguminosa forrajera óptima para una determinada textura de suelo y condiciones topográficas en escenarios de riesgo de sumersión.

Ajustes en el crecimiento de accesiones de *Lotus tenuis* y *L. corniculatus* durante y luego de la sumersión parcial y completa

<u>Artículo de este capítulo</u>: Buraschi, F. B., Mollard, F. P. O., Di Bella, C. E., Grimoldi, A. A. y Striker, G. G. 2024. Shaking off the blow: plant adjustments during submergence and post-stress growth in *Lotus* forage species. Functional Plant Biology, 51: FP23172.

3.1) Introducción

La inundación provoca una limitación muy significativa para la producción de cultivos y forraje en todo el mundo, causando efectos perjudiciales en las plantas terrestres (Bailey-Serres y Voesenek 2008; Colmer y Voesenek 2009; Voesenek y Bailey-Serres 2013). El IPCC (2014) predice que el calentamiento global conducirá a patrones climáticos más erráticos y a un aumento en la frecuencia e intensidad de las precipitaciones (Kundzewicz et al. 2019). En consecuencia, se espera que aumente la presencia de diferentes grados de sumersión de plantas en pastizales inundables. La sumersión completa es una de las situaciones más estresantes para las plantas en ambientes propensos a inundaciones (Voesenek et al. 2006) ya que la rápida disminución del oxígeno y el cambio de un metabolismo aeróbico a uno fermentativo (Colmer y Voesenek 2009) pueden perturbar el equilibrio energético de las plantas, lo que resulta en pérdidas de biomasa y, eventualmente, la muerte de aquellos individuos sumergidos.

El género Lotus (Fabaceae) comprende a más de 180 especies distribuidas en todo el mundo (Pajuelo y Stougaard 2005). Algunas de estas especies se utilizan actualmente para mejorar pastizales en entornos que son propensos a inundaciones, donde otras leguminosas tradicionales como la alfalfa no prosperan (Dear et al. 2003). Se ha llevado a cabo el cultivo selectivo para domesticar y mejorar leguminosas como Lotus tenuis y L. corniculatus. Estas especies mostraron diferentes grados de tolerancia a suelos anegados (James y Crawford 1998; Striker et al. 2005; Teakle et al. 2006) y sumergidos (Striker et al. 2012; Di Bella et al. 2020), siendo L. tenuis la de mayor tolerancia a la deficiencia de oxígeno. Sin embargo, solo se ha realizado un estudio para investigar las respuestas a la sumersión entre las accesiones de Lotus (Di Bella et al. 2020). El mismo se centró en los efectos de la sumersión completa durante 7 días en dichas especies que tenían 35 días de edad y se cultivaban en una solución nutritiva. Este estudio identificó diferencias en la elongación del tallo, el crecimiento hiponástico del pecíolo y la relación entre la biomasa aérea y radical entre varias accesiones (Di Bella et al. 2020). Sin embargo, aún no se han estudiado los rasgos específicos que contribuyen a la tolerancia a la sumersión y los mecanismos involucrados en la recuperación de las plantas a este estrés en las especies forrajeras de Lotus.

La asignación de biomasa a diferentes órganos de las plantas está influenciada por la especie, la ontogenia y el ambiente (Poorter y Nagel 2000). Escenarios estresantes como la

sumersión parcial y completa pueden alterar dicha asignación de biomasa en las plantas (Poorter et al. 2012). La relación entre la parte aérea (vástago: hojas + tallos) y la raíz (relación vástago/raíz V/R) a menudo se utiliza para expresar los cambios en la asignación de carbono, indicando la distribución de biomasa por encima y por debajo del suelo (Wilson 1988). Sin embargo, existe una limitación conceptual en el uso de los valores de V/R. Describir la asignación en términos de solo dos compartimentos, al combinar tallos y hojas, no reconoce las distintas funciones de estos órganos. Por ello, en este capítulo de la tesis, se consideraron tres compartimentos: hojas, tallos y raíces en los análisis de asignación, siguiendo la sugerencia de Poorter y Nagel (2000). Este enfoque permite caracterizar dicha asignación utilizando fracciones que representan la biomasa de cada órgano en relación con el total de la planta: fracción de biomasa de hojas (FBH), fracción de biomasa de tallos (FBT) y fracción de biomasa de raíces (FBR). El uso de las fracciones de biomasa ofrece otra ventaja: son menos sensibles a cambios menores en la asignación en comparación con los valores de V/R, especialmente cuando las raíces contribuyen a una proporción menor de la biomasa total. Este aspecto es particularmente relevante para este estudio, ya que la sumersión completa puede representar un severo impacto en el sistema radical de las plantas de Lotus y también puede acelerar la senescencia de las hojas tras la re-oxigenación luego de la inundación (Signorelli et al. 2013; Steffens et al. 2013; Nasrullah et al. 2022). En consecuencia, la reanudación del crecimiento después del estrés, expresada como la tasa de crecimiento relativo post-sumersión (TCR), puede estar significativamente influenciada por dos factores: la fracción de hojas que contribuye a la fijación actual de carbono y la fracción de raíces que sobrevive a la sumersión, especialmente si la absorción de agua es el principal factor limitante. Por lo tanto, uno de los objetivos de este capítulo fue determinar qué fracción de órganos puede explicar mejor el proceso de recuperación a la sumersión en las especies forrajeras estudiadas.

La teoría ecológica clásica sugiere que existe un compromiso entre el crecimiento en condiciones no limitantes y la tolerancia al estrés abiótico en las plantas (Chapin et al. 1993; Weih 2001; Assmann 2013). Esto generalmente implica cambios en la asignación de recursos para optimizar el crecimiento de las plantas bajo diferentes condiciones ambientales. Esta teoría sugiere que las plantas que crecen rápidamente en condiciones no estresantes son menos capaces de tolerar el estrés abiótico, como la sumersión. Por el contrario, las plantas

que muestran un alto crecimiento en condiciones estresantes tienen tasas de crecimiento más bajas cuando se encuentran en condiciones de crecimiento no estresantes. Como alternativa, es posible que no se encuentre ninguna correlación entre las características inherentes de crecimiento y la tolerancia a la sumersión, ya que los esfuerzos de mejoramiento genético podrían haberse centrado no solo en accesiones tolerantes al estrés, sino también en aquellas con una mayor productividad. Además, se ha observado que invertir recursos para mantener el crecimiento durante la sumersión puede comprometer el crecimiento posterior en condiciones drenadas, como se demostró en una accesión específica de L. japonicus (MG20), donde la senescencia acelerada de las hojas tras la re-oxigenación se asoció con una recuperación deficiente después de la sumersión completa (Striker et al. 2012). Para investigar estas ideas en profundidad, se examinaron las respuestas de correlaciones de diversas accesiones de Lotus corniculatus y L. tenuis cuando se expusieron tanto a condiciones no estresantes (control) como a la sumersión. Este estudio también exploró la posible relación entre las respuestas de crecimiento durante el estrés de la sumersión y la recuperación posterior al estrés, con un enfoque especial en investigar la idea de un compromiso en el crecimiento entre diferentes períodos.

La selección adecuada de las especies es fundamental para lograr un rendimiento exitoso de los pastizales en entornos caracterizados por una condición de estrés predominante (Nichols et al. 2010, 2012). Además, la selección de accesiones dentro de la misma especie que tengan variabilidad en su respuesta a estreses específicos de diferentes intensidades, como la sumersión parcial frente a la completa, también es fundamental para lograr un mejor ajuste de los genotipos a las condiciones ambientales y del suelo. Esto ayudaría a determinar una mejor adaptación de estos materiales al entorno específico en el que serán cultivados. Al respecto, se encontraron ejemplos de variaciones interesantes en respuesta a la hipoxia, la salinidad y su combinación en siete accesiones del pasto forrajero *Festuca arundinacea* (Menon-Martinez et al. 2021). Estos hallazgos contribuyeron a recomendaciones específicas para cada combinación de estrés/entorno, resaltando la aptitud de las accesiones. Por lo tanto, desde un punto de vista práctico, explorar la tolerancia de diferentes accesiones de las leguminosas de este estudio, que se utilizan comúnmente con fines forrajeros, en diferentes escenarios de sumersión (parcial vs. completa), puede ayudar a seleccionar los materiales

más adecuados para lograr una productividad óptima en las condiciones predominantes de los pastizales.

3.2) Materiales y métodos

3.2.1) Material vegetal y condiciones de crecimiento

Lotus tenuis Waldst. y Kit. ex Wild., comúnmente conocida como trébol de pie de pájaro de hoja estrecha, es una leguminosa perenne con una temporada de crecimiento desde primavera a verano. Típicamente, tiene hábito de crecimiento rastrero y posee una raíz pivotante bien desarrollada con una extensa ramificación lateral superficial. Los tallos tienen hojas pentafoliadas, con dos de los folíolos en la base del pecíolo que se asemejan a estípulas. Esta especie desempeña un papel significativo como forraje en suelos propensos a inundaciones y se ha naturalizado en diversas comunidades vegetales dentro de los pastizales de la Pampa Inundable de Argentina (Striker et al. 2005, 2008). Se cultiva en áreas donde las condiciones del suelo pueden verse gravemente afectadas por la alcalinidad, la salinidad o las inundaciones periódicas (Dear et al. 2003; Striker et al. 2011a; Escaray et al. 2012).

Lotus corniculatus L., comúnmente conocida como trébol de pata de pájaro, es una leguminosa perenne de vida corta a media. Es escasamente pubescente y puede presentar una variedad de hábitos de crecimiento, desde rastrero hasta erguido. Tiene una raíz pivotante y abundantes raíces laterales, principalmente dentro de los primeros 60 cm de suelo, con la capacidad de extenderse hasta 120 cm de profundidad. Los tallos emergen de las raíces o de los nudos basales después del pastoreo o la cosecha. Entre las especies de *Lotus* domesticadas, *L. corniculatus* tiene la mayor importancia en la producción de forraje. Está bien adaptada para tolerar ciertos niveles de salinidad, acidez, baja fertilidad y suelos mal drenados (Dear et al. 2003; Striker et al. 2005; Escaray et al. 2012).

Ambas leguminosas forrajeras, *L. tenuis* y *L. corniculatus*, se seleccionaron para este experimento. Estas especies se utilizan comúnmente para enriquecer pastizales mediante la incorporación de leguminosas, y además algunas de ellas, como *Lotus tenuis*, se han naturalizado en pastizales naturales de la Pampa Deprimida, proporcionando una fuente importante de proteína en la dieta del ganado (Escaray et al. 2014; Antonelli et al. 2019). En particular, *L. tenuis* ha colonizado de forma espontánea, ambientes bajos con anegamientos

temporarios y suelos salino-sódicos, donde forma parte estable de la comunidad vegetal, incluso sin intervención antrópica, lo que evidencia su naturalización en la región (Rebuffo 1998; Escaray et al. 2012, 2014).

Específicamente, se eligieron cinco accesiones de *L. tenuis* (A: Aguape, L: Larrañaga, C: Chaja, P: Pampa INTA, E: Esmeralda) y cinco accesiones de *L. corniculatus* (N: Nilo, IN: Inia Draco, SG: San Gabriel, K: Kontact, T: Toro) debido a su amplia difusión a campo y en algunos casos su uso en investigación (Manzur et al. 2009; Striker et al. 2012; Marinoni et al. 2017, entre otros).

3.2.2) Diseño experimental

La obtención de plantas de las 10 accesiones de *Lotus* se realizó colocando semillas en placas de Petri que contenían algodón y papel de filtro empapado en agua destilada. Luego, las placas de Petri se colocaron en una cámara de germinación, con un régimen de temperatura que alternaba diariamente entre 20°C y 30°C (Manzur et al. 2009). Dos plántulas de cada accesión y especie se trasplantaron a macetas (0,6 L) llenas de un sustrato compuesto por un 50% de arena y 50% de material proveniente del horizonte superior de un suelo Natracuol típico y se llevaron a un invernáculo en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Las plántulas se dejaron crecer en el invernáculo hasta alcanzar la etapa de desarrollo de cinco hojas verdaderas antes de la aplicación de los tratamientos.

Se aplicaron tres tratamientos a dichas plantas jóvenes de 30 días de edad durante un período de 11 días (período de estrés), siguiendo un diseño completamente aleatorizado con diez repeticiones: (i) control (C) - riego diario para mantener la capacidad de campo, (ii) sumersión parcial (SP) de las plantas, donde el nivel de agua alcanzaba aproximadamente la mitad de la altura de las plantas (alrededor de 3-4 cm por encima del suelo), y (iii) sumersión completa (SC) de las plantas, con un nivel de agua sostenido a 5 cm por encima de la altura de las plantas. Se utilizaron contenedores de plástico ($0,8 \times 0,5 \times 0,4$ m de profundidad) para facilitar la aplicación de los tratamientos de sumersión y mantener niveles de agua consistentes durante todo el período experimental.

Después del período de tratamiento de 11 días, las macetas se retiraron de los contenedores y se evaluó el crecimiento de las plantas durante 14 días adicionales (período de recuperación). Durante este período, las macetas se regaron hasta la capacidad de campo, lo que permitió evaluar su capacidad de recuperación después de la exposición a los

diferentes tratamientos de sumersión. Para evitar posibles variaciones en la luz solar o gradientes de temperatura dentro del invernáculo que pudieran afectar los resultados, todas las macetas se rotaron semanalmente durante el experimento. La temperatura diaria promedio del aire en el invernáculo durante el experimento osciló entre 18°C y 25°C.

3.2.3) Variables medidas

Se hicieron las mediciones de las variables de respuesta al inicio (día 0), después del período de estrés (día 11) y después del período de recuperación (día 25). Para cada período de medición, se cuantificaron variables morfológicas, que incluyeron (i) el número de tallos, (ii) la altura de la planta y la biomasa total de la planta dividida en (iii) biomasa de hojas, (iv) biomasa de tallos y (v) biomasa de raíces. Las plantas cosechadas se secaron en estufa a 80°C durante 72 horas y se pesaron en una balanza de precisión. Al separarlas en diferentes compartimentos, se calculó la relación de la parte aérea y radical (relación vástago/raíz V/R) y la relación hoja-tallo (Hoja/Tallo) para cada tratamiento y período de cosecha. El compartimento de la parte aérea incluyó tanto a hojas como a tallos para el cálculo de V/R.

La tasa de crecimiento relativo (TCR) de las plantas se determinó para cada accesión bajo los diferentes tratamientos y períodos experimentales (estrés y recuperación) utilizando la ecuación desarrollada por Hunt (1982):

TCR (g g⁻¹ d⁻¹) =
$$[\ln(P_2) - \ln(P_1)] / (t_2 - t_1)$$

En la ecuación, P_2 y P_1 son los pesos secos de la biomasa vegetal correspondiente en los tiempos 2 y 1 respectivamente, con el valor de P siendo el promedio de biomasa del tratamiento (C, SP y SC), y t₂ - t₁ es el número de días entre los tiempos de muestreo (es decir, 11 días para el período de estrés y 14 días para el período de recuperación). Se calculó la TCR para las plantas enteras, así como la TCR de los diferentes compartimentos de la planta, incluyendo hojas, tallos y raíces, lo que permitió la comparación de los efectos diferenciales potenciales de los tratamientos en el crecimiento y la recuperación de la sumersión entre los órganos de la planta.

3.2.4) Análisis estadísticos

Para describir y resumir los resultados subyacentes de los datos relacionados con las respuestas a la sumersión y a la recuperación de las accesiones de *L. tenuis* y *L. corniculatus*, se utilizó un Análisis de Componentes Principales (ACP). Las variables utilizadas en este análisis comprendieron la tasa de crecimiento relativo (TCR) de varias variables de respuesta de biomasa, incluida la biomasa total de la planta y la biomasa de componentes individuales como hojas, tallos y raíces. Además, se consideraron relaciones como la relación entre la parte aérea y la raíz (V/R) y la relación hoja-tallo (Hoja/Tallo). Además, se tuvieron en cuenta variables morfológicas como el número de tallos (N Tallos) (y su cambio con el tiempo (Δ N Tallos)) y la altura de los tallos (H). Estas variables se evaluaron tanto para el período de estrés como para el período de recuperación, considerando tanto los escenarios de sumersión parcial como completa.

Para analizar los posibles cambios en la asignación de biomasa entre las especies de Lotus causados por los tratamientos de sumersión (C, SP y SC), se utilizó un diagrama de cajas que incluían todas las réplicas de plantas de cada accesión por especie. Este enfoque permitió observar la variabilidad y distribución de los datos, así como realizar comparaciones de medias mediante ANOVA seguido de pruebas *post hoc* de Tukey (p < 0.05). Este análisis se realizó tanto para el período de estrés como para el período de recuperación, lo que permitió también evaluar el grado de ajuste realizado por las plantas durante el período posterior al estrés. Dados los cambios observados en la asignación de biomasa como resultado de los tratamientos de sumersión, también se realizó un análisis de regresión para explorar las relaciones entre la tasa de crecimiento relativo (TCR) de la biomasa total durante el período de recuperación, incluida la fracción de biomasa de hojas (FBH), la fracción de biomasa de tallos (FBT), la fracción de biomasa de raíces (FBR) y la relación entre la parte aérea y la raíz (V/R), todo medido en la etapa de desumersión (es decir, el período de recuperación). Las fracciones de biomasa se calcularon en función del porcentaje de hojas, tallos y raíces en relación con la biomasa total para cada réplica de cada accesión (Poorter y Nagel 2000). Estos porcentajes se promediaron posteriormente para cada tratamiento y período de tiempo, tanto durante el período de estrés como durante el período de recuperación. Estos análisis

adicionales tenían como objetivo proporcionar información sobre las asociaciones entre los patrones de asignación de biomasa y el rendimiento general de recuperación de las plantas.

Se utilizó el análisis de regresión para examinar el posible compromiso entre la capacidad de crecimiento intrínseca de las accesiones (medida como la TCR de los controles) y la TCR bajo los tratamientos de sumersión, así como la capacidad de recuperación de los estreses. Y por último se investigó a través del análisis de la tasa de crecimiento relativo (TCR) a la sumersión completa frente a la TCR bajo la sumersión parcial mediante un gráfico de cuadrantes. Este enfoque permitió observar simultáneamente las respuestas de las accesiones a ambos estreses en relación con la respuesta promedio. Los cuadrantes formados por las líneas que representan las respuestas promedio facilitaron la identificación de accesiones que mostraron respuestas de TCR por encima o por debajo del promedio de la especie en estas condiciones. Cabe destacar que comparar tanto los períodos de estrés como de recuperación permitió evaluar la consistencia en las respuestas de las accesiones. Este enfoque permite una observación clara y directa para evaluar si las accesiones demostraron tolerancia y respuestas comparables tanto a la sumersión parcial como a la completa. Además, facilita la identificación de accesiones que eran adecuadas para escenarios específicos de sumersión, según su desempeño y adaptabilidad.

En todos los casos, se realizaron pruebas estadísticas y análisis gráficos utilizando GraphPad Prism versión 9.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.).

Nota: En las figuras y tablas, los valores numéricos con punto decimal (.) deben interpretarse como si utilizaran coma decimal (,), de acuerdo con la convención numérica empleada en el resto del documento.

3.3.1) Agrupamiento de rasgos morfológicos y de crecimiento en la respuesta de *Lotus* tenuis y L. corniculatus bajo tratamiento de sumersión

Durante el período de estrés, el ACP para la sumersión parcial (Figura 3.1a) mostró que los dos primeros ejes explicaron el 71% de la varianza total entre las accesiones basadas en los rasgos medidos (véase también la Fig. S3.1 para respuestas en condiciones control). El Componente Principal 1 (CP1) representó el 51% de la variación y separó a las accesiones con altas tasas de crecimiento relativo (TCR) para la biomasa total (BT), tallos, raíces, hojas y número de tallos (N Tallos), agrupando predominantemente a las accesiones de L. corniculatus. Por otro lado, el Componente Principal 2 (CP2) contribuyó al 20% de la varianza y distinguió eficazmente a las accesiones con altas relaciones vástago/raíz (V/R) y altura de la planta (H, véase también la Fig. S3.2 para más detalles sobre esta variable), que estaban inversamente relacionadas con las relaciones hoja-tallo (Hoja/Tallo), agrupando predominantemente a L. tenuis. Bajo sumersión completa (Fig. 3.1c), los dos ejes explicaron el 70% de la varianza total. El primer eje (CP1) representó el 46% de esta varianza y diferenció a las accesiones con alta TCR para la biomasa total (BT), hojas, tallos y número de tallos (N Tallos). CP2 explicó el 24% de la varianza y mostró asociaciones entre H y V/R, que estaban inversamente relacionadas con la relación Hoja/Tallo. La distribución de las accesiones a lo largo del primer eje del ACP reveló una mayor variación para L. corniculatus bajo sumersión parcial y para *L. tenuis* bajo sumersión completa (Fig. 3.1a, c).

Durante el período de recuperación, el ACP mostró que los dos primeros ejes representaron el 76% y el 70% de la varianza total para las plantas previamente sumergidas tanto parcial como completamente, respectivamente (Fig. 3.1b, d). Los gráficos muestran claramente que un número significativo de accesiones de *L. corniculatus* se posicionaron en el lado negativo del eje CP1, mientras que la mayoría de las accesiones de *L. tenuis* se encontraron en el lado positivo del mismo eje, coincidiendo con los rasgos responsables del crecimiento de las plantas (TCR). Este contraste distintivo entre las dos especies fue evidente durante el período posterior al estrés y se mantuvo consistente para ambos tratamientos de sumersión. Después de la sumersión parcial, la TCR de hojas, tallos y raíces se asoció con la

TCR de la biomasa total (BT). Por el contrario, el cambio en el número de tallos (Δ N Tallos) y el número de tallos (N Tallos) estuvieron menos asociados con el crecimiento que durante el estrés. La altura de la planta (H) y la V/R estuvieron inversamente relacionadas con la relación hoja-tallo (Hoja/Tallo) (Fig. 3.1b). Después de la sumersión completa, la TCR de las raíces se asoció con la TCR de los tallos (y menos con la TCR de hojas; Fig. 3.1d). El número de tallos y su cambio a lo largo del tiempo no estuvieron claramente asociados con la acumulación de biomasa (es decir, BT). Además, la altura de la planta y el V/R estuvieron positivamente asociados, como se observó durante la recuperación de la sumersión parcial, pero no estuvieron relacionados con la relación Hoja/Tallo (Fig. 3.1d). Del mismo modo, sucedió con el control durante el mismo período de recuperación (Fig. S3.1).



Figura 3.1. Gráfico de Análisis de Componentes Principales (ACP) que representaron variables y accesiones de *Lotus tenuis* y *L. corniculatus* bajo tratamientos de sumersión parcial (a, b) y sumersión completa (c, d) durante el periodo de estrés (a, c) y el periodo de recuperación (b, d). Los gráficos
fueron generados utilizando 9 variables y 10 accesiones. Las variables analizadas incluyeron la tasa de crecimiento relativo (TCR) de la biomasa total (BT), hojas (Hojas), tallos (Tallos) y raíces (Raíces), así como la variación en el número de tallos durante los periodos (Δ N Tallos), el número de tallos por planta (N Tallos), la relación vástago/raíz (V/R), la relación hoja:tallo (Hoja/Tallo) y la altura de la planta (H). Las accesiones de *L. tenuis* fueron indicadas por triángulos violetas: Aguape (A), Larrañaga (L), Chaja (C), Pampa INTA (P) y Esmeralda (E). Las accesiones de *Lotus corniculatus* fueron representadas por círculos verdes: San Gabriel (SG), Nilo (N), Inia Draco (IN), Kontac (K) y Toro (T). El porcentaje de variabilidad explicada se indica en cada eje.

3.3.2) Cambios en la asignación de biomasa debido a los tratamientos de sumersión

Hubo variaciones en la asignación de biomasa entre las diferentes partes de la planta dependiendo del tratamiento de sumersión, así como diferencias en la asignación durante el período de recuperación (Fig. 3.2). En el caso de L. tenuis, la fracción de biomasa de hojas (FBH) disminuyó un 13% debido a la sumersión parcial con respecto al control (p < 0.05), mientras que la sumersión completa no afectó significativamente la FBH (Fig. 3.2a). Después del período de recuperación, la FBH fue un 18% más alta bajo sumersión completa en comparación con los otros tratamientos, mientras que las plantas parcialmente sumergidas mantuvieron la FBH más baja (34,6%) incluso 2 semanas después del período de estrés (Fig. 3.2a). La fracción de biomasa de tallos (FBT) de L. tenuis fue un 17,8% más baja en sumersión completa en comparación con el control y la sumersión parcial durante el período de estrés (Fig. 3.2c). Sin embargo, se recuperó durante el período posterior al estrés con todos los tratamientos, mostrando valores similares para la FBT (33% a 35,5%). La fracción de biomasa de raíces (FBR) no cambió significativamente con respecto al control (p>0,05) debido a la sumersión durante el período de estrés, pero fue un 18,5% más baja al final del período de recuperación para las plantas previamente sometidas a sumersión completa (p<0,05), Fig. 3.2e).

