



Universidad Nacional del Nordeste



Facultad de Ciencias Agrarias

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
MODALIDAD DE TESINA

Estudios preliminares sobre los efectos de altas temperaturas en la respuesta de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) sometidas a estrés por inundación

Alumno: Sánchez, Carlos Leonardo Rubén

Asesor: Lic. (Dr.) Mignolli, Francesco

Lugar de trabajo: Cátedra de Fisiología Vegetal, Departamento de Básicas Agronómicas, FCA-UNNE.

Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una especie originaria de América del Sur, más precisamente de la región Andina comprendida entre el sur de Colombia y el norte de Chile. Aunque hasta hoy en día existen aspectos poco claros respecto a su origen y domesticación, se cree que fue llevado a Centroamérica donde se domesticó y ha sido parte de la dieta básica en esa región por siglos. Aparentemente, el tomate ya se encontraba integrado a la cultura azteca al momento de la llegada de los españoles (Bergougnoux, 2014). En Europa no existen registros de la especie para períodos anteriores a la llegada de los colonizadores a América, existiendo al respecto fuertes indicios de que su distribución mundial tuvo origen a partir de las primeras expediciones de colonización. Los primeros usos del tomate en Europa fueron con fines ornamentales debido a sus flores amarillas y frutos también amarillos o rojos. España e Italia fueron los primeros países del viejo mundo en incorporarlo como hortaliza, aunque durante muchos años se lo consideró como no apto para el consumo ya que muchas Solanáceas nativas europeas contienen glicoalcaloides tóxicos (Bergougnoux, 2014). Los portugueses fueron quienes consolidaron su comercio en el sur de la India en el siglo XVI, pero su cultivo en escala comercial parece iniciarse recién a finales del S. XIX (De Pedro, 2019).

La planta, perteneciente a la familia Solanaceae, posee un sistema radical pivotante, con una raíz principal y abundantes ramificaciones secundarias. La mayor concentración de raíces se ubica entre los 0,3 y 0,5 m de profundidad, pudiendo superar hasta 1,5 m de profundidad. El tomate es propenso a la formación de raíces adventicias (RA) en la base del tallo que contribuyen al mejor soporte de la planta, mejorando en algunos casos la absorción de agua y nutrientes (Hoagland 2004), y confiriéndole tolerancia a ciertos tipos de estrés (Vidoz 2010). El tallo es herbáceo. Las hojas compuestas, pinatisectas e irregulares se disponen en forma alterna. Las flores están constituidas en un racimo floral o inflorescencia, cada una de color amarillo, constituyéndose normalmente en un número de 4 a 12 flores. Las mismas son perfectas o hermafroditas y comúnmente se autofecundan. Desde que la polinización ocurre, transcurre un período de entre 6 y 10 semanas hasta la maduración del fruto.

El tomate es una planta propia de climas cálidos (Tabla1). La semilla no presenta dormición, pero tratamientos con fitoreguladores pueden mejorar la uniformidad, velocidad y el porcentaje de germinación.

El cultivo requiere una buena humedad de suelo, la cual nunca debe ser menor al 20% de la capacidad de campo. Su temperatura base es de 6°C (Tb) pero por debajo de los 10°C ya se ve fuertemente afectado el crecimiento vegetativo. En la etapa reproductiva, temperaturas superiores a 35°C pueden provocar la esterilidad del polen (Figura 1). El nivel de humedad debe ser superior al 50% e inferior al 85% para que la polinización pueda producirse. Es un cultivo indiferente al fotoperiodo, pero requiere al menos 6 horas diarias de luz directa para florecer. El fotoperiodo no es un factor crítico como sí lo es la intensidad de radiación.

	Temperatura diurna (°C)	Temperatura nocturna (°C)
Germinación	18-20	-----
Crecimiento	18-25	15
Floración	22-25	13-17
Fructificación	25	18

Tabla 1: Temperaturas óptimas diurna y nocturna del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en sus diferentes estados (Curso: CULTIVO Y MANEJO DE TOMATE, UNLP).