En *L. corniculatus*, la FBH no se vio afectada por los tratamientos de sumersión durante el período de estrés. Sin embargo, es de destacar que las plantas previamente sumergidas completamente mostraron una FBH un 15,7% más alta al final del período de recuperación (Fig. 3.2b). La FBT durante el período de estrés fue un 18.8% más alta bajo sumersión parcial, mientras que fue un 21,1% más baja durante la sumersión completa en comparación con el control. Después del período de recuperación, la FBT se mantuvo ligeramente más alta (8,5%) bajo sumersión parcial (Fig. 3.2d). La FBR fue un 18,6% más baja en sumersión parcial durante el período de estrés, sin diferencias significativas

observadas entre los grupos de control y sumersión completa (p>0,05). Sin embargo, al final del período de recuperación, la FBR fue un 18,1% más baja solo para las plantas previamente sometidas a sumersión completa (Fig. 3.2f).



Figura 3.2. Fracción de biomasa de hojas (a, b), fracción de biomasa de tallos (c, d) y fracción de biomasa de raíces (e, f) durante los períodos de estrés y recuperación bajo condiciones de control (C), sumersión parcial (SP) y sumersión completa (SC) en *Lotus tenuis* en color violeta (paneles izquierdos) y *L. corniculatus* en color verde (paneles derechos). Las mediciones se presentaron mediante diagramas de cajas, donde cada caja representó el 50% de los datos. La mediana se indicó con una línea horizontal dentro de cada caja, la media se denotó con '+', y las barras que se extienden desde cada caja representaron los percentiles 10 y 90. Las barras de error representaron valores por

debajo del percentil 25 y aquellos que superaron el percentil 75 de los datos. Los datos de las accesiones (10 repeticiones para cada una de las 5 accesiones, n=50) se obtuvieron para cada tratamiento dentro de la especie. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey (p < 0.05) tanto para el período de estrés (letras minúsculas) como para el período de recuperación (letras mayúsculas) dentro de cada especie.

3.3.3) Correlación entre la recuperación de la sumersión y la asignación de biomasa

Se observaron correlaciones interesantes entre las tasas de crecimiento relativo (TCR) del período de recuperación y las fracciones de biomasa analizadas (es decir, FBH, FBT y FBR) o la relación vástago/raíz (V/R) del período de estrés, específicamente en condiciones de sumersión completa (SC) (Fig. 3.3). En cuanto a la reanudación del crecimiento de las plantas, hubo una correlación opuesta con la FBH tras la desumersión (es decir, el período de recuperación) entre las dos especies de Lotus. En L. tenuis, un aumento en la proporción de hojas al comienzo del período de recuperación se asoció positivamente con una mayor TCR (Fig. 3.3a). En contraste con los hallazgos en L. tenuis, hubo una correlación negativa entre estas variables en L. corniculatus, lo que sugiere que una mayor TCR se asoció con una menor FBH (Fig. 3.3b). No se encontró correlación entre TCR y FBT tras la desumersión en ninguna de las dos especies (Fig. 3.3c, d). Sin embargo, se observó una correlación negativa entre TCR y FBR, solo en L. tenuis (Fig. 3.3e, f). Como se esperaba, en L. tenuis las correlaciones positivas y negativas entre TCR y FBH, así como en FBR, se reflejaron en una correlación positiva con V/R tras la desumersión (Fig. 3.3g), no observándose así en L. corniculatus (Fig. 3.3h). Finalmente, no se observó correlación entre la TCR para la recuperación de la sumersión parcial (SP) y ninguno de los posibles predictores de crecimiento analizados (FBH, FBT, FBR o V/R) (Fig. S3.3).



Figura 3.3. La tasa de crecimiento relativo (TCR) de plantas enteras de accesiones de *Lotus tenuis* (paneles izquierdos) y *L. corniculatus* (paneles derechos) durante el período de recuperación después de 11 días de sumersión completa se mostraron en función de la fracción de biomasa de hojas (a, b), la fracción de biomasa de tallos (c, d), la fracción de biomasa de raíces (e, f) y la relación vástago/raíz (V/R) (g, h) en la desumersión (es decir, al final del período de estrés). Las letras indican las siglas de las accesiones de *L. tenuis* en triángulos violetas: Aguape (A), Larrañaga (L), Chaja (C), Pampa

INTA (P) y Esmeralda (E), mientras que para *L. corniculatus* se indican con círculos verdes: San Gabriel (SG), Nilo (N), Inia Draco (IN), Kontac (K) y Toro (T). Los parámetros de las regresiones se presentan dentro de cada gráfico.

3.3.4) Evaluación de las compensaciones en la tasa intrínseca de crecimiento en condiciones de control y sumersión

Para *L. tenuis*, la relación entre la TCR de las accesiones en condiciones no estresantes (C) y la TCR bajo sumersión parcial (SP) fue positiva (Fig. S3.4a). Se observó una tendencia similar, pero no fue estadísticamente significativa, bajo sumersión completa (SC) durante el período de estrés (Fig. S3.4c). Sin embargo, durante el período de recuperación, no hubo asociación entre el crecimiento intrínseco (es decir, TCR bajo condiciones control) y el crecimiento de las plantas que se recuperaban de cualquiera de los tratamientos de sumersión (Fig. S3.4e, g). En el caso de *L. corniculatus*, no se encontró correlación entre el crecimiento inherente de sus accesiones (es decir, TCR de los controles) y la TCR de las plantas durante o después de la sumersión. Esta falta de correlación se mantuvo consistente tanto para los tratamientos de sumersión parcial como completa, así como durante los períodos de estrés y recuperación (Fig. S3.4b, d, f y h).

3.3.5) Variación entre las especies y las accesiones de *Lotus* en respuesta a la sumersión parcial y completa

En el caso de *L. tenuis*, hubo respuestas diferentes entre las accesiones entre los períodos de estrés y recuperación para la sumersión completa (SC) (Figura 3.4a, b). Las accesiones Aguape (A) y Chajá (C), que inicialmente mostraron un crecimiento por encima del promedio bajo la sumersión completa (SC) (Fig. 3.4a), mostraron un bajo crecimiento durante el período de recuperación (Fig. 3.4b). Por otro lado, la accesión Pampa INTA (P), a pesar de tener la menor tasa de crecimiento relativo (TCR) durante el período de estrés, se convirtió en la accesión más prometedora en cuanto a la recuperación luego de la sumersión completa. En esta especie, las respuestas de las accesiones fueron más consistentes para la sumersión parcial (SP), mostrando una alta TCR durante el período de estrés y también teniendo un buen desempeño después del período de recuperación. Es importante destacar que, durante la recuperación, ninguna de las accesiones de *L. tenuis* mostró un comportamiento claramente

negativo en términos de TCR bajo sumersión parcial o completa (Fig. 3.4b, espacio vacío en el cuadrante --), como se observó en el período anterior.

En el caso de L. corniculatus, hubo respuestas más contrastantes entre las accesiones a la sumersión completa (SC) en comparación con la sumersión parcial (SP) en términos del rango de variabilidad en TCR (Fig. 3.4c, d). Llamativamente, ninguna de las accesiones demostró la capacidad de desempeñarse apropiadamente en ninguno de los escenarios de sumersión cuando se evaluaron después del período de recuperación (Fig. 3.4d, espacio vacío en el cuadrante ++). En cuanto a la sumersión parcial, la variación entre las accesiones observadas durante el período de estrés (indicada por la dispersión de puntos en el eje x) prácticamente se eliminó después del período de recuperación. Las accesiones mostraron respuestas en la TCR muy similares, con excepción de Inia Draco (IN) que consistentemente mostró una TCR por encima del promedio para la sumersión completa en ambos períodos de estrés y recuperación. Sin embargo, dicha accesión tuvo una TCR por debajo del promedio cuando se sometió a la sumersión parcial. Se observó un caso similar con San Gabriel (SG), pero en el caso de la sumersión parcial mostró un buen desempeño bajo esta condición, pero no bajo la sumersión completa después de considerar el período de recuperación. Los resultados para L. corniculatus indican un compromiso entre las accesiones con respecto a su capacidad de recuperación a la sumersión completa (Fig. 3.4d, cuadrante -+) en comparación con su recuperación a la sumersión parcial (Fig. 3.4d, cuadrante +-).



Figura 3.4. Tasa de crecimiento relativo (TCR) de plantas enteras de accesiones de *Lotus tenuis* y *L. corniculatus* durante (a, c) o recuperándose de (b, d) la sumersión completa (SC), graficada en función de la TCR de las mismas accesiones durante (o recuperándose de) la sumersión parcial (SP). Las accesiones de *L. tenuis* están representadas por A (Aguape), L (Larrañaga), C (Chaja), P (Pampa INTA) y E (Esmeralda), indicadas por triángulos violetas, mientras que las accesiones de *L. corniculatus* están representadas por las siglas SG (San Gabriel), N (Nilo), IN (Inia Draco), K (Kontac) y T (Toro), indicadas por círculos verdes. Las líneas verticales discontinuas indican la TCR promedio de las plantas bajo SP, mientras que las líneas horizontales discontinuas representan la TCR promedio de las plantas bajo SC, ya sea durante el estrés o durante la recuperación. Los cuadrantes conformados por estas líneas permitieron observar accesiones que muestran respuestas de TCR ya sea por encima o por debajo del promedio de la especie bajo estas condiciones.

3.4) Discusión

Este capítulo identificó las variables principales que afectan la tolerancia de varias accesiones de las leguminosas forrajeras Lotus tenuis y L. corniculatus ante diferentes niveles de sumersión parcial y completa de las plantas. También se centró en identificar los principales rasgos de crecimiento/asignación de biomasa que ayudan en la recuperación de estas plantas de tales situaciones de estrés. En primer lugar, los análisis de componentes principales mostraron que los parámetros de crecimiento durante la sumersión estaban asociados con las accesiones de L. corniculatus, mientras que durante la recuperación estaban en su mayoría asociados con las accesiones de L. tenuis (Fig. 3.1). En segundo lugar, en L. tenuis la recuperación de la sumersión completa se correlacionó positivamente con la fracción de biomasa de hojas y negativamente con la fracción de biomasa de raíces al comienzo de la recuperación, mientras que se observó el patrón opuesto en L. corniculatus (Fig. 3.2 y 3.3). En tercer lugar, no hubo un compromiso entre la capacidad inherente de crecimiento de las accesiones y su tolerancia a la sumersión o capacidad de recuperación (Fig. S3.4). Por último, el crecimiento de las accesiones bajo sumersión parcial difería de su crecimiento bajo sumersión completa (Fig. 3.4). Es importante destacar que L. tenuis presentó materiales más prometedores capaces de tolerar ambas situaciones de sumersión en comparación con L. corniculatus.

<u>3.4.1) Comportamientos contrastantes de *Lotus tenuis* y *L. corniculatus* durante el periodo de recuperación</u>

La evaluación del comportamiento de las plantas en respuesta a la sumersión debe considerar tanto el estrés como el posterior período de recuperación. Es durante este último período que se puede determinar la verdadera tolerancia a la sumersión (Striker 2012b). Este estudio evidenció que las especies se diferenciaron claramente durante el período de recuperación. Todas las accesiones de *L. tenuis* (excluyendo a Aguapé) se agruparon junto con las variables que explicaron el crecimiento (como las tasas de crecimiento relativo de la planta y sus compartimentos), mientras que las accesiones de *L. corniculatus* se ubicaron en cuadrantes opuestos. Por lo tanto, el comportamiento en respuesta a la sumersión difiere entre las especies, aunque se puede encontrar cierta variabilidad entre las accesiones dentro de ellas. Comparar estos resultados es un desafío debido a la disponibilidad limitada de estudios que

havan implementado tratamientos de sumersión en múltiples accesiones de estas especies. Solo un estudio de este tipo, realizado por Di Bella et al. (2020), está disponible para su comparación. Sin embargo, estos hallazgos muestran un amplio rango de variabilidad entre estas cinco accesiones con respecto a la tasa de crecimiento relativo (TCR) durante el período de recuperación, con valores que van desde moderados hasta altos (es decir, 0,03 a 0,09 g g⁻ ¹ d⁻¹). Esta variabilidad concuerda con las observaciones realizadas por Di Bella et al. (2020) para diez accesiones de L. tenuis, a pesar de las diferencias en las accesiones específicas estudiadas y el enfoque de su investigación en el período de sumersión más que en la recuperación. Además, otros estudios proporcionan conocimientos valiosos sobre las respuestas individuales de accesiones específicas, lo que permite hacer comparaciones significativas. La alta capacidad de las accesiones de L. tenuis Pampa INTA (P), Chajá (C) y Larrañaga (L) para recuperarse de la sumersión parcial coincide con hallazgos previamente reportados (Striker et al. 2005; Teakle et al. 2006; Antonelli et al. 2019), así como la capacidad de Pampa INTA (P) para recuperarse de la sumersión completa (Striker et al. 2012). Por otro lado, la escasa capacidad de las accesiones de L. corniculatus para recuperarse tanto de la sumersión parcial como de la sumersión completa concuerda con los hallazgos de estudios previos sobre la accesión San Gabriel (SG), donde la acumulación de biomasa se redujo en un 41-67% en comparación con los controles (Striker et al. 2005, 2012; Antonelli et al. 2019), valor consistente con el registrado en el Capítulo II para este mismo cultivar. Estos hallazgos proponen a L. tenuis como altamente tolerante y L. corniculatus como moderadamente tolerante a la sumersión parcial o completa, y que ello se debe a su distinta capacidad de recuperación. Sin embargo, se debe considerar que L. corniculatus muestra una mejor calidad forrajera, con una mejor asimilación de proteínas, una reducción de la fermentación entérica y una disminución del timpanismo del ganado (Sivakumaran et al. 2006; Escaray et al. 2012).

3.4.2) Cambios en la asignación durante la sumersión afectan la recuperación de las plantas

La asignación de biomasa entre hojas, tallos y raíces mostró variaciones en respuesta a la sumersión parcial, revelando patrones generales dentro de las especies (Fig. 3.2). Específicamente, en el caso de *L. tenuis*, la fracción de biomasa asignada a las hojas (FBH) disminuyó debido a la sumersión parcial, con una ligera tendencia hacia una mayor fracción de biomasa en tallos (FBT), y no se observaron cambios aparentes en la fracción asignada a las raíces (FBR). En *L. corniculatus*, la FBT aumentó debido a la sumersión parcial, pero a expensas de la FBR. El aumento en la fracción de biomasa de tallos puede considerarse una asignación estratégica de recursos por parte de las plantas, con el objetivo de promover un crecimiento más alto de la planta, lo que aumenta la probabilidad de posicionar una mayor proporción de hojas por encima de la superficie del agua para una fijación efectiva de carbono. Esta noción está respaldada por estudios realizados por Striker et al. (2005) en estas especies de *Lotus* y Striker et al. (2019) en 15 accesiones de *Melilotus siculus*. Además, Di Bella et al. (2020) observaron un aumento en la tasa de crecimiento de tallos primarios después de la sumersión parcial en varias accesiones de *L. tenuis* y una accesión de *L. corniculatus*, lo que respalda aún más esta hipótesis.

La sumersión completa resultó en cambios significativos en la asignación de biomasa en ambas especies de *Lotus*. Bajo la sumersión completa, la FBH aumentó levemente, mientras que la FBR se redujo ligeramente en comparación con otros tratamientos en ambas especies. Estos patrones probablemente estén relacionados con la inversión prioritaria de la planta en la biomasa de las hojas para respaldar la fijación de carbono (Striker et al. 2014), lo que ayuda en la recuperación de la planta a expensas de la proporción de raíces. Esta ligera reducción en la fracción de raíces no parece comprometer el equilibrio hídrico de las plantas (cf. Buraschi et al. 2020, capítulo IV). Interesantemente, se encontró variación en las fracciones de biomasa entre diferentes accesiones, que se correlacionó con su capacidad de regeneración después del estrés de la sumersión (Fig. 3.3). Especialmente para *L. tenuis*, que es tolerante a la sumersión, las accesiones que mostraron un aumento en FBH, una disminución en FBR o una alta relación vástago/raíz (V/R) tuvieron un crecimiento más consistente después de la sumersión completa. Estos hallazgos indican que la asimilación de las hojas restantes desempeña un papel crucial en la recuperación posterior a la sumersión. Esta respuesta se alinea con observaciones en otras especies tolerantes a la sumersión, como *Phalaris aquatica* (Striker y Ploschuk 2018), *Hemarthria altissima* (Luo et al. 2009) y *Chloris gayana* (Striker et al. 2017). Por lo tanto, en este estudio se resalta la importancia de las hojas funcionales restantes en mejorar la capacidad de recuperación de las plantas previamente sumergidas.

En el caso de L. corniculatus, que es menos tolerante a la sumersión, no se observaron relaciones significativas en la mayoría de las fracciones de biomasa de la planta (FBT, FBR, V/R), excepto por una correlación negativa entre FBH y el crecimiento en la recuperación. Sin embargo, se cree que es poco probable que esta correlación se deba a la funcionalidad de las hojas o a las relaciones hídricas de las plantas. En este sentido, el rango limitado de flexibilidad para modificar la relación vástago/raíz bajo la sumersión completa (V/R que varía de 1 a 2), en comparación con L. tenuis (V/R que varía de 1 a 4), respalda esta idea. Esto sugiere que la proporción de transpiración a absorción de agua, estimada por V/R, no se vería significativamente afectada en L. corniculatus. Por lo tanto, es más plausible que la funcionalidad deteriorada de las hojas en términos de asimilación de carbono influya en el pobre rendimiento de las plantas durante el proceso de recuperación. Para obtener una comprensión más profunda de las capacidades de recuperación contrastantes de la sumersión completa en L. tenuis y L. corniculatus, se recomienda explorar sus respectivas habilidades para lidiar con las especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que estas se producen después de la desumersión durante el daño post-anóxico (Sasidharan et al. 2018). La realización de futuros estudios que comparen la producción de ROS y la mitigación del daño oxidativo entre estas especies ofrecería información valiosa para esclarecer este aspecto. Además, cabe destacar que se han observado diferencias entre genotipos dentro de estas especies de leguminosas en términos de la acumulación de antocianinas y otros flavonoides cuando se exponen a diversos estreses abióticos (por ejemplo, frío, salinidad; Escaray et al. 2019). En este sentido diversos estudios transcriptómicos en especies como maíz, *Rumex, Arabidopsis*, Brachypodium y arroz han asociado la modulación de las ROS con la tolerancia al estrés abiótico (Rivera-Contreras et al. 2016; Yeung et al. 2018; Jia et al. 2021; Yang et al. 2023), lo que respalda la hipótesis de que investigar el papel de estos compuestos en la recuperación tras la sumersión podría ser especialmente relevante.

3.4.3) Las accesiones tolerantes de *Lotus* a la sumersión completa difieren de las tolerantes a la sumersión parcial

La tolerancia a la sumersión parcial y completa mostró variación entre las diferentes accesiones, y las respuestas de estas discreparon al evaluarse al final del período de estrés o al final de la recuperación. Esta observación respalda aún más la idea de que la tolerancia debe determinarse evaluando las plantas después de que hayan tenido la oportunidad de recuperarse del estrés (Striker 2012b; Sasidharan et al. 2017). Con respecto a L. tenuis, las accesiones con la tasa de crecimiento relativo (TCR) más alta (Aguape) y más baja (Pampa INTA) durante la sumersión completa mostraron un comportamiento opuesto durante el período de recuperación. Curiosamente, estas mismas accesiones mostraron una TCR por encima del promedio cuando estaban parcialmente sumergidas en ambos períodos de estrés y recuperación. Además, entre todas las accesiones examinadas, Pampa INTA (P) mostró consistentemente una TCR por encima del promedio para ambos tipos de estrés, lo que la convierte en una candidata excepcionalmente prometedora para sitios propensos a sufrir diferentes intensidades de inundación. Esta accesión ha demostrado una flexibilidad notable, ya sea a través de una elongación vigorosa de los tallos para evitar la sumersión parcial o una estrategia quiescente cuando está completamente sumergida, a expensas del uso de las reservas almacenadas (Manzur et al. 2009). La posesión de estas estrategias de crecimiento alternativas puede ayudar a comprender el potencial de las accesiones para tener éxito en entornos caracterizados por profundidades de inundación impredecibles.

En el caso de *L. corniculatus*, ninguna de las accesiones mostró tolerancia a ambas situaciones cuando se evaluaron al final del período de recuperación. Sin embargo, hubo accesiones que exhibieron una interesante tolerancia a la sumersión parcial, como San Gabriel (SG) y Toro (T), y otras accesiones que mostraron una buena recuperación de la sumersión completa, como Inia Draco (IN). Esto indica que, para estas accesiones, que se utilizan comúnmente en condiciones de campo (Rebuffo 1998; Artola et al. 2003; Antonelli et al. 2019), el proceso de selección implica un compromiso al elegir materiales específicamente adecuados para la sumersión parcial o completa, pero no para ambas simultáneamente. Estos hallazgos generales concuerdan con la reputación de la especie de tener una tolerancia intermedia al exceso de agua en comparación con *L. tenuis* (Striker et al. 2005; 2012; Teakle et al. 2006; Antonelli et al. 2019).

Finalmente, la variación genética desempeña un papel crucial en la selección de materiales con una mayor tolerancia abiótica en cultivos forrajeros, como el exceso y la deficiencia de agua, a través de programas de mejoramiento genético (Chapman et al. 2012). En este estudio, se demostró evidencia que desafía el supuesto equilibrio entre la capacidad intrínseca de crecimiento de una planta en condiciones no estresantes (es decir, controles) y su respuesta al crecimiento cuando se enfrenta al estrés inducido por la sumersión (Chapin et al. 1993; Weih 2001). Sorprendentemente, estos hallazgos no revelan una correlación aparente entre estos dos rasgos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que esta falta de correlación no debe percibirse como una información negativa ya que la selección genética para aumentar la tolerancia al exceso de agua no necesariamente comprometería el potencial de crecimiento en ausencia del estrés.

3.5) Conclusión

Mientras que L. corniculatus presentó una mayor sensibilidad al estrés por sumersión, L. tenuis mostró una capacidad superior de recuperación, lo cual refleja distintas estrategias de tolerancia dentro del género. A su vez, dentro de L. tenuis, se observó una correlación positiva entre la recuperación después de la sumersión y la fracción de biomasa de hojas, mientras que se notó una relación inversa con la fracción de biomasa de las raíces. Contrariamente, L. corniculatus demostró la tendencia opuesta para la fracción de biomasa de hojas. Una observación prometedora fue la ausencia de correlación entre la capacidad de crecimiento intrínseca (en ausencia de estrés) y la tolerancia a la sumersión parcial y completa, o la capacidad de recuperación, lo que indicaría que la selección de una mayor tolerancia no afectaría negativamente el potencial de crecimiento. Además, una accesión de L. tenuis mostró tolerancia tanto a la sumersión parcial como a la completa, lo que la posiciona como candidata ideal para crecer en áreas propensas a inundaciones de profundidad incierta de agua. En contraste, las accesiones de L. corniculatus fueron más hábiles para manejar solo la sumersión parcial. Estos hallazgos ofrecen perspectivas valiosas que podrían mejorar significativamente la producción de forraje en áreas propensas a inundaciones y ayudar en la selección de accesiones de Lotus mejor adaptadas a condiciones de inundación específicas.

CAPÍTULO IV

Recuperación de la sumersión completa de accesiones de *Lotus japonicus* con diferente relación vástago/raíz

<u>Artículo de este capítulo:</u> Buraschi, F. B., Mollard, F. P., Grimoldi, A. A., y Striker, G. G. 2020. Eco-physiological traits related to recovery from complete submergence in the model legume *Lotus japonicus*. Plants, 9: 538.

4.1) Introducción

La sumersión completa se da a cabo cuando las aguas de inundación aumentan a un nivel en el que los vástagos de las plantas permanecen completamente bajo el agua, siendo uno de los escenarios más estresantes que las plantas se enfrentan en ambientes propensos a inundarse (Voesenek et al. 2006). Frente a este estrés, se han reconocido dos estrategias generales de las plantas: (i) la "estrategia de escape" y (ii) la "estrategia de quiescencia" (Bailey-Serres y Voesenek 2008; 2010; Striker et al. 2012). La primera implica el alargamiento de los tallos para restablecer el contacto de las hojas con la atmósfera y así las plantas obtener una mejor oportunidad de sobrevivir bajo una sumersión poco profunda o superficial de largo plazo (mayor a una semana). La estrategia de "quiescencia" se basa en mantener un metabolismo basal con mínimo gasto de la energía, sin alargamiento de los tallos, donde por lo general se adopta esta estrategia para hacer frente a una sumersión profunda de corto plazo (menor a una semana), dado que la emergencia de los tallos representa un alto costo energético que podría comprometer la recuperación posterior de la planta (Colmer y Voesenek 2009; Voesenek y Bailey-Serres 2013). Por lo tanto, en escenarios de sumersión profunda y de corto plazo con bajo contenido de CO_2 y/o poca luz, las plantas rara vez crecen, sino que priorizan sobrevivir hasta que el agua retroceda y logren reanudar su crecimiento. La reanudación del crecimiento vigoroso después de experimentar una sumersión completa indica la capacidad de recuperación de las especies/genotipos/accesiones (Striker 2012b). Las respuestas de las plantas durante la sumersión se han estudiado y documentado ampliamente (Fukao et al. 2006; 2019; Bailey-Serres y Voesenek 2008; Hattori et al. 2009; Nagai et al. 2010), mientras que las respuestas de las plantas después del retroceso del agua (es decir, la fase de recuperación) está siendo abordada recientemente (ver Yeung et al. 2018; 2019 para Arabidopsis thaliana, Buraschi et al. 2024b para Lotus tenuis y L. corniculatus entre otros).

Las leguminosas forrajeras son un componente importante de las pasturas y de los pastizales naturales. Algunas especies del género *Lotus* se utilizan para mejorar las pasturas en ambientes estresantes, principalmente *Lotus corniculatus* y *L. tenuis*, las cuales se utilizaron como especies de estudio más arriba siendo tolerantes ante eventos de inundación (Ver capítulo III) (James y Crawford 1998; Striker et al. 2005, 2012; Buraschi et al. 2024b). Hace unos años, *L. japonicus*, que está estrechamente relacionada taxonómicamente con estas especies forrajeras (Young et al. 2005), surgió como especie modelo para las leguminosas

debido a que es una planta pequeña con un corto tiempo de generación, fácil de cultivar y susceptible a la transformación genética. Por lo tanto, se desarrolló un conjunto de recursos genéticos, incluidos ecotipos, mutantes y líneas endocriadas recombinantes (RILs) (Jiang y Gresshoff 1997; Mun et al. 2016). Estudios anteriores mostraron que las plantas adultas de esta especie podrían tolerar tres semanas de anegamiento (Striker et al. 2014) y hasta 12 días de sumersión en el estadío de plántulas (Striker et al. 2012). Por lo tanto, la identificación de respuestas de *L. japonicus* a la sumersión y su recuperación post-sumersión pueden sentar las bases para contribuir en los planes destinados a mejorar la tolerancia a la sumersión de las especies de *Lotus* forrajeras que están estrechamente relacionadas.

Se han identificado someramente algunos rasgos relevantes para la recuperación de las plantas de la sumersión (capítulo III). Se entiende que el estado hídrico de la planta es crucial (o crítico) para facilitar la rápida recuperación, particularmente teniendo en cuenta que un sistema radical disminuido y/o dañado debido a la hipoxia por sumersión, no necesariamente puede hacer frente a la absorción de agua necesaria para compensar con la transpiración del vástago cuando el ambiente se torna normóxico después de la sumersión (Striker et al. 2017 para Chloris gayana). En arroz cv. IR42, la intolerancia a la sumersión completa se debe a la desecación de las hojas (es decir, disminución de la conductividad hidráulica en la vaina) después de la desumersión, lo cual ocurre rápidamente, provocando el marchitamiento y la muerte de las plantas (Setter et al. 2010). En este sentido, la proporción de biomasa seca de tallos+hojas (vástagos) y raíces después de la desumersión podría estar relacionada con el balance hídrico (es decir, transpiración por parte del vástago/absorción de agua por parte de las raíces) y podría influir en la recuperación de la planta. La asimilación de carbono después de la sumersión también puede impactar positivamente en la recuperación de la planta. Trabajos pioneros (Luo et al. 2009; 2011) mostraron que la capacidad para reanudar el crecimiento después de 20 días de sumersión en la dicotiledónea Alternanthera philoxeroides y el pasto Hemarthria altissima resultó de un rápido crecimiento de las hojas y recuperación de la funcionalidad del aparato fotosintético. En dos accesiones contrastantes para la tolerancia a la sumersión de Arabidopsis thaliana (Bay-0-sensible vs. Lp2-tolerante), se demostró que la rápida apertura estomática, la mayor retención de clorofila y el mantenimiento de la turgencia en las hojas fueron factores clave para que la accesión tolerante mantuviera una rápida recuperación tras la eliminación del estrés (Yeung et al. 2018).

En este capítulo de la tesis, se seleccionaron 10 RILs de *L. japonicus* (más dos parentales) con diferente relación constitutiva de biomasa de vástagos y raíces (V/R) (Striker et al. 2014) para evaluar el estado hídrico de la hoja, la conductancia estomática, la fluorescencia de la clorofila adaptada a la oscuridad (Fv/Fm), y el verdor de las hojas basales y apicales (como un sustituto para inferir el estado del nitrógeno) y explorar cómo estas variables se correlacionan con la reanudación del crecimiento de la planta (es decir, la tasa de crecimiento relativo (TCR) de la planta). Se analizaron estas relaciones y respuestas de las plantas durante la primera y la segunda semana después de la desumersión para revelar rasgos que ayuden en la recuperación temprana y tardía. Se hipotetiza que la capacidad de recuperación tras la sumersión completa en los diferentes genotipos (RILs) de *Lotus japonicus* está asociada con variaciones en la relación vástago/raíz (V/R), así como el estado hídrico en la planta y el verdor de las hojas. Se espera que los genotipos con baja relación vástago/raíz sean los que presenten una rápida recuperación en el estado hídrico de la hoja, la conductancia estomática y una alta retención de clorofila en la hoja durante la recuperación temprana y, por lo tanto, una alta TCR en la planta luego de la sumersión.

4.2) Materiales y métodos

4.2.1) Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron un total de 12 genotipos de *L. japonicus* en este experimento: Gifu B-129 (Gifu) y Miyakojima MG-20 (Miyakojima) y 10 RILs que derivaron de un cruce entre estas dos líneas parentales y la autofecundación hasta la Generación F8 (Kawaguchi et al. 2001). La elección de Gifu y MG-20 como parentales se basa en que son líneas de referencia ampliamente utilizadas en estudios fisiológicos y genéticos, con genomas completamente secuenciados (Sato et al. 2008). Además, presentan diferencias naturales en diversos rasgos adaptativos, incluyendo respuestas a estrés abiótico, lo cual las convierte en un sistema modelo ideal para la generación de RILs y el análisis de la base genética de la tolerancia a la sumersión (Babuin et al. 2014). Las semillas se obtuvieron del proyecto National BioResource de la Universidad de Miyazaki (Miyazaki, Japón). A partir de una amplia variabilidad en la relación vástago/raíz constitutiva en un set de 94 líneas endocriadas recombinantes (RILs) de dicha especie de una misma edad creciendo bajo condiciones de buen drenaje (Striker et al. 2014) se seleccionaron RILs con diferentes proporciones de

relación de biomasa de vástago y de raíz. A partir de ellos se investigó el rol del rasgo asociado con la relación entre la transpiración potencial/absorción de agua en el crecimiento de las plantas cuando se recuperan luego de una semana de sumersión. Las semillas de cada genotipo se escarificaron frotando un papel de lija fina, se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 0,05% (p/v), se enjuagaron en agua destilada y se germinaron en oscuridad en una incubadora (20°C) en cajas de poliestireno que contenían papel blanco absorbente saturado de agua. Después de tres días, las semillas germinadas se trasplantaron a macetas de plástico de 2 L (2 o 3 plántulas por maceta) llenas de arena y tierra con 3,3% de carbono orgánico (1:1 v/v). Después de la siembra, las macetas se transfirieron a un invernáculo en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires y las plántulas se ralearon a una por maceta durante la primera semana. Para evitar la limitación de nutrientes para el crecimiento de las plantas, se agregaron a cada maceta 1,2 g de fertilizante (Nitrofull EmergerR, Argentina: 12% N, 5% P, 15% K, 2% Mg, 8% S, 3% Ca, 0,02% Zn, 0,2% Fe, 0,02% Mn y 0,015% de Bo; los porcentajes son en peso). Las plantas se regaron diariamente por 45 días antes de la imposición del tratamiento.

4.2.2) Diseño experimental

Después de un período de crecimiento de 45 días, las macetas se distribuyeron al azar en dos grupos y se sometieron a dos tratamientos durante una semana (7 días): (i) control (C): las macetas se regaron diariamente y se les permitió drenar libremente, (ii) sumersión completa (SC): las plantas se sumergieron en agua clara en contenedores de material plástico de 1000 litros (110 x 100 x 90 cm, los mismos utilizados para el experimento del Capítulo II) a una profundidad de 45 cm, que correspondía a una columna de agua de aproximadamente 15-20 cm por encima de la parte superior de las plantas (columna de agua de 1,5-1,8 veces la altura de la planta). El agua de sumersión contenía 0,50 mM CaSO4, 0,25 mM MgSO4 y 1 mM KHCO3 (a un pH de 7,5 aproximadamente) como en Striker et al. 2019. El oxígeno disuelto en el agua de sumersión al mediodía osciló entre 3,9 y 4,6 mg L⁻¹ (frente a 7,8 mg L⁻¹ en el aire), medido con un medidor de oxígeno disuelto DO-5510 (LT Lutron Electronic Enterprise, Taipei). La densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) que alcanzaron a las plantas del control fue de 1100 \pm 180 µmol⁻² m⁻² s⁻¹, mientras que para las plantas sumergidas fue de 490 \pm 80 µmol m⁻² s⁻¹ (LI-192; Underwater Quantum Sensor; Li-Cor Inc.,

Lincoln, NE, USA). Este último es un entorno lumínico que permite la fotosíntesis subacuática en especies C3 (Colmer y Pedersen 2008). Durante la primera semana del experimento, todas las plantas (asignadas a los tratamientos de control y de sumersión) se colocaron en recipientes de plástico (0,8 m x 0,5 m x 0,5 m de profundidad) para facilitar la imposición de la sumersión. Después de la primera semana, las plantas se quitaron de los contenedores y se rotaron semanalmente dentro del invernáculo durante un período de recuperación de 14 días. El número de repeticiones por genotipo y combinación de tratamientos varió de 6 a 8 según el número de plantas disponibles. La humedad relativa promedio del invernáculo fue de $62\% \pm 12\%$, y la temperatura promedio del aire fue 24/16°C (día/noche).

4.2.3) Variables medidas

Las plantas de todos los genotipos se cosecharon al comienzo del experimento (día 0), al final de la sumersión (día 7), y dos períodos de recuperación: al final de la primera semana de recuperación, infiriendo de esta forma la capacidad de 'recuperación temprana' a la sumersión (día 14) y al final de la segunda semana de recuperación, infiriendo en la capacidad de 'recuperación tardía' a la sumersión (día 21). Se obtuvieron así 4 fechas de mediciones para comparar las respuestas antes de la imposición de los tratamientos y el grado de recuperación al que llegó cada material durante la post-sumersión (recuperación).

4.2.3.1) Parámetros de crecimiento y partición de biomasa

La biomasa seca de las plantas se obtuvo después de secarlas a 80°C durante 72 h hasta llegar a peso constante. La primera cosecha se realizó al día 0 del experimento antes de la sumersión de las plantas. En la segunda cosecha (inmediatamente después de la sumersión; día 7), los vástagos se separaron de las raíces para calcular la relación de biomasa seca de vástago y de raíz (V/R) de los diferentes genotipos luego de la desumersión.

La tasa de crecimiento relativo de las plantas (TCR) después de la sumersión se utilizó como un indicador de la capacidad de recuperación a la sumersión de los genotipos. En este estudio, la identidad de cada genotipo *per se* no fue particularmente relevante ya que se buscaba tener una variabilidad suficiente para algunos rasgos, como la relación de biomasa

seca de vástago y de raíz (V/R), para potencialmente influir en el balance hídrico de la planta tras la desumersión y volver a condiciones oxigenadas con buen drenaje.

La TCR se calculó siguiendo la ecuación por Hunt 1982:

TCR
$$(g g^{-1} d^{-1}) = [\ln(P_2) - \ln(P_1)] / (t_2 - t_1)$$

donde P_2 y P_1 son los pesos secos de la planta del tratamiento correspondiente en los tiempos 2 y 1, respectivamente, siendo el valor de P el promedio del peso seco del tratamiento, y t₂ - t₁ es el número de días entre los tiempos de muestreo.

4.2.3.2) Mediciones fisiológicas

Las mediciones fisiológicas de las hojas se realizaron en los días 2 y 7 durante la primera semana de recuperación (días 9 y 14 desde el comienzo del experimento), y en los días 10 y 14 después de la desumersión durante la segunda semana de recuperación (días 17 y 21 del experimento). Estas mediciones tuvieron como objetivo monitorear la recuperación del estado hídrico de las hojas, el funcionamiento estomático y el verdor de las hojas como indicadores del estado del nitrógeno de las hojas basales y apicales. Además, se evaluó fotoinhibición y daño al aparato fotosintético a través de mediciones de fluorescencia de clorofila de hojas jóvenes adaptadas a la oscuridad (Fv/Fm) tras el impacto de una semana de sumersión completa. Para el último parámetro, las mediciones se realizaron en los días 2 y 7 durante la primera semana de recuperación y en el día 11 durante la segunda semana de recuperación. El número de repeticiones tomadas para las mediciones fisiológicas fue de cinco por combinación de genotipo y tratamiento.

Contenido hídrico de las hojas

El contenido hídrico relativo de las hojas (CHR) se midió de acuerdo con la metodología propuesta por Čatský (1960). Primero, se tomaron las hojas jóvenes completamente expandidas ubicadas en la posición superior de las plantas y se pesaron inmediatamente para obtener su peso fresco. En segundo lugar, las muestras se incubaron durante 12 horas en

tubos herméticamente cerrados que contenían agua destilada para obtener su peso turgente. Luego, las hojas se secaron en una estufa a 70 °C durante al menos 48 horas para obtener su peso seco (los pesos de las hojas se sumaron posteriormente a las plantas correspondientes).

Finalmente, el CHR de las hojas se obtuvo como:

CHR $_{foliar} = [(peso fresco - peso seco) / (peso turgente - peso seco)] x 100.$

Conductancia estomática

La conductancia estomática de hojas jóvenes completamente expandidas en las posiciones superiores se midió cerca del mediodía utilizando un porómetro de estado estacionario (modelo SC-1; Decagon Devices, Pullman, WA, EE. UU.) para inferir sobre la pérdida de agua por transpiración y la facilitación de la difusión de CO₂ en las hojas para la fotosíntesis.

Fluorescencia de la clorofila

La fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm) se midió en las hojas completamente expandidas en las posiciones superiores después de un período de adaptación a la oscuridad de 20 minutos mediante el uso de clips para hojas y el fluorómetro portátil OS-30p (Opti-Sciences Inc., EE. UU.). Este parámetro indica la proporción de centros de reacción funcionales del fotosistema II (PSII) utilizándolo como cuantificador del grado de fotoinhibición por daños al PSII (Maxwell y Johnson 2000).

Estimación de la clorofila foliar

El verdor de las hojas se midió en hojas jóvenes (apicales) y adultas (basales) completamente expandidas usando un medidor portátil de clorofila (SPAD-502; Konica Minolta Sensing, Osaka, Japón). Este parámetro permite estimar el amarillamiento de las hojas como indicador de la degradación de la clorofila, la removilización del nitrógeno y la potencial senescencia anticipada de las hojas consecuentes del impacto del estrés por sumersión.

4.2.4) Análisis estadístico

Las respuestas de la relación de biomasa seca de vástago/raíz (V/R) y TCR durante la sumersión se evaluaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con "sumersión" y "genotipo" como factores principales. Cuando se detectaron las interacciones significativas, la diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher se utilizó para determinar el efecto de los tratamientos entre los genotipos. Durante la fase de recuperación, se realizaron análisis de regresión para explorar las relaciones entre la TCR de las plantas y la relación de biomasa seca de vástago/raíz, el contenido hídrico relativo de la hoja, la conductancia estomática, la fluorescencia de la clorofila en las hojas adaptadas a la oscuridad (Fv/Fm) y el verdor de las hojas basales (adultas) y apicales (jóvenes). Estas relaciones se evaluaron por separado durante la primera y la segunda semana de recuperación para identificar los rasgos asociados con las respuestas de recuperación "temprana" y "tardía". Además, se exploraron las relaciones entre las variables fisiológicas que estaban significativamente relacionadas con la TCR durante la recuperación a través de las correlaciones de Pearson. La normalidad y la homogeneidad de las varianzas se verificaron antes de cada análisis. Todos los resultados se presentaron como medias +/- errores estándar. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Infostat (Di Rienzo et al. 2011), y los gráficos se realizaron con GraphPad Prism 9 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

Nota: En las figuras y tablas, los valores numéricos con punto decimal (.) deben interpretarse como si utilizaran coma decimal (,), de acuerdo con la convención numérica empleada en el resto del documento.

4.3) Resultados

4.3.1) Crecimiento de Lotus japonicus durante la sumersión completa

Todos los genotipos de *L. japonicus* (ambos parentales MG-20 y Gifu, y los 10 RILs) mostraron tasas de crecimiento relativo (TCR) positivas durante la primera semana del experimento bajo condiciones control (Figura 4.1a). Por el contrario, 9 de los 12 genotipos (incluido el parental MG20) mostraron una TCR negativa durante la sumersión completa de una semana, indicando la incapacidad de acumular biomasa bajo el agua y la senescencia y

pérdida de tejidos debido al estrés (Fig. 4.1a); Gifu y los RILs 6 y 47 presentaron valores ligeramente positivos en la TCR. En todos los genotipos, las plantas no emergieron del agua, por lo que las respuestas de crecimiento registradas correspondieron a las plantas que permanecieron bajo el agua durante toda la semana. Los valores de biomasa seca de la planta a partir de los cuales se calcularon las TCR están disponibles en la Tabla S4.1.

La relación de biomasa seca vástago/raíz (V/R) de los RILs seleccionados y sus parentales bajo condiciones control osciló entre 2,7 y 13,5 (con una mediana de 5; Fig. 4.1b), siendo lo suficientemente amplia como para explorar la relación de esta variable con la recuperación de la planta a la sumersión, como uno de los principales objetivos. Es importante destacar que las diferencias en la relación V/R entre los genotipos fueron constitutivas y no relacionadas con el tamaño de la planta, ya que no hubo relaciones significativas entre la biomasa seca de la planta y la relación V/R ($r^2 = 0,34$; p = 0,23). Cuatro de los 12 genotipos (RILs 6, 47, 80 y Gifu) aumentaron su relación V/R en respuesta a la sumersión completa, mientras que los otros tres genotipos (RILs 18, 30 y 189) la disminuyeron (Fig. 4.1b). Curiosamente, los tres de los cuatro genotipos que aumentaron la relación V/R también mostraron una TCR positiva durante la sumersión (RILs 6 y 47, y Gifu).



Figura 4.1. (a) Tasa de crecimiento relativo de la planta (TCR, g g⁻¹ d⁻¹) de 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20) sometidos a condiciones control y sumersión en agua clara durante una semana. (b) Relación de biomasa seca de vástago/raíz (V/R) después de la primera semana del experimento, tanto en condiciones control como después de la desumersión. La diferencia mínima significativa (DMS) para la interacción genotipo x tratamiento se muestra en (a) (DMS TCR = 0,065) y (b) (DMS V/R = 3,7). Los valores son medias +/- errores estándar de 6–8 repeticiones.

4.3.2) Recuperación de Lotus japonicus a la sumersión completa

Para evaluar la recuperación de las plantas, se utilizó la tasa de crecimiento relativo (TCR) después de la sumersión como un indicador de la capacidad de los diferentes genotipos para reanudar su crecimiento. Los valores de la TCR para la primera semana de recuperación se usaron para inferir la capacidad de una "recuperación temprana" y los valores de la TCR de la segunda semana para inferir las respuestas de "recuperación tardía". En este contexto, se analizó cómo la capacidad de crecer después de la sumersión durante estos períodos (es decir, TCR) se correlacionó entre los genotipos con varios parámetros de interés, como (i) TCR

durante la semana de sumersión *per se*, (ii) relación de biomasa seca de vástago/raíz (V/R) en la de-sumersión, (iii) contenido hídrico relativo en la hoja, (iv) la conductancia estomática, (v) la fluorescencia de la clorofila en hojas adaptadas a la oscuridad (Fv/Fm) y (vi) el verdor en hojas basales y apicales durante las semanas de recuperación temprana y tardía.

La TCR durante la primera semana después de la sumersión (es decir, la recuperación temprana) estuvo inversamente relacionada con la TCR durante la sumersión entre los genotipos (Figura 4.2a). Durante la segunda semana (es decir, la recuperación tardía), hubo una tendencia (p= 0,07) hacia mantener una relación negativa entre la TCR durante la sumersión y la TCR en la recuperación (Fig. 4.2b). Entonces, en general, los genotipos que mostraron una TCR positiva durante la sumersión fueron los de menor rendimiento en términos de TCR durante las fases de recuperación (por ejemplo, los RILs 6 y 47, y Gifu). En el caso de las plantas que crecieron bajo condiciones control, la TCR durante la primera o segunda semana de recuperación (es decir, la segunda y la tercera semana del experimento, respectivamente) no estuvieron relacionadas con la TCR de estos genotipos durante la primera semana del experimento (p > 0,29 en ambos casos; Fig. 4.2c, d).



Figura 4.2. Tasa de crecimiento relativo de la planta (TCR) durante la recuperación "temprana" y "tardía" vs. TCR durante la primera semana del experimento para una semana del tratamiento de sumersión (a, b) y del control (c, d) de 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20). La primera semana después de la desumersión se utilizó para explorar la relación entre estas variables en una fase de "recuperación temprana" (a, c) y la segunda semana después de la desumersión en una fase de "recuperación tardía" (b, d). Los valores son medias +/- errores estándar de 6 a 8 repeticiones.

La relación de biomasa seca de vástago/raíz (V/R) de las plantas sumergidas como estimador del potencial de la transpiración/absorción de agua bajo condiciones de drenaje mostró una relación negativa con la TCR durante la primera semana de recuperación entre genotipos para plantas que provienen de una semana de sumersión. Esto significa que los genotipos con baja relación V/R (por ejemplo, RILs 18, 30, 189) mostraron consistentemente una mayor TCR durante la recuperación temprana (Figura 4.3a). Aunque esta relación negativa entre TCR y la relación V/R persistió durante la recuperación tardía (2da semana después de la sumersión), el ajuste fue más débil que durante la recuperación temprana (comparar los parámetros de ajuste en la Fig. 4.3a vs. la Fig. 4.3b). El genotipo MG20 no se incluyó en las regresiones mencionadas anteriormente ya que su relación V/R era extremadamente alta y, por

lo tanto, se lo consideró como un valor atípico (es decir, relación V/R $_{MG20}$ > rel. V/R $_{promedio}$ + 3 errores estándar). Bajo condiciones control, no hubo relación entre TCR y la relación V/R, tanto para la 2da o la 3er semana del experimento (p> 0,8 en ambos casos; Fig. 4.3c, d).



Figura 4.3. Tasa de crecimiento relativo de la planta (TCR) durante la recuperación "temprana" y "tardía" vs. la relación de biomasa seca de vástago/raíz (V/R) al final de la primera semana del experimento durante una semana en tratamientos de sumersión (a, b) y control (c, d) de 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20). La primera semana después de la de-sumersión se utilizó para explorar la relación entre estas variables en una fase de "recuperación temprana" (a, c) y la segunda semana en una fase de "recuperación tardía" (b, d). El genotipo MG20 se lo consideró un valor atípico y no se incluyó en los parámetros de regresión mostrados en (a) y (b); Sin embargo, si se incluyera, los parámetros hubieran sido r² = 0,34, F_{1,10} = 5,33, y p = 0,043 y r² = 0,63, F_{1,10} = 17,50, y p = 0,0019, respectivamente. Los valores son medias +/- errores estándar de 6 a 8 repeticiones.

4.3.3) Variables fisiológicas de la hoja relacionadas con la recuperación de *Lotus japonicus*

El contenido hídrico relativo de la hoja (CHR), que refleja el balance entre el suministro de agua al tejido de la hoja y la tasa de transpiración, mostró una correlación positiva con la TCR de las plantas tras la desumersión en todos los genotipos durante la primera semana de recuperación (Figura 4.4). Esta relación positiva, donde un CHR más alto de las hojas superiores completamente expandidas correspondía a una TCR más alta, se mantuvo al correlacionar la TCR de la primera semana de recuperación con el CHR de la hoja a los 2 y 7 días después de la de-sumersión (Fig. 4.4a, b). Después de diez días de la desumersión, la mayoría de los genotipos recuperaron por completo los valores del estado hídrico de la hoja, excepto los RILs 6 y 47, y Gifu (Fig. 4.4c). Al final de la segunda semana de recuperación (día 14), todos los genotipos mostraron un alto CHR de las hojas (Fig. 4.4d), que resultó similar a los valores mostrados por las plantas bajo condiciones control a lo largo de todo el experimento (el CHR de la hoja varió de 89,2% a 92,1%; ver Tabla S4.2).