El clima de la Tierra ha cambiado a lo largo de la historia. Sólo en los últimos 800.000 años, ha habido ocho ciclos de edades de hielo y períodos más cálidos, y el final de la última edad de hielo, hace unos 11.700 años, marcó el comienzo de la era climática moderna y de la civilización humana (<https://climate.nasa.gov/evidence/>). El calentamiento global lleva, entre otras cosas, a un aumento de la frecuencia e intensidad de las precipitaciones a menudo torrenciales que, concomitantemente con el fenómeno de deshielo, son las principales causas de las inundaciones (Kundzewicz et al., 2007). La inundación del suelo es un problema importante para la sobrevivencia de las plantas en muchas partes del mundo, y representa uno de los estreses abióticos más comunes que afectan negativamente el crecimiento de las plantas, su productividad, y en muchos casos, conducen a la muerte de estas (Jackson & Colmer, 2005; Voesenek et al., 2006). El exceso de agua, entendido como la inmersión parcial de la planta o sólo del sistema radical (anegamiento), se acompaña de una disminución neta en la difusión de los gases de alrededor de 10^{-4} veces. La limitación del intercambio gaseoso reduce la disponibilidad de oxígeno para el proceso de respiración (Bailey-Serres et al., 2012).

En baja concentración de oxígeno en el suelo, los tejidos que se encuentran anegados, recurren a mecanismos de respiración anaeróbica los cuales son ineficientes desde un punto de vista energético y llevan a una reducción acelerada de las reservas (2 a 4 ATP generados por glucosa en la fermentación versus 36 ATP por glucosa en la fosforilación oxidativa). Sin embargo, una mayor disponibilidad de azúcares no estructurales ha sido asociada a una mayor tolerancia a la inundación y podría favorecer la supervivencia de las raíces en condiciones de anegamiento, ya que dichos compuestos proporcionarían el sustrato para procesos fermentativos en condiciones de hipoxia (Loreti et al., 2018).

Por otra parte, las temperaturas muy altas pueden provocar daños irreversibles en las células o hasta causar el colapso de tejidos en algunos minutos. Sin embargo, con temperaturas moderadamente altas, el daño y/o la muerte celular puede ocurrir solo después de una larga exposición. Las altas temperaturas pueden causar tanto daño directo como indirecto. Entre los daños directos se señalan la desnaturalización y la formación de aglomerados de proteínas, y la pérdida de integridad de membranas. En cambio, los daños indirectos incluyen la inactivación de enzimas del cloroplasto y mitocondria, la inhibición de la síntesis de proteínas y a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Whaid et al., 2007).

Si bien el cambio climático afecta a todo el planeta, su manifestación a nivel local o regional puede ser muy variable y caracterizarse por la participación simultánea de dos o más eventos de estrés. Por ejemplo, en muchas áreas del mundo, las altas temperaturas se han asociado con eventos de sequía extrema o de inundación. La combinación de dos o más eventos climáticos adversos puede, con mucha probabilidad, tener efectos más severos sobre los cultivos ya que podrían sumarse las consecuencias negativas de cada estrés (Rivero et al., 2022). La respuesta adaptativa de las plantas a múltiples estreses puede ser única e impredecible. En algunos cultivares de tomate, por ejemplo, la combinación de sequía y alta temperatura hace que las plantas reaccionen a la falta de agua pese a que sean tolerantes al calor (Zhou et al., 2017). Si bien eventos como olas de calor asociadas a precipitaciones torrenciales son cada vez más usuales en el mundo (Guerreiro et al., 2018; Wang et al., 2019; Zhang and Villarini, 2020; Depietri et al., 2012), la investigación científica sobre los efectos de la combinación de ambos fenómenos en plantas es muy escasa. A partir de trabajos científicos realizados con *Arabidopsis*, sabemos que los estreses por falta de oxígeno (anoxia) y por calor comparten la regulación de varios genes. De hecho, la inducción de proteínas HSP (*Heat*

Shock Proteins) en respuesta a un shock térmico favorece la aclimatación de las plantas si se las somete sucesivamente a estrés por anoxia (Banti et al., 2008; 2010). En un contexto de cambio climático y eventos meteorológicos extremos, el estudio del estrés en plantas debido a la combinación de factores climáticos sub-óptimos (Mittler, R. 2006; Susuki, 2014), cobra particular importancia teniendo un rol preponderante en muchos grupos de investigación en el mundo. Con el presente TFG, se pretende, por lo tanto, el registro y análisis de datos sobre la respuesta de la planta sometidas a la interacción entre altas temperaturas e inundación del suelo, empleando a la planta de tomate como modelo debido a su creciente interés en estudios fisiológicos/moleculares y su gran importancia económica.