Figura 4.4. Tasa de crecimiento relativo de la planta (TCR) durante la recuperación 'temprana' y 'tardía' vs. el contenido relativo de agua (CHR, %) en las hojas superiores completamente expandidas en los días 2, 7, 10 y 14 después de la desumersión para 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20). La primera semana después de la desumersión se utilizó para explorar la relación entre estas variables en una fase de "recuperación temprana" (a, b) y la segunda semana en una fase de "recuperación tardía" (c, d). Los valores son medias +/- errores estándar (n= 6–8 para TCR y n= 5 para CHR de la hoja). Los valores del CHR de la hoja correspondientes al tratamiento control oscilaron entre 89,2% y 92,4% (todos los datos para cada genotipo y fechas de medición están disponibles en la Tabla S4.2).

La conductancia estomática (g_s) estima la tasa de intercambio gaseoso (ingreso de CO₂ que favorece la fotosíntesis) y la transpiración (pérdida de vapor de agua) a través de los estomas de la hoja según su grado de apertura estomática, que a su vez está relacionado con el estado hídrico de la hoja. Por esta razón, un patrón de respuesta similar entre g_s y CHR de la hoja no fue inesperado (Figura 4.5). En este sentido, se encontró una correlación positiva entre la TCR de las plantas tras la desumersión en todos los genotipos de L. japonicus y g_s en las hojas superiores completamente expandidas durante la primera semana de recuperación (Fig. 4.5). Esta relación, donde los valores de g_s más altos se correlacionaron con las TCR más altas, fue significativa al correlacionar la TCR de la primera semana de recuperación con valores de g_s a los 2 y 7 días después de la desumersión (Fig. 4.5a, b). Sin embargo, es importante destacar que después de alcanzar una semana de desumersión (día 7), los valores de g_s aumentaron y estuvieron cerca de la recuperación total (comparando con los controles; ver Tabla S4.3), con excepción de los RILs 6 y 47 y Gifu, que permanecieron con valores más bajos para este parámetro (Fig. 4.5b). A los 10 y 14 días después de la desumersión (segunda semana de recuperación), todos los genotipos presentaron valores similares para g_s comparables a los controles para todos los genotipos (Fig. 4.5c, d). Los valores de conductancia estomática medidos en las plantas control de estos genotipos a lo largo del experimento oscilaron entre 187 y 208 mmoles m⁻² s⁻¹ (ver Tabla S4.3).



Figura 4.5. Tasa de crecimiento relativo de la planta (TCR) durante la recuperación 'temprana' y 'tardía' vs. la conductancia estomática (g_s , mmol m⁻² s⁻¹) en las hojas superiores completamente expandidas en los días 2, 7, 10, y 14 después de la desumersión para 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20). La primera semana después de la desumersión se utilizó para explorar la relación entre estas variables en una fase de "recuperación temprana" (a, b) y la segunda semana en una fase de "recuperación tardía" (c, d). Los valores son medias +/- errores estándar (n= 6–8 para TCR y n= 5 para g_s). Los valores de conductancia estomática correspondientes al tratamiento control oscilaron entre 187,2 y 208,8 mmol m⁻² s⁻¹ (todos los datos para cada genotipo y fechas de medición están disponibles en la Tabla S4.3).

Una disminución en eficiencia cuántica máxima del PSII de las hojas adaptadas a la oscuridad (Fv/Fm) por debajo de 0,8 se considera como un indicador de fotoinhibición, particularmente relacionado con el daño al Fotosistema II. Curiosamente, todos los genotipos mostraron valores de Fv/Fm similares y por debajo de ese umbral (de 0,55 a 0,59) en las hojas superiores completamente expandidas cuando se midieron dos días después de la desumersión, y no se encontró ninguna correlación con la TCR de la planta durante la primera semana de recuperación entre los genotipos (Fig. 4.6a). Después de una semana de recuperación, Fv/Fm se correlacionó positivamente con la TCR en todos los genotipos,

siendo los RILs 6 y 47 y Gifu los de menor rendimiento, siendo indicativos de fotoinhibición. Durante la segunda semana de recuperación, la medición se realizó a los 11 días después de la desumersión, y los valores para todos los genotipos mostraron una recuperación completa para este parámetro sin diferencias con sus correspondientes controles (Tabla S4.4). En el caso de las plantas control, los valores registrados a lo largo del experimento oscilaron entre 0,803 y 0,816, considerando a todos los genotipos (Tabla S4.4).



Figura 4.6. Tasa de crecimiento relativo de la planta (TCR) durante la recuperación 'temprana' y 'tardía' vs. la fluorescencia de la clorofila en las hojas superiores completamente expandidas adaptadas a la oscuridad (Fv/Fm) a los días 2, 7 y 11 después de la desumersión para 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20). La primera semana después de la desumersión se utilizó para explorar la relación entre estas variables en una fase de "recuperación temprana" (a, b) y la segunda semana en una fase de "recuperación temprana" (a, b) y la segunda semana en una fase de "recuperación tardía" (c). Los valores son medias +/- errores estándar (n= 6–8 para TCR y n= 5 para Fv/Fm). Los valores de Fv/Fm correspondientes al tratamiento control oscilaron entre 0,803 y 0,816 (todos los datos para cada genotipo y fechas de medición están disponibles en la Tabla S4.4).

El monitoreo del verdor de las hojas durante todo el experimento después de la desumersión en las posiciones basales y apicales permitió la estimación del estado de nitrógeno de las hojas, que en general está relacionado con la potencial fotosíntesis y, en el caso de las hojas basales, permite inferir la senescencia y la removilización del nitrógeno. Se encontró que en una semana de sumersión los valores de verdor en las hojas basales y apicales fueron los más bajos, en comparación con los controles (ver valores en la Fig. 4.7a, b vs. Tabla S4.5). A su vez, la TCR durante la primera semana de recuperación se correlacionó positivamente con el verdor de las hojas basales y apicales en todos los genotipos, tanto a los 2 como a los 7 días después de la desumersión. Esto significa que los genotipos que retuvieron más clorofila (RILs 18, 30 y 189) mostraron constantemente un mayor crecimiento (Fig. 4.7a, b). Durante la segunda semana de recuperación, no hubo una correlación clara

entre la TCR de la planta y el verdor de la hoja. Sin embargo, se notó que los genotipos de bajo rendimiento (RILs 6 y 47 y Gifu) mostraron un menor verdor tanto para las hojas basales como las apicales, sin lograr la misma recuperación completa que alcanzaron los otros genotipos (Fig. 4.7c, d).



Figura 4.7. Tasa de crecimiento relativo de la planta (TCR) durante la recuperación 'temprana' y 'tardía' vs. el verdor (unidades SPAD) de hojas basales y apicales completamente expandidas en los días 2, 7, 10 y 14 después de la desumersión para 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20). La primera semana después de la desumersión se utilizó para explorar la relación entre estas variables en una fase de "recuperación temprana" (a, b) y la segunda semana en una fase de "recuperación tardía" (c, d). Los valores son medias +/- errores estándar (n= 6–8 para TCR y n= 5 para el verdor). Los valores del verdor de la hoja correspondientes al tratamiento control oscilaron entre 33,6 y 37,6 unidades SPAD para hojas basales, y 41,0 y 43,4 unidades SPAD para hojas apicales jóvenes completamente expandidas (todos los datos para cada genotipo y fechas de medición están disponibles en la Tabla S4.5).

4.3.4) Correlaciones entre los rasgos que contribuyen en la recuperación de *Lotus japonicus* luego de la sumersión completa

Se exploraron las posibles correlaciones entre los rasgos morfofisiológicos asociados con la TCR de plantas sumergidas como indicativos de su capacidad de recuperación (Tabla 4.1). La relación V/R se correlacionó negativamente con el contenido hídrico relativo foliar (CHR) (- 0,78 < r > -0,69) y la conductancia estomática (g_s) (r = -0,62) durante la primera semana de recuperación, lo que significó que los genotipos con alta relación V/R mostraron un estado hídrico deficiente en la hoja y una menor apertura estomática. Además, el contenido hídrico relativo de la hoja se asoció positivamente con la conductancia estomática (0,73> r <0,94), Fv/Fm (0,80 > r < 0,85) y el verdor de las hojas basales (0,60> r <0,86) y apicales (0,68 > r <0,92). La conductancia estomática se correlacionó de manera positiva con Fv/Fm (0,93> r <0.95) y el verdor de la hoja (0,79> r <0,95). Fv/Fm se relacionó positivamente con el verdor (0,86> r <0,95) en todas las posiciones de las hojas (basales y apicales). El verdor de las hojas basales se correlacionó positivamente con el de las hojas apicales (0,75> r <0,91), lo que significó que la retención de más clorofila después de la desumersión se produjo tanto en las hojas jóvenes como en las adultas.

Tabla 4.1. Coeficientes de correlación de Pearson para los rasgos morfofisiológicos medidos durante la fase de recuperación en 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes (RILs) y sus parentales Gifu y MG20) sometidos a condiciones control (por encima de la diagonal) durante tres semanas, o condiciones de sumersión completa durante una semana (debajo de la diagonal) y se dejó crecer luego de la desumersión por otras 2 semanas. Solo se mostraron correlaciones para los rasgos morfo-fisiológicos que se correlacionaron significativamente con la TCR durante la recuperación de la sumersión (datos de las Figuras 3–7). Las abreviaturas son V/R (relación de biomasa seca de vástago y raíz en la sumersión), CHR (contenido hídrico relativo foliar) g_s (conductancia estomática), Fv/Fm (fluorescencia de la clorofila en hojas adaptadas a la oscuridad). Diferencias significativas: *, p < 0,05; **, p < 0,001; ns, p > 0,05.

| Controles ► Recuperación a la sum. ▼ | V/R | CHR 2-d de recuperación | CHR 7-d de recuperación | gs 2-d de ecuperación | gs 7-d de recuperación | Fv/Fm 7-d de recuperación | Verdor de hojas basales 2-d de recuperación | Verdor de hojas apicales 2-d de recuperación | Verdor de hojas basales 7-d de recuperación | Verdor de hojas apicales 7-d de recuperación |
|-------------------------------------------------------|----------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| V/R | | 0.15 ns | 0.22 ns | 0.18 ns | -0.02 ns | 0.50 ns | -0.04 ns | -0.18 ns | -0.21 ns | 0.27 ns |
| CHR 2-d de recuperación | -0.69* | | 0.31 ns | 0.22 ns | 0.16 ns | -0.22 ns | 0.38 ns | -0.17 ns | -0.20 ns | -0.14 ns |
| CHR 7-d de recuperación | -0.78** | 0.94** | | 0.07 ns | 0.26 ns | -0.29 ns | 0.13 ns | 0.33 ns | -0.26 ns | 0.25 ns |
| gs 2-d de recuperación | -0.62* | 0.91** | 0.85** | | 0.54 ns | 0.25 ns | 0.31 ns | -0.21 ns | -0.28 ns | 0.58* |
| gs 7-d de recuperación | -0.51ns | 0.75* | 0.73* | 0.85** | | -0.15 ns | 0.45 ns | 0.30 ns | 0.04 ns | 0.43 ns |
| Fv/Fm 7-d de recuperación | -0.54 ns | 0.85** | 0.80** | 0.93** | 0.95** | | -0.03 ns | -0.09 ns | -0.24 ns | 0.31 ns |
| Verdor de hojas basales 2-d de recuperación | -0.51 ns | 0.86** | 0.76* | 0.95** | 0.88** | 0.92** | | -0.52 ns | 0.22 ns | -0.08 ns |
| Verdor de hojas apicales 2-d de recuperación | -0.44 ns | 0.68* | 0.60* | 0.83** | 0.92** | 0.93** | 0.87** | | 0.40 ns | -0.72* |
| Verdor de hojas basales 7-d de recuperación | -0.58* | 0.92** | 0.85** | 0.88** | 0.79* | 0.86** | 0.87** | 0.75* | | 0.26 ns |
| Verdor de hojas apicales 7-d de recuperación | -0.46 ns | 0.80** | 0.68* | 0.90** | 0.88** | 0.95** | 0.91** | 0.94** | 0.84** | |

4.4) Discusión

Este capítulo presenta cinco contribuciones principales al conocimiento actual en la recuperación de la planta a la sumersión completa, al demostrar lo siguiente: Primero, la existencia de variación en la capacidad de recuperarse de una sumersión completa en los genotipos de Lotus japonicus seleccionados, por tener una diferente relación de biomasa de vástago/raíz (V/R). Segundo, una evidente compensación entre crecer durante el periodo de sumersión y la capacidad de recuperación demostrada por la correlación negativa de las TCR para cada período (sumersión vs. recuperación) entre genotipos. Tercero, la correlación entre la TCR y la relación de biomasa vástago/raíz (V/R) después de la desumersión, donde los genotipos con baja V/R son los que muestran un mejor rendimiento de la planta durante los primeros días de recuperación. Cuarto, la recuperación de las relaciones hídricas de la planta evaluadas por el contenido hídrico relativo foliar y la conductancia estomática parece esencial para una recuperación temprana y se correlaciona negativamente con V/R, por lo tanto, la relación V/R se puede considerar como un estimador aproximado del balance hídrico entre la transpiración (vástago) y absorción de agua (raíz) en esta leguminosa modelo. Quinto, la importancia de la retención de la clorofila en la hoja para una recuperación rápida de la sumersión, como se infiere en una correlación positiva entre la TCR y el verdor de las hojas basales y apicales de la planta. Además, se evidenció una reparación completa del aparato fotosintético (es decir, todos los Fv/Fm con valores > 0.8) unos pocos días después de la segunda semana de recuperación. En los siguientes párrafos, se discuten cada uno de los rasgos ecofisiológicos que ayudan a las plantas a recuperarse de la sumersión completa en L. japonicus.

Los genotipos que mostraron las TCR más altas durante la sumersión, presentaron las TCR más bajas durante la recuperación, y ocurrió lo contrario con los genotipos que mostraron una baja TCR cuando estuvieron bajo el agua (o incluso valores negativos debido a la pérdida/muerte de tejidos), ya que estos presentaron las TCR más altas en el período de post-sumersión. Esta compensación entre crecer durante la sumersión vs. 'esperar' hasta que el agua retroceda es probablemente parte de las estrategias de crecimiento para hacer frente a la sumersión completa, conocida como "escape" y "quiescencia", respectivamente (Bailey-Serres y Voesenek 2008; Colmer y Voesenek 2009; Striker et al. 2012). Sin embargo, este es uno de los primeros ensayos que demuestran esta compensación entre genotipos para una

especie de leguminosa como *L. japonicus*, ya que la mayoría de los estudios están disponibles para arroz (Setter y Laureles 1996; Hattori et al. 2011 pero ver Zaman et al. 2019 para genotipos de arvejas). En este sentido, es posible especular que los genotipos que crecen durante la sumersión apuntan a emerger sus hojas sobre el agua utilizando reservas de carbono (es decir, almidón). Por el contrario, los que no crecen bajo el agua (ver Manzur et al. 2009 para *L. tenuis* cv. Pampa INTA), utilizan sus reservas de carbono y nutrientes de manera más conservadora (es decir, manteniendo el metabolismo basal) hasta que termine el estrés y luego reanudan su crecimiento más vigorosamente, alimentados por las reservas almacenadas. Para corroborar esta idea se necesitan experimentos adicionales para poder cuantificar el nivel de reservas y su relación con las variables ecofisiológicas asociadas a la recuperación de las plantas a la sumersión completa.

Un buen estado hídrico de la planta es crítico para reanudar el crecimiento después del estrés, ya sea por falta o exceso de agua (sequía o inundación). Por lo tanto, el balance entre la transpiración y la absorción de agua es esencial para mantener un alto contenido hídrico relativo en los tejidos y, por lo tanto, permitir un rápido crecimiento (Tanguilig et al. 1987; Aroca et al. 2012). En este sentido, la relación vástago/raíz (V/R) puede tener un papel importante como variable, al impactar en el balance hídrico de la planta. Se alega que el crecimiento del vástago y la mayor relación vástago/raíz (V/R) durante la sumersión pueden inducir a un mejor balance entre la capacidad del transporte de gases desde el vástago (fuente de oxígeno) y el consumo de oxígeno de las raíces (sumidero de oxígeno) siempre que las plantas puedan tener éxito en el proceso de emerger sus hojas por encima del agua ("estrategia de escape"; Herzog y Pedersen 2014; Pan et al. 2020). Sin embargo, un aumento de la relación V/R también puede limitar la recuperación de la planta después de la sumersión si la pérdida de agua por transpiración no puede compensarse por la absorción de agua de la raíz, independientemente de si la emergencia de las hojas fue alcanzada, como se ve en el pasto forrajero Chloris gavana sometido a una semana de sumersión total (Striker et al. 2017). En este experimento, la relación V/R tras la desumersión se correlacionó negativamente con la TCR durante la fase de recuperación en los genotipos de L. japonicus. Además, se encontró una correlación negativa entre la relación V/R y el contenido hídrico relativo en las hojas (CHR), lo que respalda la idea de que la relación V/R podría haber impactado en la reanudación del crecimiento debido a un estado hídrico de las plantas comprometido. Por lo
tanto, cualquier condición ambiental experimentada por las plantas en su entorno natural que pueda afectar la relación V/R antes de la sumersión, como la disponibilidad de N, P o K (Cakmak et al. 1994; Andrews et al. 1999) puede afectar la posterior recuperación a la sumersión completa.

La asimilación de carbono y el crecimiento después de la desumersión están influenciados por el grado de apertura estomática que permite la difusión del dióxido de carbono hacia los cloroplastos, el estado de N de las hojas y el estado funcional del aparato fotosintético (Luo et al. 2009; Striker et al. 2018; Yeung et al. 2018). En este estudio, se registraron diferencias entre los genotipos en la conductancia estomática (gs), donde los genotipos con alta relación V/R y bajo CHR foliar, fueron los que mostraron valores más bajos de gs hasta manifestar una recuperación de este parámetro durante la segunda semana después de la desumersión. El g_s se relacionó positivamente con las TCR en todos los genotipos, particularmente durante la recuperación temprana. Posteriormente, todos los genotipos lograron una recuperación completa durante la segunda semana después de que cesó la sumersión. La mayoría de los trabajos relacionados con el exceso de agua han informado la conductancia estomática durante/después del anegamiento (Mielke et al. 2003; Striker et al. 2005, 2014; Ploschuk et al. 2017, entre otros) pero rara vez después de la sumersión, entonces las oportunidades de comparación son mínimas (cf. Striker y Ploschuk 2018). Para ejemplificar, plantas de 6 semanas del pasto sensible a las inundaciones, Bromus catharticus, no pudieron restaurar la gs a valores similares a los de los controles incluso después de 15 días de recuperación de 5 días de sumersión completa. En contraste, la planta Phalaris aquatica tolerante a las inundaciones no mostró, para este parámetro, ninguna diferencia con los controles en ningún momento después de la desumersión (Striker y Ploschuk 2018). En general, L. japonicus mostró un comportamiento intermedio en comparación con los pastos mencionados anteriormente, ya que el g_s se redujo por la sumersión completa durante la primera semana, pero se recuperó completamente en todos los genotipos durante la segunda semana.

La retención de clorofila durante la sumersión se correlacionó positivamente con la TCR luego de la sumersión tanto en las hojas basales como en las apicales, como lo indica la dinámica del verdor de las hojas. En este sentido, los genotipos más tolerantes de *L. japonicus* (RILs 18, 30 y 189) podrían haber presentado menores cantidades de especies reactivas de

oxígeno (ROS) tras la re-oxigenación (es decir, menor estrés oxidativo), baja formación de etileno y una disminución de la deshidratación de las hojas durante la recuperación en comparación con los genotipos más susceptibles (RILs 6, 47 y Gifu), similar a lo que se informó en las accesiones contrastantes de Arabidopsis thaliana para la tolerancia a la sumersión (accesiones Lp2-6 vs. Bay-0; Yeung et al. 2018). Curiosamente, todos los genotipos de L. japonicus mostraron valores igualmente bajos para Fv/Fm en hojas jóvenes completamente expandidas, lo que indica daños en el Fotosistema II (PSII) dos días después de la sumersión. Se sabe que la re-oxigenación de las hojas (es decir, normoxia) después de 7 días en un entorno hipóxico inducido por la sumersión puede desencadenar la formación repentina de ROS (Blokhina et al. 2003) que en última instancia provoca daños al PSII. Una semana después de que se liberó el estrés, los genotipos mostraron una capacidad diferencial para recuperar los valores de Fv/Fm, y los que mostraron los valores más bajos de verdor, gs y CHR de las hojas (RILs 6, 47 y Gifu) también fueron los de menor rendimiento. Tal capacidad diferencial entre genotipos para reparar un PSII dañado podría estar relacionado con una diferente capacidad para mitigar los efectos de las ROS (enzimática y no enzimáticamente), o porque los genotipos generan diferentes cantidades de ROS, o una combinación de ambos. Es importante destacar que todos los genotipos mostraron una recuperación completa de Fv/Fm (todos los valores > 0.8) en las hojas jóvenes (verdes) a los once días después de la sumersión, lo que denota que el daño provocado por la sumersión no fue irreversible y que las diferencias entre los genotipos están relacionadas con el tiempo requerido para la recuperación. En contraste con nuestros resultados para L. japonicus, las especies de humedales Alternantera philoxeroides y Hermarthria altissima son capaces de recuperar la funcionalidad del aparato fotosintético después de la desumersión en solo dos días como resultado de una rápida aclimatación a las condiciones cambiantes de oxígeno y/o luz (Luo et al. 2009).

4.5) Conclusión

Se encontró variación en la capacidad de recuperación a la sumersión completa de corto plazo en genotipos de la leguminosa modelo Lotus japonicus. La capacidad de recuperación evaluada a través de la TCR de las plantas después de la sumersión se correlacionó negativamente con la TCR de las plantas durante el período de sumersión, lo que indicaría la existencia de una compensación entre el crecimiento durante y después del estrés. Se identificaron varios rasgos y respuestas ecofisiológicas que se correlacionaron con la capacidad de recuperación entre genotipos, que fueron particularmente importantes para explicar la recuperación de las plantas en la primera semana después de la desumersión. La relación de biomasa del vástago y la raíz (V/R) estuvo inversamente relacionada con la TCR durante la recuperación. El contenido hídrico relativo de la hoja y la conductancia estomática se relacionaron positivamente con la TCR en la semana de recuperación temprana, y se relacionó negativamente con la relación V/R, razón por la cual la relación V/R se podría utilizar potencialmente como un estimador del balance de agua en la planta post- sumersión (transpiración del vástago vs. la absorción de agua en la raíz). El verdor de las hojas basales y apicales se relacionó positivamente con la TCR durante los primeros días después de la sumersión, lo que indica que la retención de clorofila es importante para una recuperación rápida. La reparación completa del daño en el aparato fotosintético por la sumersión ocurrió más tarde que la recuperación del estado hídrico de la planta, completándose durante la segunda semana de recuperación. La inclusión de rasgos que contribuyen a la recuperación de la sumersión en L. japonicus, como se identifica en este trabajo, debe considerarse para acelerar los procesos de mejoramiento de especies forrajeras de Lotus genéticamente relacionadas (L. corniculatus, L. tenuis y L. pedunculatus) que se utilizan en la agricultura actual.

CAPÍTULO V

Discusión general

Esta tesis tuvo tres objetivos específicos principales, que se desarrollan en cada uno de los capítulos experimentales. En este capítulo final, se contrastan las hipótesis planteadas en el capítulo I sobre la variabilidad en el crecimiento y las variables fisiológicas asociadas a la tolerancia a la sumersión en las especies leguminosas forrajeras más utilizadas en pasturas y pastizales. Se pone un énfasis particular en su capacidad de recuperación tras el estrés. A continuación, se presenta un esquema integrador de todos los capítulos. Primero, se analizan las respuestas generales de diversas especies con antecedentes de tolerancia a diferentes estreses, aunque su respuesta ante la sumersión completa sea poco conocida. Luego, se profundiza en las especies más tolerantes, examinando en detalle las variables fisiológicas relacionadas con el crecimiento, a través del estudio de diferentes RILs con variadas proporciones vástago/raíz. Esto permitirá proyectar, a futuro, los hallazgos sobre las especies forrajeras más tolerantes. Finalmente, este capítulo concluye destacando las contribuciones originales de la tesis, que amplían el conocimiento en esta área de investigación.