Objetivo general

El objetivo es estudiar algunas de las respuestas fisiológicas en plantas de tomate sometidas a condiciones de altas temperaturas y de inundación.

Objetivos específicos

En plantas control e inundadas mantenidas a las temperaturas de 25 y 35 °C durante 6 días, se perseguirán los siguientes objetivos específicos:

- 1) Medir la conductancia estomática y fluorescencia de la clorofila en hojas.
- 2) Cuantificar la tasa respiratoria y determinar la viabilidad de las raíces.
- 3) Analizar el contenido de los principales azúcares no estructurales en raíces.

Hipótesis

- 1) La exposición a temperaturas por encima del óptimo acelera el consumo de azúcares en la raíz, perjudicando la viabilidad de las raíces de plantas inundadas.
- 2) La alta temperatura y la inundación tienen un efecto contrastante en la regulación de la apertura estomática. En presencia de ambas condiciones, la conductancia estomática alcanza niveles intermedios.

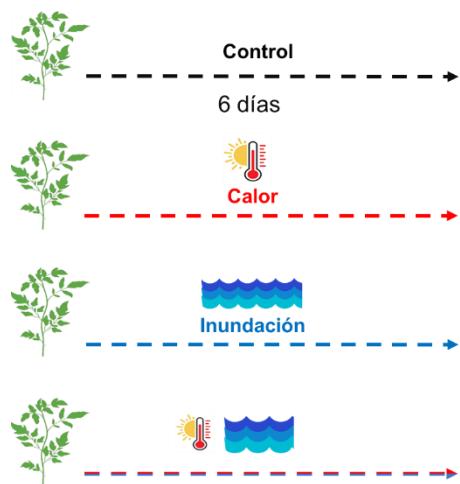
- 3) La exposición a altas temperaturas e inundación tienen efectos aditivos sobre la disminución de la performance fotosintética debido a la reducción de funcionalidad del fotosistema II y I.

Materiales y métodos

Material vegetal y tratamientos

En todos los ensayos se utilizaron plantas de tomate del genotipo Ailsa Craig (AC, accesión LA2838A), el cual fue previamente empleado en ensayos de inundación (Vidoz et al., 2010; 2016). Se realizaron siembras en germinadores a fin de asegurar una germinación homogénea de las plántulas. A la semana de edad, las plántulas fueron trasplantadas en macetas de 300 ml con un sustrato comercial a base de turba (Growmix Multipro pH 5,5-6,5) y mantenidas en 2 fitotrones en igualdad de condiciones con una temperatura media de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 14 h, humedad relativa entre 50-70% e intensidad lumínica de alrededor de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Se emplearon luminarias a Leds full espectro (Figura 2).

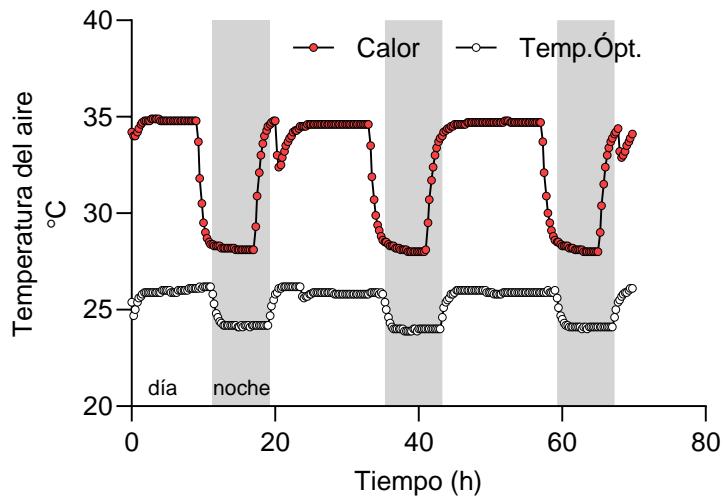
Luego de 4 semanas desde la siembra, y cuando las plantas alcanzaron las cinco hojas verdaderas, fueron sometidas a los siguientes tratamientos:



- CO = Control, temperatura Óptima
- CC = Control, Calor
- IO = Inundación, temperatura Óptima
- IC = Inundación, Calor

Para ello realizamos un recambio de plantas al azar entre fitotrones, para compensar cualquier tipo de variabilidad eventual entre los mismos. Un fitotrópico fue regulado a una temperatura promedio de 25 °C (25,9 día y 24,1 °C noche) y el otro grupo en un fitotrópico igual, pero con una temperatura promedio de 32,3 °C (28,3 día y 28,3 °C noche).