5.1) Contraste de las hipótesis

El primer objetivo fue evaluar la tolerancia a dos duraciones de sumersión completa de ocho especies leguminosas forrajeras y su recuperación post-estrés. Los resultados obtenidos en el experimento del capítulo II, apoyan las hipótesis planteadas. La primera hipótesis (Hipótesis 1.1) propone que "Existe variabilidad en la tolerancia a la sumersión completa entre leguminosas forrajeras de los géneros Lotus, Trifolium y Melilotus manifestada en términos de supervivencia y de tasas de crecimiento post estrés". Se concluye que, en términos generales, existe variabilidad en la tolerancia y supervivencia entre las especies estudiadas frente a la sumersión. Melilotus y Trifolium fueron las más afectadas en cuanto a supervivencia tras la sumersión. Ni Melilotus albus ni Trifolium michelianum sobrevivieron a la sumersión completa de larga duración. Sin embargo, Trifolium michelianum mostró una supervivencia del 60% frente a la sumersión completa de corta duración. El resto de las especies del género Lotus y Trifolium mostraron una supervivencia del 100% aunque en éstas últimas, las variables fisiológicas no se recuperaron tan rápidamente como si sucedió con las especies de Lotus. Esto condice con la segunda hipótesis, que postula que "Las especies con mayor tolerancia a la sumersión completa presentan mayor capacidad de sostener su conductancia estomática, una menor caída en el verdor foliar y una recuperación rápida del rendimiento cuántico máximo del Fotosistema II y del flujo de energía absorbida por centro de reacción" (Hipótesis 1.2). Se encontró que las especies del género *Lotus* (en particular *L. tenuis*) fueron las que tuvieron una mayor capacidad de mantener su crecimiento luego de la sumersión, ya que sus variables fisiológicas de conductancia estomática, SPAD (verdor foliar), Fv/Fm y ABS/Rc mostraron una recuperación más rápida a lo largo de los días luego de la sumersión.

En base a estas respuestas, se llevó a cabo un análisis más exhaustivo de especies del género *Lotus* en el capítulo III, por demostrar que fueron las más tolerantes a la sumersión. El segundo objetivo de esta tesis fue analizar el crecimiento de accesiones de Lotus (L. tenuis y L. corniculatus) frente a dos tipos de sumersión: parcial y completa, y su capacidad de recuperación. No todos los resultados respaldaron las hipótesis planteadas. Sin embargo, se pudo aceptar la hipótesis 2.1, la cual propone que "Las accesiones de Lotus tenuis y L. corniculatus muestran variabilidad en su tasa de crecimiento después de la sumersión parcial y completa". Las respuestas de ambas especies no solo variaron entre tratamientos, sino que fueron contrastantes entre ellas. L. tenuis mostró un mayor crecimiento que L. corniculatus tras la desumersión. La hipótesis 2.2 postula que "La tasa de crecimiento post-estrés se correlaciona positivamente con la proporción de hojas verdes remanentes al final de la sumersión", fue aceptada parcialmente. Se encontró una correlación positiva entre esta variable y la fracción de hojas remanentes al final de la recuperación tras la sumersión completa, pero solo en L. tenuis. Por otro lado, la hipótesis 2.3, que plantea que "Existe un compromiso entre la tasa de crecimiento intrínseca en condiciones control y la capacidad de crecimiento durante o después del estrés por sumersión", fue rechazada. No se observó una correlación directa entre la tasa de crecimiento de las accesiones control (no sometidas a sumersión) y las que sí fueron sumergidas. Finalmente, la hipótesis 2.4, que afirma que "No existe relación directa entre la tolerancia a la sumersión parcial y completa", fue corroborada en L. corniculatus. En esta especie, las accesiones que toleraban mejor la sumersión parcial no necesariamente toleraban mejor la sumersión completa. En cambio, en L. tenuis, se observó una accesión (Pampa INTA) que toleraba ambos tipos de estrés (Capítulo III).

A su vez, para poder profundizar los mecanismos fisiológicos de las especies del género *Lotus* por demostrar su alta tolerancia a la sumersión, se realizó el tercer y último experimento de esta tesis teniendo como objetivo el identificar aquellos rasgos que estén relacionados con la recuperación a la sumersión completa en RILs de *L. japonicus* con

diferente relación vástago/raíz (Capítulo IV). Ya que se contaba con los recursos genéticos necesarios para ponerlos a prueba por ser esta especie una especie modelo con respuestas extrapolables a las *Lotus* forrajeras. En este caso, se pudo corroborar la Hipótesis 3 enmarcada en este experimento, la cual postula que "Las accesiones de *Lotus japonicus* varían en su capacidad para recuperarse de la sumersión completa, lo cual está asociado a diferencias en la relación vástago/raíz, el estado hídrico de la planta y el verdor de las hojas. Las accesiones con una baja relación vástago/raíz muestran una rápida recuperación del estado hídrico foliar, la conductancia estomática y el verdor de las hojas durante la fase de recuperación, lo que se traduce en una alta tasa de crecimiento post-sumersión". Se evidenció que aquellas accesiones con menor relación vástago/raíz fueron las que tuvieron una mayor tasa de crecimiento luego de la sumersión, relacionadas con que fueron las que tuvieron una mayor rapidez en su capacidad de recuperarse en todas las variables fisiológicas analizadas.

5.2) Esquema integrador de la evaluación de tolerancia a la sumersión de las especies leguminosas forrajeras

En la Figura 5.1 se esquematiza cómo se relacionan los tres capítulos de la tesis, integrando conceptos entre las especies y abordando un análisis general de la tolerancia a la sumersión (variabilidad interespecífica). En el primer nivel (Fig. 5.1a), se observa que las especies forrajeras del género Lotus mostraron la mayor tolerancia, seguido por las especies forrajeras del género Trifolium, que presentó una tolerancia intermedia, mientras que Melilotus demostró ser intolerante a este estrés (Buraschi et al. 2024a). Debido a estos resultados, se decidió profundizar en el análisis de las especies forrajeras del género Lotus, evaluando su respuesta a la sumersión parcial y completa, y cómo las variables de crecimiento se vieron afectadas en las accesiones de L. tenuis y L. corniculatus, las cuales destacaron por su tolerancia y son, además, especies forrajeras por excelencia para ambientes sujetos a estrés abiótico (Fig. 5.1b). Las accesiones de ambas especies mostraron tolerancia a la sumersión, tanto parcial como completa. En particular, la accesión Pampa INTA de L. tenuis tuvo un desempeño superior en ambos tipos de estrés. En el caso de L. tenuis, se encontró una correlación significativa y positiva entre la biomasa total al finalizar la recuperación y la proporción de biomasa asignada a hojas y la relación vástago/raíz. Asimismo, se observó una correlación negativa entre la biomasa total y la proporción de biomasa destinada a las raíces

al final del experimento, con la accesión Pampa INTA destacando por encima de las demás en estas variables (Buraschi et al. 2024b). Por último, se exploraron en mayor detalle las variables fisiológicas asociadas a la tolerancia a la sumersión, ya que en la Figura 5.1b se sugirió que el balance entre la transpiración (vástago: hojas + tallos) y la absorción (raíces) podría estar relacionado con la tolerancia. Para evaluar esta idea, se utilizaron líneas endocriadas recombinantes (RILs) de la especie modelo L. japonicus, con diferentes relaciones vástago/raíz constitutivas (Fig. 5.1c). Se midieron variables fisiológicas como el contenido hídrico relativo foliar, la conductancia estomática, el verdor foliar y la fluorescencia (Fv/Fm) durante la primera y segunda semana post-desumersión, para evaluar la recuperación de las plantas. Los resultados mostraron que las RILs tuvieron una correlación positiva entre la tasa de crecimiento en la fase de recuperación y todas las variables fisiológicas en la primera semana después de la desumersión, acercándose a valores similares al control en la segunda semana. Esto indica que las plantas lograron recuperarse del estrés por sumersión completa (Buraschi et al. 2020). En conclusión, estos resultados resaltan la importancia de disponer de recursos genéticos que permitan identificar rasgos fisiológicos y morfológicos clave, tales como la relacion biomasa aérea/radical, la conductancia estomática, daño fotosintético a través del análisis de la fluorescencia y el verdor foliar para tolerar y sobrevivir a la sumersión, e importantemente retomar el crecimiento durante la fase posterior al estrés.



Figura 5.1. Esquema conceptual que integra los tres capítulos de la tesis, representando el análisis de la tolerancia a la sumersión en distintas especies de leguminosas forrajeras a través de gráficos

generales clave que surgieron durante la tesis. (a) Representación de la variabilidad interespecífica en la tolerancia a la sumersión completa en orden decreciente siendo *Lotus* aquella que mostró más tolerancia, seguida de *Trifolium y Melilotus*. Los números con asteriscos a la derecha indican los días de sumersión completa (5 días y 10 días). (b) Detalle de la evaluación de accesiones de *L. tenuis y L. corniculatus* bajo sumersión parcial y completa. Las accesiones de *L. tenuis* se representaron en triángulos rosas y las de *L. corniculatus* en círculos grises. La accesión Pampa INTA se remarcó en color violeta representando que fue la más tolerante a ambos estreses. Los gráficos esquemáticos representan la correlación positiva entre la biomasa total y la fracción de hojas y la relación vástago/raíz y la correlación negativa entre la biomasa total y la fracción de raíces. (c) Análisis fisiológico de las RILs de *L. japonicus* con distintas relaciones vástago/raíz. Las variables fisiológicas claves para la recuperación post-estrés tales como el contenido hídrico foliar, la conductancia estomática, el verdor foliar y parámetros de fluorescencia de la clorofila de las RILs se representaron con cuadrados grises. Se graficó la primer y segunda semana de recuperación post-sumersión. Este esquema facilita la comprensión de las relaciones entre especies, accesiones y los mecanismos fisiológicos involucrados en la recuperación tras el estrés.

5.3) Implicancias de la tesis para futuras investigaciones

El llevar a cabo esta tesis permitió poder evaluar el desempeño de aquellas especies de leguminosas forrajeras más utilizadas en el mundo cuando son expuestas a un estrés severo como lo es la sumersión. A su vez, además de haber podido identificar algunos de aquellos mecanismos morfológicos y fisiológicos que estén asociados a su supervivencia frente a dicho estrés, se hizo hincapié en cómo fue su recuperación y su capacidad de tolerar efectivamente la sumersión. Esto fue sumamente enriquecedor ya que permite aportar información sobre el comportamiento de las especies y su respuesta ante situaciones estresantes, ya que no siempre los resultados son los mismos cuando las plantas son inmediatamente desumergidas vs. si se analiza su crecimiento tiempo después de haber estado frente a la sumersión. Esto es importante destacarlo ya que, en situaciones de campo, lo más importante es poder mantener los niveles de forraje adecuados para el pastoreo siendo crucial el poder conocer y entender como es el funcionamiento de las plantas forrajeras especialmente en su capacidad de generar forraje luego de haber estado en condiciones estresantes, manteniendo o mejorando su crecimiento cuando la situación a campo sea la favorable.

Se aportó conocimiento acerca de la supervivencia de especies que si bien en la literatura se catalogan como especies tolerantes a determinados estreses, como en el caso del *Melilotus albus* o *T. michelianum* donde se los conoce como tolerantes al anegamiento, no lo fueron en este experimento cuando fueron expuestas a la sumersión completa. A su vez, en el caso de las especies *Lotus tenuis* y *L. corniculatus*, se pudo corroborar su alta tolerancia a

este estrés, profundizando en este género cuando se analizaron las distintas accesiones. Las accesiones tuvieron variaciones en sus respuestas, según si son expuestas a sumersión parcial o completa, aunque todas fueron generalmente tolerantes.

El utilizar a una especie modelo como lo fue *L. japonicus* aportó información específica acerca de los mecanismos fisiológicos y morfológicos (relación vástago/raíz, relaciones hídricas, verdor foliar, conductancia estomática, fluorescencia) que están asociados a la tolerancia por sumersión y así poder extrapolarlo a las especies forrajeras de interés. Se pudo explorar acerca del funcionamiento de las plantas mediante mediciones fisiológicas foliares a través de la fluorescencia, la conductancia estomática, el verdor y contenido hídrico foliar y su impacto frente a la sumersión, pero se podrían abarcar otros aspectos fisiológicos adicionales para contribuir aún más sobre el funcionamiento de las plantas cuando son sumergidas.

5.3.1) Aspectos fisiológicos potenciales para abordar frente a la sumersión

Utilización de las reservas de carbohidratos en el género Lotus frente a la sumersión

Como se comentó en el capítulo I, frente a eventos de inundación, comienza a tener importancia el metabolismo anaeróbico en la producción de energía de las plantas ya que se incrementa la actividad de las enzimas de la vía de la fermentación, tales como la alcohol deshidrogenasa (ADH), piruvato descarboxilasa (PDC) y lactato deshidrogenasa (LDH) (Gibbs y Greenway 2003; Zhou et al. 2012). Esto se produce para poder mantener la supervivencia celular en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, como ocurre ante los eventos de sumersión, y así poder mantener un mínimo de producción de ATP por glucólisis gracias a la inducción de las vías fermentativas en vez de por fosforilación oxidativa (Bailey-Serres y Voesenek 2008). Sin embargo, la generación de energía por esta vía es sumamente ineficiente y, a la vez, aumenta la tasa de consumo de carbohidratos (efecto Pasteur), con lo cual se verían comprometidas las reservas sumado a una menor disponibilidad de ATP (Yeung et al. 2019). Por esta razón, sería razonable analizar la energía almacenada previamente como reserva de carbohidratos para así poder mantener el metabolismo fermentativo de los tejidos sumergidos. Esta energía es obtenida principalmente por el consumo de reservas de carbohidratos a través de la degradación de almidón (Setter y Laureles 1996 para arroz; Manzur et al. 2009 para L. tenuis). Este suministro de carbono que

se removiliza hacia los tejidos, permite mantener el crecimiento y metabolismo energético de las plantas cuando la tasa de fotosíntesis se ve disminuída (Servaites et al. 1989; Schulze et al. 1991; Zeeman et al. 2004). Por lo tanto, dicho almidón tiene la capacidad de actuar como amortiguador del balance de carbono, siendo crucial los niveles en el cual se encuentre luego de la sumersión, ya que puede condicionar la recuperación post-estrés porque se ha sugerido que el rebrote de las plantas estaría directamente relacionado con el consumo del pool de carbohidratos de reserva disponibles (Bailey-Serres y Voesenek, 2008). Esta asimilación del carbono y el crecimiento luego de la sumersión están influenciados también por el grado de apertura estomática, el estado del nitrógeno foliar y la funcionalidad en que se encuentra el aparato fotosintético (actividad de los centros de reacción del fotosistema II) (Luo et al. 2009; Striker et al. 2017; Yeung et al. 2018). Tales variables fueron las que se analizaron en esta tesis a lo largo de todos los experimentos para todas las especies analizadas, con lo cual el obtener información sobre dichas reservas y cómo funcionan en las especies leguminosas forrajeras adicionalmente a los aspectos fisiológicos ya medidos, podrían contribuir en dilucidar aún mas las razones de tolerancia a la sumersión de las plantas.

Al momento, se realizaron estudios sobre estas reservas de carbono frente a sumersión principalmente en especies tales como el arroz (Setter y Laureles 1996; Setter et al. 2010), o en la especie intolerante a la sumersión *Arabidopsis thaliana*, tal como en el trabajo de Vashisht et al. (2011). En este último, se sometieron accesiones de *Arabidopsis* a sumersión completa en oscuridad y se analizó el tiempo de supervivencia en días desde la sumersión. Se vio que los niveles de tolerancia, si bien fueron variables entre accesiones, no se correlacionaron con claridad con la cantidad total inicial de almidón o azúcares ni tampoco dependieron de las condiciones de luz durante la sumersión, pero sí tuvieron una correlación negativa con la elongación de los pecíolos en condiciones bajo agua. Este último resultado indica que la capacidad de refrenar el alargamiento inducido por la oscuridad producto de la sumersión, permitiría sobrevivir más tiempo en estas condiciones presumiblemente por la activación de un metabolismo basal más conservativo (Vashisht et al. 2011).

En esta tesis, a través del capítulo IV, se profundizó en la especie modelo *L. japonicus* en sus aspectos fisiológicos cuando fueron expuestas a la sumersión ya que se contaba con recursos genéticos como los RILs de diferente relación vástago/raíz constitutiva. En un

estudio de Vriet et al. (2010), se obtuvieron mutantes de síntesis y de degradación de almidón al realizarse un screening a una población de *L. japonicus* mutagenizada con etilmetanosulfonato junto con un mapeo genético para identificar las mutaciones responsables. En dicho trabajo, si bien los análisis de los fenotipos mutantes indicarían que los componentes de las vías del metabolismo del almidón en la hoja de *L. japonicus* y *Arabidopsis* en gran medida se conservarían, la importancia de estas vías para su crecimiento y desarrollo sería diferente entre ambas especies. Por lo tanto, al proveer este novedoso material genético, resultaría clave para probar aspectos mecanísticos sobre el rol del almidón como condicionante de la recuperación post-sumersión, por primera vez en una especie del género *Lotus*. Por lo tanto, se podría indagar en futuras investigaciones, el rol de las reservas de carbono usando genotipos silvestres junto con mutantes de síntesis y de degradación de almidón en la leguminosa *L. japonicus*.

Rol de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en el género Lotus frente a la sumersión

Cuando las plantas son sujetas a eventos de sumersión y luego el agua retrocede y dejan de estar sumergidas, el metabolismo anaeróbico cambia a aeróbico y las células comienzan a sufrir un shock oxidativo por la re-oxigenación repentina de los tejidos (Blokhina et al. 2003; Steffens et al. 2013). Esta desumersión también genera un aumento abrupto en la intensidad lumínica, donde eso puede llevar a la fotoinhibición (Osmond y Grace 1995) y, por lo tanto, provocar daños al aparato fotosintético expresándose sintomáticamente en las plantas mediante un aumento de la senescencia foliar. Esto pudo verse demostrado indirectamente en el experimento desarrollado por Striker et al. (2012), donde L. japonicus tuvo una mayor biomasa al finalizar la sumersión que las especies forrajeras L. tenuis y L. corniculatus, pero que no se tradujo necesariamente en un aumento de su crecimiento en términos de biomasa durante la fase de recuperación post estrés. En L. japonicus se evidenció una menor cantidad de hojas fotosintéticas, por abscisión de sus hojas basales luego del retroceso del agua, es decir una mayor senescencia foliar. Así, una re-exposición repentina a O₂ en el ambiente podría haber generado una mayor producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), formadas a partir del oxígeno molecular mediante varias reacciones inespecíficas, como lo son los aniones superóxido (O_2^{-}) , el oxígeno singulete $(^1O_2)$, los hidroxilos (-OH) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Blokhina y Fagerstedt 2010). Se debe considerar que cuando las plantas sufren previamente una privación de oxígeno pueden producirse tres estados fisiológicos transicionales diferentes: anoxia, hipoxia y re-oxigenación; y para que se generen las ROS tiene que producirse hipoxia e indudablemente re-oxigenación (Blokhina et al. 2003), que es lo que ocurre cuando las plantas son quitadas de la sumersión completa.

Con la re-oxigenación luego de la desumersión se generan las condiciones necesarias para la formación de ROS (Blokhina et al. 2000; Boamfa et al. 2005), donde, dependiendo del tipo de tejido en el cual se encuentren, las ROS pueden generar múltiples acciones en las membranas celulares, mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas y retículo endoplasmático. Estas ROS generan daños oxidativos a nivel de lípidos, proteínas e incluso ácidos nucleicos provocando daños moleculares severos, llevando hacia la muerte celular (Foyer y Noctor 2005; Scandalios 2005). Los principales procesos que se desencadenan son la proteólisis, descomposición de la clorofila, pérdida de integridad de las membranas celulares y peroxidación lipídica (Santosa et al. 2007).

Sin embargo, no siempre una re-exposición de O2 lleva al daño oxidativo, ya que las ROS están presenten en todos los organismos aeróbicos coexistiendo en las células con moléculas y enzimas antioxidantes. Las plantas tienen mecanismos de activación de defensas antioxidantes, a través de la actividad enzimática como la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX) y la catalasa (CAT), y también por actividad no enzimática como el glutatión (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides o carotenos, para prevenir el daño oxidativo (Smirnoff 1993; Pignocchi y Foyer 2003; Ogawa 2005). A pesar de ello, cuando hay un desbalance entre las ROS y el sistema antioxidante se termina generando daño (Scandalios 2005) ya sea porque, ante la presencia de eventos ambientales fisiológicamente estresantes, la producción de ROS sea tal que no llega a ser compensada por los antioxidantes, o bien porque la actividad de éstos últimos resulta insuficiente (Drew 1997). Igualmente, las ROS no solo provocan efectos dañinos sobre lípidos, proteínas y ADN, sino que también son necesarias como moléculas señal que actúan como mediadoras de respuesta de ajuste al estrés. Las ROS pueden participar de la regulación de la expresión génica a través de cascadas de señalización que conllevan a modificar la actividad de factores de transcripción (Laloi et al. 2004). Ya que no sólo la sumersión completa genera escasez de oxígeno como se explicó anteriormente, sino que también aumenta la acumulación de la hormona etileno en los tejidos.

En el caso del arroz, el etileno, que promueve el crecimiento de raíces adventicias y la formación de aerénquima, son respuestas que están mediadas también por ROS (Steffens et al. 2012). Un ejemplo de ello lo demuestra el trabajo de Parlanti et al. (2011) usando plantas de arroz (*Oryza sativa*) tratadas con DPI (difenilenodonio), un inhibidor de la NADPH oxidasa que deriva en menor producción de ROS (Nakamura et al. 1989). En dicho trabajo, se observó que las plantas tratadas con DPI que fueron sumergidas tuvieron una disminución en la formación de aerénquima. De esta manera se demostró que una señalización de ROS dependiente de NADPH oxidasa (inhibida por el DPI), estaría involucrada en la formación de estas lagunas aerenquimáticas cuando son expuestas a la sumersión. Sin embargo, merece destacarse que las respuestas de señalización estarían moduladas según la concentración de las ROS, la duración a la que están expuestas las plantas a las mismas y sus características celulares específicas (Martindale et al. 2002).

En cuanto antecedentes del análisis de estas ROS y la sumersión, se realizó un experimento por Luo et al. 2012 donde midieron la concentración de ROS, acetaldehído, la peroxidación lipídica y la capacidad antioxidante para las especies Alternanthera philoxeroides (que posee estrategia de escape a la sumersión completa; LOES) y Hemarthria altissima (que posee estrategia de quiescencia; LOQS) en donde las plantas se sumergieron completamente y luego se desumergieron a los 20 días, llevándolas a condiciones de buen drenaje similares al control. Se puso a prueba si las distintas estrategias de tolerancia a la sumersión afectaban la capacidad antioxidante para hacer frente a las ROS durante y luego de haber sido sumergidas. En A. philoxeroides, la actividad de las moléculas antioxidantes disminuyó cuando fueron sumergidas, y luego en la desumersión retomaron rápidamente su actividad. El mismo patrón se observó con el contenido de acetaldehído, ni bien fueron reaireadas (como sucedió en hojas de arroz (Boamfa et al. 2005)). Tal como se indicó más arriba, con baja disponibilidad de O₂, los órganos sumergidos acumulan etanol a través del proceso de fermentación. Cuando vuelven a re-oxigenarse, el etanol se oxida a acetaldehído. En cuanto a la especie H. altissima, mantuvo su actividad antioxidante incluso estando sumergida. Además, en esta última especie, aunque aumentó el contenido de acetaldehído lentamente cuando estuvieron expuestas al estrés, se revirtió al final del experimento sin inhibir su crecimiento. Por lo tanto, se concluyó que la acumulación de reservas de carbohidratos de esta especie que confiere quiescencia durante la sumersión podría, al menos durante los primeros días de recuperación, contribuir en una mejora antioxidante para hacer frente a las ROS, principalmente a nivel de hojas (Luo et al. 2011; 2012).

Hasta el momento, de las especies analizadas en esta tesis, solo se evaluó en la especie *Lotus japonicus* como actúan las ROS y sus antioxidantes haciendo hincapié principalmente en procesos de simbiosis de rizobios-leguminosas, a través de las leghemoglobinas, e identificando los mecanismos involucrados en la nodulación (Günther et al. 2007; Ramos et al. 2009; Serna-Sanz et al. 2011). Sin embargo, se desconoce cuál es el comportamiento de esta especie modelo y de las *Lotus* forrajeras para hacer frente al estrés por ROS luego de estar sujetas a sumersión completa. Es por eso por lo que el poder analizar como responderían las plantas de *Lotus* al estrés oxidativo, sumado a la vez a variaciones en síntesis/degradación de almidón y azúcares que son necesarios para la generación de una mejora en su capacidad antioxidante, constituirían un gran avance en la información necesaria para dilucidar con mayor detalle el funcionamiento de las especies leguminosas forrajeras cuando están expuestas a eventos como la sumersión.

Escala a nivel de canopeo en especies leguminosas forrajeras frente a la sumersión

En esta tesis se generó conocimiento acerca de las respuestas a nivel de planta individual, y sería de gran utilidad poder escalar futuras investigaciones hacia niveles de canopeo de pastura/pastizal, debido a las propiedades y funciones emergentes por cómo se ubican las plantas en el espacio (i.e. el número plantas/tallos por superficie y la estructura vertical del canopeo) y principalmente por su interacción con las condiciones del ambiente. Por ende, se podrían evaluar la respuesta de las diferentes especies analizadas en este trabajo a condiciones de sumersión y recuperación del estrés en condiciones de canopeo. Esta escala de canopeo forrajero, se podría analizar la productividad primaria neta aérea (PPNA), donde uno de los modelos más difundidos para su estimación es el modelo ecofisiológico de Monteith (1977). En este modelo, la PPNA se calcula como el producto entre la radiación fotosintéticamente activa absorbida por el canopeo (RFAA) y la eficiencia con que dicha radiación fotosintéticamente activa incidente (RFAi) y la fracción de radiación que es absorbida por el canopeo (*f*RFAA). La *f*RFAA, es determinada por la estructura del canopeo, caracterizada por el índice de área foliar (IAF) y el coeficiente de extinción lumínica

(*k*) que indica la atenuación de la radiación dentro del canopeo (Flènet et al. 1996). La EUR está asociada principalmente al proceso de fotosíntesis (siendo relevante para condiciones de estrés abiótico el grado de daño al aparato fotosintético) y es definida principalmente por la especie, el status de nitrógeno y agua del cultivo, y también por la estructura del canopeo y la calidad de la radiación (Sinclair y Horie 1989).

En cultivos se ha observado que una menor PPNA en situaciones de estrés hídrico puede ser explicada por una reducción inmediata de la EUR y de la expansión foliar, y posteriormente por un aumento en la tasa de senescencia foliar del canopeo, que determina una menor área foliar verde y en consecuencia una menor absorción de radiación (Jones et al. 1986). El aumento de la PPNA en respuesta a la fertilización nitrogenada (Bélanger et al. 1992; Turner et al. 1997) está explicado principalmente por un desarrollo más rápido del área foliar y una mayor intercepción de radiación, más que por un efecto del N sobre la capacidad fotosintética del canopeo (Bélanger et al. 1994; Gastal y Bélanger 1993). Sin embargo, hay resultados que muestran reducciones de la EUR en cultivos agrícolas asociadas a una disminución en el N foliar (Turner et al. 2003). Los trabajos sobre efectos de la sumersión en los componentes de la PPNA son notablemente escasos en la literatura, no existiendo trabajos con evaluaciones durante la etapa de recuperación como se hizo a lo largo de toda esta tesis. Bajo estrés por excesos hídricos, los pocos estudios que han utilizado esta aproximación se realizaron para explicar el rendimiento de cultivos anuales de grano (ej. en microcanopeos de anegados de trigo, cebada, arveja y colza, Ploschuk et al. 2021), siendo prácticamente inexistentes los experimentos con especies forrajeras en ambientes anegables. A su vez, se podría evaluar la estructura horizontal y vertical del canopeo en conjunto con la estimación de los componentes de la productividad del cultivo: el número de plantas por área, el número de tallos por planta y el peso por tallo (Volenec et al. 1987; Mattera et al. 2013) y el coeficiente de extinción lumínica; y así analizar la distribución espacial de las plantas en el canopeo y su incidencia en el logro de una estructura óptima de cultivo para alcanzar su máximo potencial de producción.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Snafi, A.E. 2020. Chemical constituents and pharmacological effects of *Melilotus Officinalis* A review. IOSR Journal of Pharmacy, 10: 26-36.
- Altesor, A., Oesterheld, M., Leoni, E., Lezama, F., y Rodríguez, C. 2005. Effect of grazing on community structure and productivity of a Uruguayan grassland. Plant Ecology, 179: 83-91.
- Andrews, M., Sprent, J.I., Raven, J.A. y Eady, P.E. 1999. Relationships between shoot to root ratio, growth and leaf soluble protein concentration of *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* and *Triticum aestivum* under different nutrient deficiencies. Plant, Cell & Environment, 22: 949–958
- Antonelli, C. J., Calzadilla, P. I., Vilas, J. M., Campestre, M. P., Escaray, F. J. y Ruiz, O. A. 2019. Physiological and anatomical traits associated with tolerance to long-term partial submergence stress in the *Lotus* genus: responses of forage species, a model and an interspecific hybrid. Journal of Agronomy and Crop Science, 205: 65-76.
- Armstrong, W. 1980. Aeration in higher plants. Advances in botanical research 7: 225-332. Academic Press.
- Aroca, R., Porcel, R. y Ruiz-Lozano, J.M. 2012. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. Journal Experimental Botany, 63: 43-57.
- Artola A., de los Santos G.G. y Castañeda G.C. 2003. A seed vigour test for birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). Seed Science and Technology, 31: 753-757.
- Assmann, S.M. 2013. Natural variation in abiotic stress and climate change responses in *Arabidopsis*: Implications for twenty-first-century agriculture. International Journal of Plant Sciences, 174: 3-26.
- Babuin, M.F., Campestre, M.P., Rocco, R.A., Bordenave, C.D., Escaray, F.J., Antonelli, C.J., Calzadilla, P.I., Gárriz, A., Serna, E., Carrasco, P., Ruiz, O.A., y Menendez, A.B. 2014.
 Response to Long-Term NaHCO₃-Derived Alkalinity in Model *Lotus japonicus* Ecotypes Gifu B-129 and Miyakojima MG-20: Transcriptomic Profiling and Physiological Characterization. PLOS ONE, 9: e97106.
- Bailey-Serres, J. y Voesenek, L.AC.J. 2008. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. Annual Review of Plant Biology, 59: 313-339.

- Bailey-Serres, J. y Voesenek, L.A.C.J. 2010. Life in the balance: a signaling network controlling survival of flooding. Current opinion in plant biology, 13: 489-494.
- Bailey-Serres, J., Lee, S.C., y Brinton, E. 2012. Waterproofing crops: effective flooding survival strategies. Plant Physiology, 160: 1698–1709.
- Barhoumi, Z. 2024. Effects of nitrogen deficiency on photosynthesis and chlorophyll *a* fluorescence attributes at two contrasting legume forages. Russian Journal of Plant Physiology, 71: 1.
- Bélanger, G., Gastal, F. y Lemaire, G. 1992. Growth analysis of a tall fescue sward fertilized with different rates of nitrogen. Crop Science, 23: 1371-1376.
- Bélanger, G., Gastal, F. y Warembourg, F.R. 1994. Carbon balance of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb): effects of nitrogen fertilization and the growing season. Annals of Botany, 74: 653–659.
- Bennani, K., Thami Alami, I., Bendaou, N., Saidi, N., Gaboun, F., y Al Faiz, C. 2011. Conservation and multivariate analysis utility in characterization of ecogegraphical relationships of *Trifolium* and *Lotus* species. African Journal of Ecology, 49: 1-9.
- Blokhina, O. B., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V., Hoikkala, A., Wähälä, K., y Chirkova, T. V. 2000. Antioxidant status of anoxia-tolerant and-intolerant plant species under anoxia and reaeration. Physiologia Plantarum, 109: 396-403.
- Blokhina, O., Virolainen, E. y Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany, 91: 179-194.
- Blokhina, O. y Fagerstedt, K. V. 2010. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 359-373.
- Blom, C.W.P.M., y Voesenek, L.A.C.J. 1996. Flooding: the survival strategies of plants. Trends in ecology y evolution, 11: 290-295.
- Boamfa, E. I., Veres, A. H., Ram, P. C., Jackson, M. B., Reuss, J., y Harren, F. J. M. 2005. Kinetics of ethanol and acetaldehyde release suggest a role for acetaldehyde production in tolerance of rice seedlings to micro-aerobic conditions. Annals of Botany, 96: 727-736.

- Bullard, M. J. y Crawford, T. J. 1995. Productivity of *Lotus corniculatus* L.(bird's-foot trefoil) in the UK when grown under low-input conditions as spaced plants, monoculture swards or mixed swards. Grass and Forage Science, 50: 439-446.
- Buraschi, F.B., Mollard, F.P., Grimoldi, A.A. y Striker, G.G. 2020. Eco-physiological traits related to recovery from complete submergence in the model legume *Lotus japonicus*. Plants, 9: 538.
- Buraschi, F. B., Mollard, F. P. O., Cordon, G., Grimoldi, A. A. y Striker, G. G. 2024a. Submergence of forage legumes: *Lotus* species show better tolerance than *Trifolium* and *Melilotus* species due to their superior recovery after stress. Functional Plant Biology, FP24206.
- Buraschi, F. B., Mollard, F. P., Di Bella, C. E., Grimoldi, A. A., y Striker, G. G. 2024b. Shaking off the blow: plant adjustments during submergence and post-stress growth in *Lotus* forage species. Functional Plant Biology, 51: FP23172
- Burdon, J.J. 1983. Trifolium repens L. Journal of Ecology, 71: 307-330.
- Cakmak, I., Hengeler, C. y Marschner, H. 1994. Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency. Journal Experimental Botany, 45: 1245–1250.
- Camarao, A. P., Lourenco, J. B., Dutra, S., Hornick, J. L. y Da Silva, M. B. 2004. Grazing buffalo on flooded pastures in the Brazilian Amazon region: a review. Tropical Grasslands, 38: 193-203.
- Caradus, J. R. 1995. Frost tolerance of *Trifolium* species. New Zealand Journal of Agricultural Research, 38: 157-162.
- Čatský, J. 1960. Determination of water deficit in disks cut out from leaf blades. Biologia Plantarum, 2: 76.
- Chapin III, F.S., Autumn, K. y Pugnaire, F. 1993. Evolution of suites of traits in response to environmental stress. The American Naturalist, 142: 78-92.
- Chapman, S.C., Chakraborty, S., Dreccer, M.F. y Howden, S.M. 2012. Plant adaptation to climate change - opportunities and priorities in breeding. Crop and Pasture Science, 63: 251-268.
- Chen, L., Wang, P., Cheng, X., Yan, Z., Wu, F., Jahufer, Z., Han, Y., Habte, E., Jones, C.S., Cheng, Y., y Zhang, J. 2022. Recurrent selection of new breeding lines and yield

potential, nutrient profile and in vitro rumen characteristics of *Melilotus officinalis*. Field Crops Research, 287: 108657.

- Colmer, T. D. 2003. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. Plant, Cell & Environment, 26: 17-36.
- Colmer, T. D. y Pedersen, O. 2008. Underwater photosynthesis and respiration in leaves of submerged wetland plants: gas films improve CO₂ and O₂ exchange. New Phytologist, 177: 918-926.
- 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.
- Colmer, T. D., Winkel, A., y Pedersen, O. 2011. A perspective on underwater photosynthesis in submerged terrestrial wetland plants. AoB Plants, plr030.
- Craig, A.D. 1998. Register of Australian herbage plant cultivars. B. Legumes. 1. Clover *Trifolium michelianum* Savi (balansa clover) cv. Bolta.
- 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. Australian Journal of Experimental Agriculture, 43: 1-18.
- Di Bella, C. E., Striker, G. G., Loreti, J., Cosentino, D. J. y Grimoldi, A. A. 2016. Soil water regime of grassland communities along subtle topographic gradient in the Flooding Pampa (Argentina). Soil and Water Research, 11: 90-96.
- Di Bella, C. E., Kotula, L., Striker, G. G., y Colmer, T. D. 2020. Submergence tolerance and recovery in *Lotus*: Variation among fifteen accessions in response to partial and complete submergence. Journal of Plant Physiology, 249: 153180.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M., Robledo, Y.C. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Díaz, P., Borsani, O. y Monza, J. 2005. *Lotus*-related species and their agronomic importance. *Lotus japonicus* handbook, 25-37.
- Drew, M. C., Jackson, M. B. y Giffard, S. C. 1979. Ethylene-promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in *Zea mays* L. Planta, 147: 83-88.

- Drew, M. C. 1997. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. Annual review of plant biology, 48: 223-250.
- Dūmiņš, K., Andersone-Ozola, U., Samsone, I., Elferts, D., y Ievinsh, G. 2021. Growth and physiological performance of a coastal species *Trifolium fragiferum* as affected by a coexistence with *Trifolium repens*, NaCl treatment and inoculation with rhizobia. Plants, 10: 2196.
- Enkhbat, G., Ryan, M.H., Foster, K.J., Nichols, P.G., Kotula, L., Hamblin, A., Inukai, Y. y Erskine, W. 2021. Large variation in waterlogging tolerance and recovery among the three subspecies of *Trifolium subterranean* L. is related to root and shoot responses. Plant and Soil, 464: 467-487.
- 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., Paolocci, 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: 40.
- Escaray, F.J., Antonelli, C.J., Carrasco, P. y Ruiz, O.A. 2019. Interspecific hybridization improves the performance of *Lotus* spp. under saline stress. Plant Science, 283: 202-210.
- Force, L., Critchley, C., y Van Rensen, J. J. 2003. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. Photosynthesis research, 78: 17-33.
- 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 & Environment, 28: 1056-1071.
- Fukao, T., Xu, K., Ronald, P. C. y Bailey-Serres, J. 2006. A variable cluster of ethylene response factor–like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. The Plant Cell, 18: 2021-2034.
- Fukao, T. y Bailey-Serres, J. 2008. Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105: 16814–16819.

- Fukao, T., Barrera-Figueroa, B. E., Juntawong, P. y Peña-Castro, J. M. 2019. Submergence and waterlogging stress in plants: a review highlighting research opportunities and understudied aspects. Frontiers in Plant Science, 10: 340.
- García, P. E., Badano, N. D., Menéndez, A. N., Bert, F., García, G., Podestá, G., Rovere, S., Verdín, A., Rajagolapan, B. y Arora, P. 2018. Influencia de los cambios en el uso del suelo y la precipitación sobre la dinámica hídrica de una cuenca de llanura extensa. Caso de estudio: Cuenca del Río Salado, Buenos Aires, Argentina. Ribagua, 5: 92-106.
- Gastal, F., y Belanger, G. 1993. The effects of nitrogen fertilization and the growing season on photosynthesis of field-grown tall fescue canopies. Annals of Botany, 72: 401-408.
- Gibberd, M.R. y Cocks, P.S. 1997. Effect of waterlogging and soil pH on the microdistribution of naturalised annual legumes. Australian Journal of Agricultural Research, 48: 223-230.
- Gibberd, M. R., Gray, J. D., Cocks, P. S. y Colmer, T. D. 2001. Waterlogging tolerance among a diverse range of *Trifolium* accessions is related to root porosity, lateral root formation and 'aerotropic rooting'. Annals of Botany, 88: 579-589.
- Gibbs, J. y Greenway, H. 2003. Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. Functional plant biology, 30: 1-47.
- Graham, P.H. y Vance, C.P. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. Plant Physiology, 131: 872-877.
- Günther, C., Schlereth, A., Udvardi, M., y Ott, T. 2007. Metabolism of reactive oxygen species is attenuated in leghemoglobin-deficient nodules of *Lotus japonicus*. Molecular plant-microbe interactions, 20: 1596-1603.
- Hanley, M. E., Sanders, S. K., Stanton, H. M., Billington, R. A., y Boden, R. 2020. A pinch of salt: response of coastal grassland plants to simulated seawater inundation treatments. Annals of Botany, 125: 265-276.
- Harris, S. L. 1994. White clover growth and morphology in dairy pasture in the Waikato region of northern New Zealand. New Zealand journal of agricultural research, 37: 487-494.
- Harrison, M., Cullen, B. y Rawnsley, R. 2014. Reconciling the impacts of extreme rainfall events and extended drought on pasture and livestock production: a new method for generating synthetic climate sequences.

- Harrison, M. T., Cullen, B. R., y Rawnsley, R. P. 2016. Modelling the sensitivity of agricultural systems to climate change and extreme climatic events. Agricultural Systems, 148: 135-148.
- Hattori, Y., Nagai, K., Mori, H., Kitano, H., Matsuoka, M. y Ashikari, M. 2008. Mapping of three QTLs that regulate internode elongation in deepwater rice. Breeding Science, 58: 39-46.
- Hattori, Y., Nagai, K., Furukawa, S., Song, X. J., Kawano, R., Sakakibara, H., Wu, J., Matsumoto, T., Yoshimura, A., Kitano, H., Matsuoka, M., Mori, H. y Ashikari, M. 2009. The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. Nature, 460: 1026-1030.
- Hattori, Y., Nagai, K., y Ashikari, M. 2011. Rice growth adapting to deepwater. Current opinion in plant biology, 14: 100-105.
- Henwood, W. D. 2010. Toward a strategy for the conservation and protection of the world's temperate grasslands. Great Plains Research, 121-134.
- Herzog, M. y Pedersen, O. 2014. Partial versus complete submergence: snorkelling aids root aeration in *Rumex palustris* but not in *R. acetosa*. Plant, Cell & Environment, 37: 2381-2390.
- 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.
- Hoffman, P. C., y Broderick, G. A. 2001. Red clover forages for lactating dairy cows. Focus on Forage. Univ. Wisconsin, 3: 1-2.
- Huber, H., Jacobs, E., y Visser, E. J. 2009. Variation in flooding-induced morphological traits in natural populations of white clover (*Trifolium repens*) and their effects on plant performance during soil flooding. Annals of Botany, 103: 377-386.
- Hunt, R. 1982. Plant growth curves. The functional approach to plant growth analysis. Edward Arnold Ltd.
- Imaz, J. A., Gimenez, D. O., Grimoldi, A. A. y Striker, G. G. 2012. The effects of submergence on anatomical, morphological and biomass allocation responses of tropical grasses *Chloris gayana* and *Panicum coloratum* at seedling stage. Crop and Pasture Science, 63: 1145-1155.

- Inostroza, L., Acuña, H., Méndez, J., Bhakta, M. y Gezan, S. A. 2019. Using genome conservation between *Lotus japonicus* and agronomically important *Lotus* species for discovering drought tolerance QTLs. Euphytica, 215: 153.
- Insausti, P., Chaneton, E. J. y Soriano, A. 1999. Flooding reverted grazing effects on plant community structure in mesocosms of lowland grassland. Oikos, 84: 266–276.
- IPCC. 2014. Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I.
- Iriondo, M.H. 1990. Modelos de sedimentación en la llanura Chaco-Pampeana. Revista de la Asociación Geológica Argentina, 45: 87–101.
- Ismail, A. M. 2018. Submergence tolerance in rice: resolving a pervasive quandary. New Phytologist, 218: 1298-1300.
- Jackson, M. B. 1985. Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. Annual review of plant Physiology, 36: 145-174.
- 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.
- Jia, W., Ma, M., Chen, J., y Wu, S. 2021. Plant morphological, physiological and anatomical adaption to flooding stress and the underlying molecular mechanisms. International journal of molecular sciences, 22: 1088.
- Jiang, Q. y Gresshoff, P.M. 1997. Classical and molecular genetics of the model legume *Lotus japonicus*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 10: 59–68.
- Jones, J. W., Zur, B., y Bennett, J. M. 1986. Interactive effects of water and nitrogen stresses on carbon and water vapor exchange of corn canopies. Agricultural and Forest Meteorology, 38: 113-126.
- Jones, D. A., y Turkington, R. 1986. Biological flora of the British Isles. *Lotus corniculatus*, 1185-1212.
- Jordan, M. y Casaretto, J. 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En Squeo, F, A., y Cardemil, L. (eds.). Fisiología Vegetal 1 – 28. La Serena: Ediciones Universidad La Serena.
- Joyce, C. B., Simpson, M. y Casanova, M. 2016. Future wet grasslands: ecological implications of climate change. Ecosystem health and sustainability, 2: 1-15.

- Justin, S. H. F. W. y Armstrong, W. 1987. The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. New Phytologist, 465-495.
- Kawaguchi, M., Motomura, T., Imaizumi-Anraku, H., Akao, S. y Kawasaki, S. 2001. Providing the basis for genomics in *Lotus japonicus*: the accessions Miyakojima and Gifu are appropriate crossing partners for genetic analyses. Molecular Genetics Genomics, 266: 157–166.
- Kidd, D. R., Di Bella, C. E., Kotula, L., Colmer, T. D., Ryan, M. H., y Striker, G. G. 2020. Defining the waterlogging tolerance of *Ornithopus* spp. for the temperate pasture zone of southern Australia. Crop and Pasture Science, 71: 506-516.
- Knapp, A. K., Beier, C., Briske, D.D., Classen, A.T., Luo, Y., Reichstein, M. y Heisler, J. L. 2008. Consequences of more extreme precipitation regimes for terrestrial ecosystems. AIBS Bulletin, 58: 811-821.
- Koch, M. S. y Mendelssohn, I. A. 1989. Sulphide as a soil phytotoxin: differential responses in two marsh species. The Journal of Ecology, 565-578.
- Kotula, L., Kwa, H. Y., Nichols, P. G., y Colmer, T. D. 2019. Tolerance and recovery of the annual pasture legumes *Melilotus siculus*, *Trifolium michelianum* and *Medicago polymorpha* to soil salinity, soil waterlogging and the combination of these stresses. Plant and Soil, 444: 267-280.
- Kozlowski, T. T. y Pallardy, S. G. 1984. Effect of flooding on water, carbohydrate, and mineral relations. Flooding and plant growth, 165-193.
- Kozlowski, T. T. 1997. Responses of woody plants to flooding and salinity. Tree physiology, 17: 490-490.
- Kundzewicz, Z. W., Su, B., Wang, Y., Wang, G., Wang, G., Huang, J. y Jiang, T. 2019. Flood risk in a range of spatial perspectives–from global to local scales. Natural Hazards and Earth System Sciences, 19: 1319-1328.
- Laan, P. y Blom, C. W. P. M. 1990. Growth and survival responses of *Rumex* species to flooded and submerged conditions: The importance of shoot elongation, underwater photosynthesis and reserve carbohydrates. Journal of Experimental Botany, 41: 775–783.
- Laidlaw, A.S.; Teuber, N. 2001. Temperate Forage Grass-Legume Mixtures: Advances and Perspectives, Fundacao Estudos Agrarios Luiz Queiroz (Fealq): Piracicaba, Brazil, 85-92.

- Laloi, C., Apel, K., y Danon, A. 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. Current opinion in plant biology, 7: 323-328.
- Lazár, D., y Schansker, G. 2009. Models of chlorophyll a fluorescence transients. In Photosynthesis in silico: understanding complexity from molecules to ecosystems, Dordrecht: Springer Netherlands, 85-123.
- Lemaire, G., Hodgson, J. y Chabbi, A. 2011. Grassland productivity and ecosystem services. Wallingford UK and Cambridge MA, USA. CABI: 312.
- Lenssen, J. P., Van de Steeg, H. M. y de Kroon, H. 2004. Does disturbance favour weak competitors? Mechanisms of changing plant abundance after flooding. Journal of Vegetation Science, 15: 305-315.
- Liao, J., Jiang, M. y Li, L. 2010. Effects of simulated submergence on survival and recovery growth of three species in water fluctuation zone of the Three Gorges reservoir. Acta Ecologica Sinica, 30: 216–220.
- Liu, J. H. y Reid, D. M. 1992. Auxin and ethylene-stimulated adventitious rooting in relation to tissue 9. Journal of Experimental Botany, 43: 1191-1198.
- LOTASSA. 2010. 'Bridging genomics and pasture in the XXI century.' PROCISUR: Montevideo, Uruguay.
- Luo, F. L., Nagel, K. A., Zeng, B., Schurr, U. y Matsubara, S. 2009. Photosynthetic acclimation is important for post-submergence recovery of photosynthesis and growth in two riparian species. Annals of Botany, 104: 1435-1444.
- Luo, F. L., Nagel, K. A., Scharr, H., Zeng, B., Schurr, U. y Matsubara, S. 2011. Recovery dynamics of growth, photosynthesis and carbohydrate accumulation after desubmergence: a comparison between two wetland plants showing escape and quiescence strategies. Annals of Botany, 107: 49-63.
- Luo, F. L., Thiele, B., Janzik, I., Zeng, B., Schurr, U., y Matsubara, S. 2012. De-submergence responses of antioxidative defense systems in two wetland plants having escape and quiescence strategies. Journal of Plant Physiology, 169: 1680-1689.
- Lynn, D. E. y Waldren S. 2003. Survival of *Ranunculus repens* L. (creeping buttercup) in an amphibious habitat. Annals of Botany, 91: 75–84.

- Malaviya, D. R., Roy, A. K., Kaushal, P., Kumar, B., y Tiwari, A. 2008. Genetic similarity among *Trifolium* species based on isozyme banding pattern. Plant Systematics and Evolution, 276: 125-136.
- Malik, A. I., Colmer, T. D., Lambers, H. y Schortemeyer, M. 2001. Changes in physiological and morphological traits of roots and shoots of wheat in response to different depths of waterlogging. Functional Plant Biology, 28: 1121-1131.
- Malik, A. I., Colmer, T. D., Lambers, H., Setter, T.L. y Schortemeyer, M. 2002. Short-term waterlogging has long-term effects on the growth and physiology of wheat. New Phytologist, 153: 225–236.
- 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.
- Manzur, M.E., Grimoldi, A.A. y Striker, G.G. 2020. The forage grass *Paspalum dilatatum* tolerates partial but not complete submergence caused by either deep water or repeated defoliation. Crop and Pasture Science, 71: 190-198.
- Marinoni, L., Zabala, J.M., Patiño, J. y Pensiero, J.F. 2017. Efecto de la temperatura y salinidad en la germinación y crecimiento inicial de un material naturalizado de *Lotus tenuis* Waldst. y Kit. Fave. Sección Ciencias Agrarias. 16: 47-59.
- Marković, J., Štrbanović, R., Terzić, D., Stanisavljević, R., Đokić, D., Vasić, T., y Anđelković, B. 2011. Estimation of red clover (*Trifolium pratense* L.) forage quality parameters depending on the stage of growth. Biotechnology in Animal Husbandry, 27: 1563-1569.
- Marten, G.C. 1989. Breeding forage grasses to maximize animal performance. Contributions From Breeding Forage and Turf Grasses, 15: 71-104.
- Martindale, J. L., y Holbrook, N. J. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. Journal of cellular physiology, 192: 1-15.
- Mattera, J., Romero, L. A., Cuatrín, A. L., Cornaglia, P. S., y Grimoldi, A. A. 2013. Yield components, light interception and radiation use efficiency of lucerne (*Medicago sativa* L.) in response to row spacing. European Journal of Agronomy, 45: 87-95.
- Maxwell, K. y Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. Journal of Experimental Botany, 51: 659-668.

- Mazzanti, A., Montes, L., Miñón, D., Sarlangue, H. y Chepi, 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.
- McEwen, J., y Johnston, A. E. 1985. Yield and nitrogen-fixation of *Melilotus alba*. Field Crops Research, 12: 187-188.
- Menon-Martínez, F.E., Grimoldi, A.A., Striker, G.G. y Di Bella, C.E. 2021. Variability among *Festuca arundinacea* cultivars for tolerance to and recovery from waterlogging, salinity and their combination. Crop and Pasture Science, 72: 75-84.
- Mielke, M.S., de Almeida, A.A.F., Gomes, F.P., Aguilar, M.A.G. y Mangabeira, P.A.O. 2003. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Genipa americana* seedlings to soil flooding. Environmental and Experimental Botany, 50: 221– 231.
- 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.
- Mommer, L. y Visser, E. J. 2005. Underwater photosynthesis in flooded terrestrial plants: a matter of leaf plasticity. Annals of botany, 96: 581-589.
- Monteith, J.L. 1977. Climate and the efficiency of crop production in Britain. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 281: 277– 294.
- Mun, T., Bachmann, A., Gupta, V., Stougaard, J. y Andersen, S.U. 2016. *Lotus* Base: An integrated information portal for the model legume *Lotus japonicus*. Scientific Reports, 6: 39447.
- Nagai, K., Hattori, Y. y Ashikari, M. 2010. Stunt or elongate? Two opposite strategies by which rice adapts to floods. Journal of plant research, 123: 303-309.
- 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, Y., Ohtaki, S., Makino, R., Tanaka, T., y Ishimura, Y. 1989. Superoxide anion is the initial product in the hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in porcine thyroid plasma membrane. Journal of Biological Chemistry, 264: 4759-4761.

- Nasrullah, A.S., Umar, M., Sun, L., Naeem, M., Yasmin, H. y Khan, N. 2022. Flooding tolerance in plants: from physiological and molecular perspectives. Brazilian Journal of Botany, 45: 1161-1176.
- Nichols, P., Craig, A., Bonython, A., Rogers, M.J., Ballard, R., Charman, N., Hughes, S., Colmer, T.D., McClements, D. y Barrett-Lennard, E. 2010. Development of *Melilotus siculus* – A new salt and waterlogging-tolerant annual fodder legume species for Mediterranean-type climates. In Sustainable use of genetic diversity in forage and turf breeding, Springer Netherlands, 131-135.
- Nichols, P.G.H., Revell, C.K., Humphries, A.W., Howie, J.H., Hall, E.J., Sandral, G.A., Ghamkhar, K. y Harris, C.A. 2012. Temperate pasture legumes in Australia—their history, current use, and future prospects. Crop and Pasture Science, 63: 691-725.
- Ogawa, K. I. 2005. Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses. Antioxidants & redox signaling, 7: 973-981.
- Osmond, C. B., y Grace, S. C. 1995. Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? Journal of Experimental Botany, 1351-1362.
- Pajuelo, E. y Stougaard, J. 2005. *Lotus japonicus* as a model system. In *Lotus japonicus* handbook Springer, Dordrecht, 3-24.
- Pan, Y., Cieraad, E., Clarkson, B. R., Colmer, T. D., Pedersen, O., Visser, E. J., Voesenek L.
 A. C. J. y van Bodegom, P. M. 2020. Drivers of plant traits that allow survival in wetlands. Functional Ecology, 34: 956-967.
- Panda, D., Rao, D. N., Sharma, S. G., Strasser, R. J., y Sarkar, R. K. 2006. Submergence effects on rice genotypes during seedling stage: Probing of submergence driven changes of photosystem 2 by chlorophyll a fluorescence induction OJIP transients. Photosynthetica, 44: 69-75.
- Panda, D., Sharma, S. G., y Sarkar, R. K. 2008. Chlorophyll fluorescence parameters, CO₂ photosynthetic rate and regeneration capacity as a result of complete submergence and subsequent re-emergence in rice (*Oryza sativa* L.). Aquatic Botany, 88: 127-133.
- Parlanti, S., Kudahettige, N. P., Lombardi, L., Mensuali-Sodi, A., Alpi, A., Perata, P., y Pucciariello, C. 2011. Distinct mechanisms for aerenchyma formation in leaf sheaths of

rice genotypes displaying a quiescence or escape strategy for flooding tolerance. Annals of botany, 107: 1335-1343.

- Pezeshki, S. R. 2001. Wetland plant responses to soil flooding. Environmental and Experimental Botany, 46: 299-312.
- Pignocchi, C., y Foyer, C. H. 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. Current opinion in plant biology, 6: 379-389.
- Phelan P, Moloney AP, McGeough EJ, Humphreys J, Bertilsson J, O'Riordan EG, O'KielyP. 2015. Forage legumes for grazing and conserving in ruminant production systems. Critical Reviews in Plant Sciences, 34: 281-326.
- Ploschuk, R.A., Grimoldi, A.A., Ploschuk, E.L. y Striker, G.G. 2017. Growth during recovery evidences the waterlogging tolerance of forage grasses. Crop and Pasture Science, 68: 574–582.
- Ploschuk, R. A., Miralles, D. J., y Striker, G. G. 2021. Early-And late-waterlogging differentially affect the yield of wheat, barley, oilseed rape and field pea through changes in leaf area index, radiation interception and radiation use efficiency. Journal of Agronomy and Crop Science, 207: 504-520.
- Ponnamperuma, F. N. 1984. Effects of flooding on soils. Flooding and plant growth, 9-45.
- Poorter, H y Nagel O. 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. Functional Plant Biology, 27: 1191-1191.
- Poorter, H., Niklas, K.J., Reich, P.B., Oleksyn, J., Poot, P. y Mommer, L. 2012. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. New Phytologist, 193: 30-50.
- Quinos, P.M., Insausti, P. y Soriano, A. 1998. Facilitative effect of *Lotus tenuis* on *Paspalum dilatatum* in a lowland grassland of Argentina. Acta Oecologica, 19: 255-262.
- Ramos, J., Matamoros, M. A., Naya, L., James, E. K., Rouhier, N., Sato, S., ... y Becana, M. 2009. The glutathione peroxidase gene family of *Lotus japonicus*: characterization of genomic clones, expression analyses and immunolocalization in legumes. New Phytologist, 181: 103-114.

- Ravagnani, A., Abberton, M. T., y Skøt, L. 2012. Development of genomic resources in the species of *Trifolium* L. and its application in forage legume breeding. Agronomy, 2: 116-131.
- Rebollo, R. y Gómez-Sal, A. 2003. Aprovechamiento sostenible de los pastizales. Revista Ecosistemas, 12.
- Rebuffo M. 1998. *Lotus corniculatus* INIA Draco; características agronómicas. En Jornada de Lechería y Pasturas, 103-106.
- Rivera-Contreras, I. K., Zamora-Hernández, T., Huerta-Heredia, A. A., Capataz-Tafur, J., Barrera-Figueroa, B. E., Juntawong, P., y Peña-Castro, J. M. 2016. Transcriptomic analysis of submergence-tolerant and sensitive *Brachypodium distachyon* ecotypes reveals oxidative stress as a major tolerance factor. Scientific reports, 6: 27686.
- 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.
- Rochon, J. J., Doyle, C. J., Greef, J. M., Hopkins, A., Molle, G., Sitzia, M., Scholefield, D. y Smith, C. J. 2004. Grazing legumes in Europe: a review of their status, management, benefits, research needs and future prospects. Grass and Forage Science, 59: 197-214.
- Rogers, M.E. y Noble, CL. 1991. The effect of NaCl on the establishment and growth of balansa clover (*Trifolium michelianum* Savi var. balansae Boiss.). Australian Journal of Agricultural Research, 42: 847-857.
- Rogers, M.E. y West, D.W. 1993. The effects of rootzone salinity and hypoxia on shoot and root growth in *Trifolium* species. Annals of Botany, 72: 503-509.
- Rogers, M. E., Colmer, T. D., Frost, K., Henry, D., Cornwall, D., Hulm, E., Deretic, J., Hughes, S. R. y Craig, A. D. 2008. Diversity in the genus *Melilotus* for tolerance to salinity and waterlogging. Plant and Soil, 304: 89-101.
- Rogers, M. E., Colmer, T. D., Frost, K., Henry, D., Cornwall, D., Hulm, E., Hughes, S., Nichols, P. G. H. y Craig, A. D. 2009. The influence of NaCl salinity and hypoxia on aspects of growth in *Trifolium* species. Crop y Pasture Science 60, 71–82.
- Sala, O. E., Oesterheld, M., León, R. J. C. y Soriano A. 1986. Grazing effects upon plant community structure in subhumid grasslands of Argentina. Vegetatio, 67: 27–32.

- Sand-Jensen, K. A. J. 1989. Environmental variables and their effect on photosynthesis of aquatic plant communities. Aquatic Botany, 34: 5-25.
- Santosa, I. E., Ram, P. C., Boamfa, E. I., Laarhoven, L. J. J., Reuss, J., Jackson, M. B., y Harren, F. J. M. 2007. Patterns of peroxidative ethane emission from submerged rice seedlings indicate that damage from reactive oxygen species takes place during submergence and is not necessarily a post-anoxic phenomenon. Planta, 226: 193-202.
- Sasidharan, R., Bailey-Serres, J., Ashikari, M., Atwell, B. J., Colmer, T. D., Fagerstedt, K., Fukao, T., Geigenberger, G., Hebelstrup, K., Hill, R.D., Holdsworth, M. J., Ismail, A., Licausi, F., Mustroph, A., Nakazono, M., Pedersen, O., Perata, P., Sauter, M., Shih, M.C., Sorrell, B., Striker, G.G., van Dongen, J.T., Whelan, J., Xiao, S., Visser, E.J.W. y Voesenek, L.A. 2017. Community recommendations on terminology and procedures used in flooding and low oxygen stress research. New Phytologist, 214: 1403-1407.
- Sasidharan, R., Hartman, S., Liu, Z., Martopawiro, S., Sajeev, N., van Veen, H., Yeung, E. y Voesenek, L.A. 2018. Signal dynamics and interactions during flooding stress. Plant Physiology, 176: 1106-1117.
- Sato, S., Nakamura Y., Kaneko T., Asamizu E., Kato T. y Nakao, M. 2008. Genome structure of the legume *Lotus japonicus*. DNA Research 15: 227–239.
- Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Brazilian journal of medical and biological research, 38: 995-1014.
- Schulze, W., Stitt, M., Schulze, E. D., Neuhaus, H. E., y Fichtner, K. 1991. A quantification of the significance of assimilatory starch for growth of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Plant Physiology, 95: 890-895.
- Serna-Sanz, A., Parniske, M., y Peck, S. C. 2011. Phosphoproteome analysis of *Lotus japonicus* roots reveals shared and distinct components of symbiosis and defense. Molecular plant-microbe interactions, 24: 932-937.
- Servaites, J. C., Fondy, B. R., Li, B., y Geiger, D. R. 1989. Sources of carbon for export from spinach leaves throughout the day. Plant Physiology, 90: 1168-1174.
- Setter, T. L. y Laureles, E. V. 1996. The beneficial effect of reduced elongation growth on submergence tolerance of rice. Journal of Experimental Botany, 47: 1551–1559

- Setter, T. L., Bhekasut, P. y Greenway, H. 2010. Desiccation of leaves after de-submergence is one cause for intolerance to complete submergence of the rice cultivar IR 42. Functional Plant Biology, 37: 1096-1104.
- Sierra, E. M. y Montecinos, E. R. 1990. Cronología de inundaciones y sequías en la depresión del Salado. Revista de la Facultad de Agronomía, 11: 35-45.
- Signorelli, S., Corpas, F.J., Borsani, O., Barroso, J.B. y Monza, J. 2013. Water stress induces a differential and spatially distributed nitro-oxidative stress response in roots and leaves of *Lotus japonicus*. Plant Science, 201: 137-146.
- Simova-Stoilova, L., Demirevska, K., Kingston-Smith, A., y Feller, U. 2012. Involvement of the leaf antioxidant system in the response to soil flooding in two *Trifolium* genotypes differing in their tolerance to waterlogging. Plant science, 183: 43-49.
- Sinclair, T. R., y Horie, T. 1989. Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation use efficiency: a review. Crop science, 29: 90-98.
- Singh, R. J., Chung, G. H. y Nelson, R. L. 2007. Landmark research in legumes. Genome, 50: 525-537.
- Sivakumaran, S., Rumball, W., Lane, G. A., Fraser, K., Foo, L. Y., Yu, M. y Meagher, L. P. 2006. Variation of proanthocyanidins in *Lotus* species. Journal of chemical ecology, 32: 1797-1816.
- Smetham, M.L. 1973. Grazing management, p. 179-228. En: R.H.M. Langer (editor), Pastures and Pasture Plants. A.H. and A.W. Reed, London.
- Smirnoff, N. 1993. Tansley Review No. 52. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New phytologist, 27-58.
- Smith, R. W., Penrose, B., Langworthy, A. D., Humphries, A. W., Harris, C. A., Rogers, M. E., Nichols, P. G. H y Hayes, R. C. 2023. Strawberry clover (*Trifolium fragiferum*): current status and future role in Australian agriculture. Crop and Pasture Science, 74: 680–699.
- Sone, C., Ito, O., y Sakagami, J. I. 2012. Characterizing submergence survival strategy in rice via chlorophyll fluorescence. Journal of Agronomy and Crop Science, 198: 152-160.
- Soriano, A. 1991. Pastizales naturales de la región pampeana: distribución de biomasa aérea y radical. Revista Argentina de Agrobiología, 5: 27-33.

- Sparrow, E. B., Sparrow, S. D., y Cochran, V. L. 1993. Phosphorus and nitrogen dynamics during field incubations in forest and fallow subarctic soils. Biology and fertility of soils, 16: 243-248.
- Steffens, B., Kovalev, A., Gorb, S. N., y Sauter, M. 2012. Emerging roots alter epidermal cell fate through mechanical and reactive oxygen species signaling. The Plant Cell, 24: 3296-3306.
- Steffens, B., Steffen-Heins, A. y Sauter, M. 2013. Reactive oxygen species mediate growth and death in submerged plants. Frontiers in Plant Science, 4: 179.
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., y Srivastava, A. 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. En: Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis (pp. 321-362). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Striker, G. G., Insausti, P., Grimoldi, A. A., Ploschuk, E. L. y Vasellati, V. 2005. Physiological and anatomical basis of differential tolerance to soil flooding of *Lotus corniculatus* L. and *Lotus glaber* Mill. Plant y Soil, 276: 301–311.
- Striker, G. G., Insausti, P., Grimoldi, A. A. y Vega, A. S. 2007. Trade-off between root porosity and mechanical strength in species with different types of aerenchyma. Plant, Cell & Environment, 30: 580-589.
- Striker, G. G., Insausti, P. y Grimoldi, A. A. 2008. Flooding effects on plants recovering from defoliation in *Paspalum dilatatum* and *Lotus tenuis*. Annals of Botany, 102: 247-254.
- Striker, G. G., Mollard, F. P. O., Grimoldi, A. A., León R. J. C. y Insausti, P. 2011a. Trampling enhances the dominance of graminoids over forbs in flooded grassland mesocosms. Applied Vegetation Science, 14: 95–106.
- Striker, G. G., Manzur, M. E. y Grimoldi, A. A. 2011b. Increasing defoliation frequency constrains regrowth of *Lotus tenuis* under flooding. The role of crown reserves. Plant and Soil, 343: 261–272.
- Striker, G. G. 2012a. Flooding stress on plants: anatomical, morphological and physiological responses. Botany, 1: 3-28.
- Striker, G. G. 2012b. 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 & 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. 2017. Flooding tolerance of forage legumes. Jornal of Experimental. Botany, 68: 1851-1872.
- Striker, G. G., Casas, C., Kuang, X. y Grimoldi, A.A. 2017. No escape? Costs and benefits of leaf de-submergence in the pasture grass *Chloris gayan* under different flooding regimes. Functional Plant Biology, 44: 899-906.
- Striker, G. G. y Ploschuk, R.A. 2018. Recovery from short-term complete submergence in temperate pasture grasses. Crop and Pasture Science, 69: 745-753.
- Striker, G. G., Kotula, L. y Colmer, T. D. 2019. Tolerance to partial and complete submergence in the forage legume *Melilotus siculus*: an evaluation of 15 accessions for petiole hyponastic response and gas-filled spaces, leaf hydrophobicity and gas films, and root phellem. Annals of Botany, 123: 169-180.
- Striker, G.G. 2023. An overview of oxygen transport in plants: diffusion and convection. Plant Biology, 25: 842-847.
- Striker, G. G. 2024. Oxygen Transport and Plant Ventilation. Pp. 139-156 en Sakagami, JI., Nakazono, M. (eds). Responses of Plants to Soil Flooding. Springer, Singapore.
- Taboada, M.A. y Lavado, R.S. 1988. Características y dinámica del sistema radical en pastizales de la región pampeana. Ecología Austral, 1: 31-42.
- Taboada, M.A., Damiano, F. y Lavado, R. S. 2009. Inundaciones en la Región Pampeana. Consecuencias sobre los suelos. Alteraciones de la fertilidad de los suelos: el halomorfismo, la acidez, el hidromorfismo y las inundaciones. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, 5: 149-184.
- Tanguilig, V. C., Yambao, E. B., O'toole, J. C. y De Datta, S. K. 1987. Water stress effects on leaf elongation, leaf water potential, transpiration, and nutrient uptake of rice, maize, and soybean. Plant Soi, 103: 155-168.
- 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.
- 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.
- Tiver, N.S. 1954. Strawberry clover. Journal of the Department of Agriculture of South Australia, 57: 317–325.
- Turner, D. P., Urbanski, S., Bremer, D., Wofsy, S. C., Meyers, T., Gower, S. T., y Gregory,M. 2003. A cross-biome comparison of daily light use efficiency for gross primary production. Global change biology, 9: 383-395.
- Vashisht, D., Hesselink, A., Pierik, R., Ammerlaan, J. M. H., Bailey-Serres, J., Visser, E. J.
 W., Pedersen, O., van Zanten, M., Vreugdenhil, D., Jamar, D. C. L, Voesenek, L. A. C.
 J, y Sasidharan, R. 2011. Natural variation of submergence tolerance among Arabidopsis thaliana accessions. New Phytologist 190: 299–310.
- 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: 019-028.
- Voesenek, L.A., Colmer, T.D., Pierik, R., Millenaar, F.F. y Peeters, A.J.M. 2006. How plants cope with complete submergence. New Phytologist, 170: 213-226.
- Voesenek, L.A. y Bailey-Serres, J. 2013. Flooding tolerance: O₂ sensing and survival strategies. Current Opinion in Plant Biology, 16: 647-653.
- Voesenek, L. A. y Bailey-Serres, J. 2015. Flood adaptive traits and processes: an overview. New Phytologist, 206: 57-73.
- Volenec, J. J., Cherney, J. H., y Johnson, K. D. 1987. Yield components, plant morphology, and forage quality of alfalfa as influenced by plant population 1. Crop science, 27: 321-326.

- Vriet, C., Welham, T., Brachmann, A., Pike, A., Pike, J., Perry, J., Parniske, M., Sato, S., Tabata, S., Smith, A. M., y Wang, T. L. 2010. A suite of *Lotus japonicus* starch mutants reveals both conserved and novel features of starch metabolism. Plant Physiology 154: 643–655.
- Vriet, C., Smith, A.M. y Wang, T.L. 2014. Root starch reserves are necessary for vigorous re-growth following cutting back in *Lotus japonicus*. PLoS One, 9: e87333.
- Vriezen, W. H., De Graaf, B., Mariani, C. y Voesenek, L. A. 2000. Submergence induces expansin gene expression in flooding-tolerant *Rumex palustris* and not in floodingintolerant *R. acetosa*. Planta, 210: 956-963.
- Wang, Z., You, J., Xu, X., Yang, Y., Wang, J., Zhang, D., Mu, L., Zhuang, X., Shen, Z. y Guo, C. 2024. Physiological and Biochemical Responses of *Melilotus albus* to Saline and Alkaline Stresses. Horticulturae, 10: 297.
- Watkinson, A. R. y Ormerod, S. J. 2001. Grasslands, grazing and biodiversity: editors' introduction. Journal of applied ecology, 233-237.
- Weih, M. 2001. Evidence for increased sensitivity to nutrient and water stress in a fastgrowing hybrid willow compared with a natural willow clone. Tree Physiology, 21: 1141-1148.
- Wilson, J.B. 1988. Shoot competition and root competition. Journal of Applied Ecology, 25: 279-296.
- Winkel, A., Colmer, T.D., Ismail, A.M. y Pedersen, O. 2013. Internal aeration of paddy field rice (*Oryza sativa*) during complete submergence–importance of light and floodwater O₂. New Phytologist, 197: 1193-1203.
- Wu, F., Duan, Z., Xu, P., Yan, Q., Meng, M., Cao, M., Jones, C. S., Zong, X., Zhou, P., Wang, Y., Luo, K., Wang, S., Yan, Z., Wang, P., Di, H., Ouyang, Z., Wang, Y., y Zhang, J. 2022. Genome and systems biology of *Melilotus albus* provides insights into coumarins biosynthesis. Plant Biotechnology Journal, 20: 592-609.
- Xu, K., Xu, X., Fukao, T., Canlas, P., Maghirang-Rodriguez, R., Heuer, S., Ismail, A. M., Bailey-Serres, J., Ronald, P. C., y Mackill, D. J. 2006. Sub1A is an ethylene-responsefactor-like gene that confers submergence tolerance to rice. Nature, 442: 705.

- Yang, Z., Cao, Y., Shi, Y., Qin, F., Jiang, C., y Yang, S. 2023. Genetic and molecular exploration of maize environmental stress resilience: Toward sustainable agriculture. Molecular Plant, 16: 1496-1517.
- Yeung, E., van Veen, H., Vashisht, D., Paiva, A. L. S., Hummel, M., Rankenberg, T., Steffens B., Steffen-Heins, A., Sauter, M., de Vries, M., Schuurink, R. C., Bazin, J., Bailey-Serres, J., Voesenek, L. A. C. J. y Sasidharan, R. 2018. A stress recovery signaling network for enhanced flooding tolerance in *Arabidopsis thaliana*. PNAS, 115: E6085-E6094.
- Yeung, E., Bailey-Serres, J. y Sasidharan, R. 2019. After The Deluge: Plant Revival Post-Flooding. Trends in Plant Science 24, 443–454.
- Young, N. D., Cannon, S. B., Sato, S., Kim, D., Cook, D. R., Town, C. D., Roe, B.A. y Tabata, S. 2005. Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. Plant physiology, 137: 1174-1181.
- Zabala, J. M., Marinoni, L., Giavedoni, J. A., y Schrauf, G. E. 2018. Breeding strategies in *Melilotus albus* Desr., a salt-tolerant forage legume. Euphytica, 214: 1-15.
- Zaman, M.S.U., Malik, A.I., Erskine, W. y Kaur, P. 2019. Changes in gene expression during germination reveal pea genotypes with either "quiescence" or "escape" mechanisms of waterlogging tolerance. Plant, Cell & Environment, 42: 245–258.
- Zeeman, S. C., Smith, S. M., y Smith, A. M. 2004. The breakdown of starch in leaves. New Phytologist, 163: 247-261.
- Zhang, Q., Huber, H., Beljaars, S.J., Birnbaum, D., de Best, S., de Kroon, H. y Visser, E.J.W. 2017. Benefits of flooding-induced aquatic adventitious roots depend on the duration of submergence: linking plant performance to root functioning. Annals of Botany, 120: 171-180.
- Zhou, J., Tian, X., Qiao, L., y Qin, P. 2012. Respiratory enzyme activity and regulation of respiration pathway in seashore mallow (*Kosteletzkya virginica*) seedlings under waterlogging conditions. Australian Journal of Crop Science, 6: 756.

APENDICE

CAPITULO II

Fig. S2.1. Esquema del experimento: La barra gris representa el tratamiento de control, la barra púrpura indica el tratamiento de sumersión corta de 5 días y la barra verde indica el tratamiento de sumersión larga de 10 días. Las flechas negras denotan las cosechas iniciales antes de los tratamientos de sumersión en el día 0 y el día 5. Las flechas blancas indican los momentos de cosecha para los tres tratamientos: el día de la sumersión (día 10) y al final del experimento (día 28) para analizar la recuperación. La barra púrpura con rayas en el tratamiento de sumersión corta de 5 días indica que las plantas no se sumergieron hasta el día 5. Se realizó una cosecha adicional en el día 5 para obtener los valores iniciales (control) para ese tratamiento. Luego, se aplicó el tratamiento de 5 días hasta el día 10, cuando se llevaron a cabo las cosechas para todos los tratamientos. Este protocolo permitió la desumersión de las plantas en el mismo día, asegurando la recuperación bajo las mismas condiciones ambientales.



Tabla S2.1. Valores medios de biomasa seca (en negrita, en g por planta) y sus errores estándar para los compartimentos de hojas, tallos/estolones, coronas y raíces para (a) desumersión y (b) recuperación de especies de *Lotus* y *Trifolium*, separados en los 3 tratamientos: control, sumersión corta de 5 días y sumersión larga de 10 días.

| a) Desumersión | | | | | | |
|----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--|--|
| | | Control (C) | | | | |
| Esp./Compartimientos | Hojas | Tallos/Estolones | Coronas | Raíces | | |
| Lotus tenuis | 0,513 0,039 | 0,530 0,037 | 0,039 0,003 | 0,326 0,025 | | |
| Lotus corniculatus | 0,646 0,065 | 0,336 0 ,023 | 0,038 0,003 | 0,330 0,030 | | |
| Lotus japonicus | 0,532 0,034 | 0,471 0,021 | 0,026 0,002 | 0,207 0,012 | | |
| Trifolium repens | 0,539 0,043 | 0,751 0,034 | 0,054 0,007 | 0,484 0,041 | | |
| Trifolium fragiferum | 0,539 0,061 | 0,613 0,038 | 0,106 0,017 | 0,432 0,056 | | |
| Trifolium pratense | 0,640 0,061 | 0,682 0,026 | 0,062 0,007 | 0,652 0,041 | | |
| | Su | umersión corta (5d) | | | | |
| Esp./Compartimientos | Hojas | Tallos/Estolones | Coronas | Raíces | | |
| Lotus tenuis | 0,383 0,033 | 0,462 0,039 | 0,037 0,001 | 0,206 0,017 | | |
| Lotus corniculatus | 0,417 0,073 | 0,429 0,083 | 0,049 0,006 | 0,398 0,051 | | |
| Lotus japonicus | 0,300 0,031 | 0,481 0,056 | 0,025 0,002 | 0,267 0,068 | | |
| Trifolium repens | 0,285 0,037 | 0,440 0,035 | 0,036 0,006 | 0,318 0,035 | | |
| Trifolium fragiferum | 0,288 0,030 | 0,479 0,033 | 0,077 0,007 | 0,302 0,031 | | |
| Trifolium pratense | 0,293 0,025 | 0,510 0,013 | 0,052 0,004 | 0,429 0,035 | | |
| <u> </u> | Su | mersión larga (10d) | | • | | |
| Esp./Compartimientos | Hojas | Tallos/Estolones | Coronas | Raíces | | |
| Lotus tenuis | 0,257 0,039 | 0,489 0,032 | 0,030 0,003 | 0,191 0,013 | | |
| Lotus corniculatus | 0,219 0,017 | 0,344 0,017 | 0,041 0,003 | 0,198 0,014 | | |
| Lotus japonicus | 0,169 0,021 | 0,410 0,023 | 0,022 0,002 | 0,116 0,014 | | |
| Trifolium repens | 0,199 0,030 | 0,344 0,028 | 0,036 0,003 | 0,296 0,026 | | |
| Trifolium fragiferum | 0,180 0,046 | 0,366 0,025 | 0,045 0,004 | 0,240 0,027 | | |
| Trifolium pratense | 0,214 0,038 | 0,341 0,052 | 0,039 0,005 | 0,343 0,041 | | |
| b) Recuperación | | | | | | |
| | | Control (C) | | | | |
| Esp./Compartimientos | Hojas | Tallos/Estolones | Coronas | Raíces | | |
| Lotus tenuis | 0,675 0,063 | 0,973 0,112 | 0,079 0,017 | 0,470 0,057 | | |
| Lotus corniculatus | 0,451 0,074 | 0,686 0,104 | 0,083 0,009 | 0,443 0,055 | | |
| Lotus japonicus | 0,235 0,050 | 0,555 0,046 | 0,044 0,006 | 0,369 0,029 | | |
| Trifolium repens | 0,340 0,064 | 0,739 0,045 | 0,093 0,011 | 0,831 0,079 | | |
| Trifolium fragiferum | 0,333 0,078 | 0,908 0,092 | 0,138 0,021 | 0,569 0,081 | | |
| Trifolium pratense | 0,577 0,139 | 0,634 0,075 | 0,105 0,009 | 0,517 0,067 | | |
| | Sı | umersión corta (5d) | • | • | | |
| Esp./Compartimientos | Hojas | Tallos/Estolones | Coronas | Raíces | | |
| Lotus tenuis | 0,412 0,086 | 0,884 0,090 | 0,046 0,005 | 0,360 0,048 | | |
| Lotus corniculatus | 0,123 0,025 | 0,388 0,060 | 0,050 0,005 | 0,219 0,043 | | |
| Lotus japonicus | 0,229 0,026 | 0,635 0,090 | 0,051 0,005 | 0,190 0,025 | | |
| Trifolium repens | 0,129 0,021 | 0,545 0,049 | 0,052 0,007 | 0,280 0,074 | | |
| Trifolium fragiferum | 0,120 0,031 | 0,439 0,064 | 0,064 0,012 | 0,167 0,033 | | |
| Trifolium pratense | 0,085 0,021 | 0,100 0,013 | 0,053 0,005 | 0,168 0,037 | | |
| | Su | mersión larga (10d) | | | | |
| Esp./Compartimientos | Hojas | Tallos/Estolones | Coronas | Raíces | | |
| Lotus tenuis | 0,202 0,059 | 0,619 0,091 | 0,048 0,007 | 0,299 0,041 | | |
| Lotus corniculatus | 0,179 0,033 | 0,466 0,050 | 0,039 0,005 | 0,220 0,046 | | |
| Lotus japonicus | 0,149 0,038 | 0,325 0,084 | 0,040 0,004 | 0,066 0,016 | | |

| Trifolium repens | 0,067 0,012 | 0,244 0,022 | 0,032 0,005 | 0,149 0,053 |
|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Trifolium fragiferum | 0,149 0,038 | 0,325 0,084 | 0,040 0,004 | 0,066 0,016 |
| Trifolium pratense | 0,078 0,025 | 0,151 0,041 | 0,040 0,009 | 0,096 0,046 |

CAPITULO III

Figura. S3.1. Gráfico de Análisis de Componentes Principales (ACP) que mostraron la distribución de variables de crecimiento y accesiones de *Lotus tenuis* y *L. corniculatus* bajo condiciones de control durante el período de estrés (a) y el período de recuperación (b). Los gráficos fueron generados utilizando 9 variables y 10 accesiones. Las variables analizadas incluyeron la tasa de crecimiento relativo (TCR) de la biomasa total (BT), hojas (Hojas), tallos (Tallos) y raíces (Raíces), así como la variación en el número de tallos durante el período (Δ N tallos), el número de tallos por planta (N Tallos), la relación vástago/raíz (V/R), la relación hoja:tallo (Hoja/Tallo) y la altura de la planta (H). Las accesiones de *Lotus tenuis* están indicadas por triángulos violetas: Aguape (A), Larrañaga (L), Chaja (C), Pampa INTA (P) y Esmeralda (E). Las accesiones de *L. corniculatus* están representadas por círculos verdes: San Gabriel (SG), Nilo (N), Inia Draco (IN), Kontac (K) y Toro (T). El porcentaje de variabilidad explicada se indica en cada eje del gráfico.



Figura S3.2. Altura de las plantas de las accesiones de *Lotus tenuis* y *L. corniculatus* al final de los períodos de estrés (a, b) y al completarse los períodos de recuperación (c, d) bajo condiciones de control (C), sumersión parcial (SP) y sumersión completa (SC). Las letras indican las siglas de las accesiones para *L. tenuis* representadas por barras violetas en los paneles izquierdos: Aguape (A), Pampa INTA (P), Larrañaga (L), Chaja (C) y Esmeralda (E). Para *L. corniculatus*, las accesiones están representadas por barras verdes en los paneles derechos: Toro (T), San Gabriel (SG), Kontac (K), Inia Draco (IN) y Nilo (N).



Figura S3.3. La tasa de crecimiento relativo (TCR) de plantas enteras de accesiones de *Lotus tenuis* (paneles izquierdos) y *L. corniculatus* (paneles derechos) durante el período de recuperación después de 11 días de sumersión parcial se mostraron en función de la fracción de biomasa de hojas (a, b), la fracción de biomasa de tallos (c, d), la fracción de biomasa de raices (e, f) y la relación vástago/raíz (V/R) (g, h) en la desumersión (es decir, al final del período de estrés). Las letras indican las siglas de las accesiones de *L. tenuis* en triángulos violetas: Aguape (A), Larrañaga (L), Chaja (C), Pampa INTA (P) y Esmeralda (E), mientras que para *L. corniculatus* se indican con círculos verdes: San Gabriel (SG), Nilo (N), Inia Draco (IN), Kontac (K) y Toro (T). Los parámetros de las regresiones se presentan dentro de cada gráfico.



Figura S3.4. Tasa de crecimiento relativo (TCR) de plantas enteras de accesiones de *Lotus tenuis* y *L. corniculatus* durante o recuperándose de la sumersión completa (SC) y sumersión parcial (SP), graficada en función de la TCR de las mismas accesiones de plantas de control (C) durante el período de estrés (a-d) o el período de recuperación (e-h). Las accesiones de *L. tenuis* se denotaron con las siglas A (Aguape), L (Larrañaga), C (Chaja), P (Pampa INTA) y E (Esmeralda) en triángulos violetas, mientras que las accesiones de *L. corniculatus* se representaron por las siglas SG (San Gabriel), N (Nilo), IN (Inia Draco), K (Kontac) y T (Toro) en círculos verdes.



CAPITULO IV

| Genotipo | Inicial | Inicial Después de 1 semana de sumersión | | Después de 1 semana de recuperación | | Después de 2 semanas de recuperación | |
|---------------|-------------------|---------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------|-----------------|
| 1 | Control | Control | Sumersión | Control | Sumersión | Control | Sumersión |
| RIL-6 | 0.45 ± 0.08 | 0.68 ± 0.07 | 0.59±0.05 | 0.83±0.12 | 0.76 ± 0.08 | 1.80 ± 0.11 | 0.94±0.20 |
| RIL-18 | 0.51 ± 0.05 | 0.63 ± 0.04 | 0.28 ± 0.05 | 1.40±0.12 | 0.64±0.17 | 1.60±0.13 | 0.97±0.18 |
| RIL-30 | 0.33 ± 0.06 | 0.57±0.13 | 0.24 ± 0.07 | 0.74 ± 0.23 | $0.60{\pm}0.09$ | 0.91 ± 0.05 | 0.80±0.17 |
| RIL-47 | 0.28 ± 0.05 | 0.66±0.13 | 0.58±0.14 | 1.03 ± 0.20 | $0.70{\pm}0.05$ | 1.22±0.19 | 0.86±0.37 |
| RIL-80 | 0.28 ± 0.02 | 0.52 ± 0.08 | 0.18 ± 0.03 | 0.78±0.33 | 0.38 ± 0.08 | 1.37 ± 0.10 | $0.91{\pm}0.07$ |
| RIL-82 | 0.46 ± 0.09 | 0.76±0.11 | 0.31±0.01 | 1.04 ± 0.32 | 0.61±0.17 | 1.90 ± 0.32 | 0.98±0.15 |
| RIL-85 | 0.41 ± 0.02 | 0.53 ± 0.04 | 0.25 ± 0.03 | 0.77±0.11 | 0.47 ± 0.06 | 0.99±0.15 | $0.69{\pm}0.05$ |
| RIL-176 | 0.22 ± 0.06 | 0.31±0.03 | 0.14 ± 0.02 | 0.84 ± 0.22 | 0.31±0.09 | 2.29±0.45 | 0.84±0.17 |
| RIL-189 | $0.33 {\pm} 0.07$ | 0.45 ± 0.06 | 0.21 ± 0.05 | 0.94 ± 0.22 | $0.50{\pm}0.10$ | 1.75 ± 0.46 | $1.24{\pm}0.17$ |
| RIL-200 | 0.25 ± 0.06 | 0.36 ± 0.06 | 0.13±0.02 | 0.94±0.12 | $0.28{\pm}0.03$ | 1.28 ± 0.11 | 0.66±0.10 |
| Gifu | 0.14 ± 0.02 | 0.30 ± 0.05 | 0.15 ± 0.02 | 0.58 ± 0.04 | 0.23 ± 0.04 | 0.93 ± 0.17 | 0.46 ± 0.08 |
| MG20 | 0.54±0.10 | 0.80±0.15 | 0.45 ± 0.08 | 1.46±0.10 | 0.90±0.33 | 2.39±0.34 | 1.01 ± 0.20 |

Tabla S4.1. Biomasa seca de plantas (g por planta) de 12 genotipos de *Lotus japonicus* (10 líneas endocriadas recombinantes y sus parentales Gifu y MG20), cosechadas a lo largo del experimento. Los valores representan medias \pm errores estándar de 6 a 8 repeticiones.

| | Valores para plantas control | | | | | |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--|--|
| ~ · | CHR (%) | CHR (%) | CHR (%) | CHR (%) | | |
| Genotipo | después de 2 | después de 7 | después de 10 | después de 14 | | |
| | días de | días de | días de | días de | | |
| | recuperacion | recuperacion | recuperacion | recuperacion | | |
| RIL-6 | 89.2±1.4 | 91.4±1.0 | 91.0±1.1 | 90.8±0.9 | | |
| RIL-18 | $90.8{\pm}0.8$ | 90.4±1.1 | 91.8±1.1 | 90.4±0.5 | | |
| RIL-30 | 91.2±1.0 | 91.0±1.1 | 90.4±1.8 | 91.0±1.0 | | |
| RIL-47 | 92.0±1.2 | 91.2±1.0 | 91.0±1.0 | 90.4 ± 0.9 | | |
| RIL-80 | 91.2±0.7 | 91.6±1.0 | 91.4±0.9 | 90.2±0.9 | | |
| RIL-82 | $91.4{\pm}0.9$ | 91.1±1.0 | 91.8±1.1 | 90.8±1.0 | | |
| RIL-85 | 92.4±1.3 | 91.6±0.9 | 91.0±1.0 | 91.8±0.7 | | |
| RIL-176 | 91.2±1.0 | 90.2±1.5 | 91.2±1.1 | 91.8±0.9 | | |
| RIL-189 | 91.2±1.0 | 90.2±1.5 | 91.2±1.1 | 91.8±0.9 | | |
| RIL-200 | 90.4±1.1 | 90.0±0.6 | 90.0±0.7 | 90.6±1.0 | | |
| Gifu | 91.6±1.4 | 92.2±1.0 | 90.2±1.0 | 91.2±0.7 | | |
| MG20 | 91.6±1.4 | 92.0±0.7 | 91.4±0.8 | 91.4±1.3 | | |
| ANOVA para el efecto del genotipo | <i>p</i> : 0.86 | <i>p</i> : 0.91 | <i>p</i> : 0.98 | <i>p</i> : 0.94 | | |

Tabla S4.2. Contenido hídrico relativo foliar (CHR; %) en las hojas superiores completamente expandidas de las plantas control de las líneas endocriadas recombinantes (RILs) de *Lotus japonicus* y los parentales MG20 y Gifu. Los valores representan medias \pm errores estándar de 5 repeticiones.

| | Valores para plantas control | | | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--|
| Genotipo | g _s después de 2 días de recuperación | g _s después de 7 días de recuperación | g _s después de 10 días de recuperación | g _s después de 14 días de recuperación | |
| RIL-6 | 194.2±9.4 | 191.4±14.0 | 198.8±12.5 | 200.4±8.1 | |
| RIL-18 | 189.0±7.9 | 187.8±6.5 | 194.4±13.3 | 200.8±6.9 | |
| RIL-30 | 189.4±5.6 | 199.0±10.3 | 187.2±6.4 | 194.6±10.1 | |
| RIL-47 | 201.2±9.9 | 191.4±5.1 | 196.8±9.7 | 201.0±10.2 | |
| RIL-80 | 197.6±5.5 | 198.0±11.8 | 198.8±12.3 | 202.2±8.4 | |
| RIL-82 | 199.2±13.2 | 197.4±7.3 | 203.2±8.4 | 199.0±8.3 | |
| RIL-85 | 194.0±8.4 | 192.6±8.9 | 196.8±7.4 | 204.8±11.8 | |
| RIL-176 | 197.4±4.8 | 193.2±7.8 | 200.0±13.6 | 208.8±9.2 | |
| RIL-189 | 204.6±9.8 | 199.0±13.0 | 203.2±8.4 | 200.2±9.4 | |
| RIL-200 | 200.8±9.2 | 198.8±11.0 | 193.2±8.5 | 198.2±4.7 | |
| Gifu | 203.2±8.1 | $202.0{\pm}8.0$ | 199.0±13.7 | 193.4±7.7 | |
| MG20 | 199.8±9.8 | 199.0±8.9 | 204.2±12.8 | 205.8±7.0 | |
| ANOVA para el fecto del genotipo | <i>p</i> : 0.82 | <i>p</i> : 0.97 | <i>p</i> : 0.93 | <i>p</i> : 0.96 | |

Tabla S4.3. Conductancia estomática (g_s; mmol m-2 s-1) en las hojas superiores completamente expandidas de las plantas control de las líneas endocriadas recombinantes (RILs) de *Lotus japonicus* y los parentales MG20 y Gifu. Los valores representan medias \pm errores estándar de 5 repeticiones.

| | Valores para plantas control | | | | |
|-----------------------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|--|--|
| Genotipo | Fv/Fm después | Fv/Fm después | Fv/Fm después | | |
| 1 | de 2 días de | de 7 días de | de 11 días de | | |
| | recuperación | recuperación | recuperación | | |
| RIL-6 | $0.810{\pm}0.004$ | $0.808 {\pm} 0.006$ | $0.807 {\pm} 0.004$ | | |
| RIL-18 | $0.810{\pm}0.007$ | $0.808 {\pm} 0.006$ | $0.804{\pm}0.009$ | | |
| RIL-30 | $0.816{\pm}0.006$ | $0.803 {\pm} 0.005$ | $0.814{\pm}0.009$ | | |
| RIL-47 | $0.807 {\pm} 0.006$ | 0.806 ± 0.006 | $0.814{\pm}0.005$ | | |
| RIL-80 | $0.810{\pm}0.009$ | $0.805 {\pm} 0.005$ | $0.811 {\pm} 0.004$ | | |
| RIL-82 | $0.810{\pm}0.009$ | $0.805 {\pm} 0.005$ | $0.810 {\pm} 0.004$ | | |
| RIL-85 | $0.810{\pm}0.004$ | $0.807 {\pm} 0.007$ | $0.813{\pm}0.007$ | | |
| RIL-176 | $0.808{\pm}0.004$ | 0.810 ± 0.005 | $0.808{\pm}0.004$ | | |
| RIL-189 | $0.812{\pm}0.009$ | $0.808 {\pm} 0.008$ | $0.809{\pm}0.004$ | | |
| RIL-200 | $0.808{\pm}0.004$ | $0.810{\pm}0.005$ | $0.808{\pm}0.004$ | | |
| Gifu | $0.807{\pm}0.007$ | 0.806 ± 0.006 | $0.806{\pm}0.010$ | | |
| MG20 | $0.807{\pm}0.006$ | 0.811 ± 0.003 | $0.810{\pm}0.007$ | | |
| ANOVA para el efecto del genotipo | <i>p</i> : 0.93 | <i>p</i> : 0.94 | <i>p</i> : 0.96 | | |

Tabla S4.4. Fluorescencia de la clorofila adaptada a la oscuridad (Fv/Fm) en las hojas superiores completamente expandidas de las plantas control de las líneas endocriadas recombinantes (RILs) de *Lotus japonicus* y los parentales MG20 y Gifu. Los valores representan medias \pm errores estándar de 5 repeticiones.

Tabla S4.5. Verdor (unidades SPAD) de las hojas jóvenes completamente expandidas, tanto basales como apicales, en las plantas control de las líneas endocriadas recombinantes (RILs) de *Lotus japonicus* y sus parentales MG20 y Gifu. Los valores representan medias \pm errores estándar de 5 repeticiones.

| | Valores para plantas control – Hojas basales | | | | | |
|--------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--|--|
| Genotipo | Verdor después de 2 días de recuperación | Verdor después de 7 días de recuperación | Verdor después de 10 días de recuperación | Verdor después de 14 días de recuperación | | |
| RIL-6 | 33.6±1.3 | 35.4±1.4 | 35.8±1.7 | 34.2±1.5 | | |
| RIL-18 | 35.6±2.1 | 36.4±2.2 | 35.2±2.0 | 34.2±1.5 | | |
| RIL-30 | 35.2±2.7 | 37.0±1.6 | 35.8±2.2 | 36.4±2.1 | | |
| RIL-47 | 35.2±2.9 | 36.4±2.1 | 36.8±2.0 | 34.8±2.2 | | |
| RIL-80 | 34.8±2.4 | 36.2±2.2 | 36.2±1.5 | $36.0{\pm}1.4$ | | |
| RIL-82 | 35.2±1.8 | 35.6±2.7 | 36.0±2.2 | 35.2±2.0 | | |
| RIL-85 | 34.2±2.7 | 35.0±2.4 | 35.8±2.3 | $36.4{\pm}1.8$ | | |
| RIL-176 | 35.0±1.6 | 35.2±2.4 | 34.8±2.1 | 35.2±2.3 | | |
| RIL-189 | 35.0±2.1 | 34.8±2.4 | 36.6±1.7 | 36.2±1.8 | | |
| RIL-200 | 35.2±2.1 | 37.4±2.1 | 37.6±1.3 | 35.2±2.1 | | |
| Gifu | 36.6±2.0 | 35.6±2.0 | 35.0±2.4 | 36.4±2.4 | | |
| MG20 | 35.6±1.7 | 35.4±2.0 | 37.6±1.4 | 36.0±2.4 | | |
| ANOVA para el efecto del genotipo | <i>p</i> : 0.89 | <i>p</i> : 0.90 | <i>p</i> : 0.88 | <i>p</i> : 0.87 | | |

| | Valores para plantas control – Hojas apicales | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--|
| | Verdor después | Verdor después | Verdor después | Verdor después | |
| Genotipo | de 2 días de | de 7 días de | de 10 días de | de 14 días de | |
| | recuperación | recuperación | recuperación | recuperación | |
| RIL-6 | 43.2±0.6 | 43.0±1.0 | 42.0±1.3 | 42.6±1.1 | |
| RIL-18 | 41.8 ± 0.9 | 41.6±0.8 | 41.0±0.7 | 41.8±1.0 | |
| RIL-30 | $42.0{\pm}1.0$ | 41.8 ± 1.4 | 41.6±1.2 | 41.8 ± 1.2 | |
| RIL-47 | 42.0±1.0 | 41.8±1.2 | 42.6±1.0 | 41.4±1.4 | |
| RIL-80 | 41.6±1.2 | 42.0±0.7 | 42.0±0.9 | 42.0±1.1 | |
| RIL-82 | 41.6±0.9 | 42.6±0.5 | 42.0±1.0 | 42.6±0.6 | |
| RIL-85 | 43.0±0.3 | 42.2±1.1 | 41.0±0.5 | 42.6±0.9 | |
| RIL-176 | 41.8 ± 1.1 | 42.4±1.0 | 42.2±0.6 | 42.8 ± 0.7 | |
| RIL-189 | 42.0±0.8 | 43.4±0.6 | 42.6±1.1 | 42.2±1.0 | |
| RIL-200 | 41.6±0.8 | 42.0±1.2 | 42.4 ± 0.9 | 42.0±1.2 | |
| Gifu | 42.4±1.1 | 43.0±1.0 | 42.0±0.9 | 42.8±1.0 | |
| MG20 | 41.6±0.9 | 43.0±1.0 | 43.0±1.1 | 42.2±1.1 | |
| ANOVA para el efecto del genotipo | <i>p</i> : 0.88 | <i>p</i> : 0.89 | <i>p</i> : 0.87 | <i>p</i> : 0.91 | |