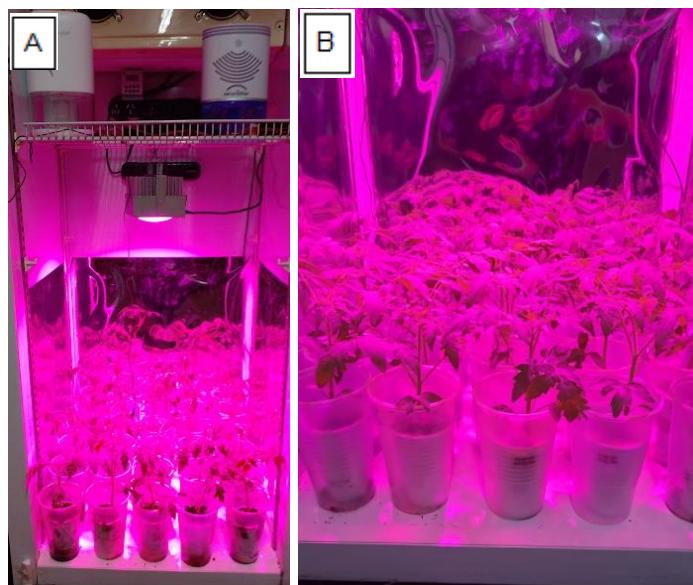
Figura 1: Variaciones de la temperatura de los fitotrones (°C) en el cual un tratamiento se encuentra con una temperatura óptima (25°C) y el restante sometido a una temperatura elevada al cual lo denominamos calor (35°C). Las franjas grises corresponden a los períodos sin luz artificial (noche).



En cada grupo de plantas, la mitad fue mantenida en condiciones de riego normal hasta capacidad de campo, mientras que la otra mitad fue sometida a inundación parcial. La inundación se realizó sumergiendo individualmente cada maceta en contenedores de un litro y llenándolos con agua de red hasta alcanzar el nudo cotiledonar. Al inicio del tratamiento y luego de 1, 3 y 6 días, se realizaron los muestreos y mediciones.

Todas las mediciones y análisis fueron realizados en plantas en condiciones control (riego normal) e inundadas (encharcamiento o *waterlogging*) mantenidas a temperatura de 25°C y de 35°C.

Figura 2: A: Fotografía de un fitotrón mostrando elementos que lo constituyen; B: Fotografías de plantas de tomate dentro del fitotrón.



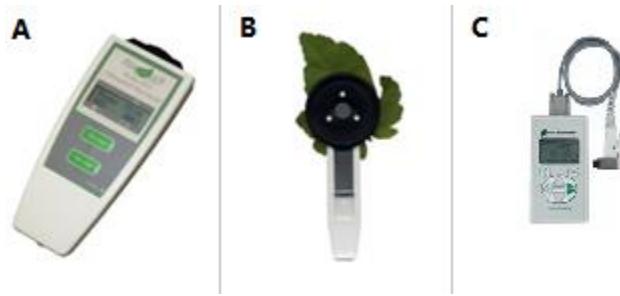
Biomasa y partición de asimilados

Con el fin de determinar el impacto de la combinación de estreses sobre el crecimiento de las plantas de tomate, individuos de los 4 tratamientos fueron empleados para la medición de biomasa de hojas, tallos y raíces (originales y adventicias). El muestreo se realizó al inicio del tratamiento luego de 6 días. Además, se consideró el área foliar medida con el método descripto por Vidoz et al. (2016). Cada hoja fue extendida en un plano horizontal y se le sacó una foto. Posteriormente, cada imagen fue procesada con el software ImageJ® para obtener el valor del área. Estos datos fueron utilizados para obtener parámetros de crecimiento como la Tasa de Crecimiento Relativa (RGR, Relative Growth Rate)(Figura 8, D).

Conductancia estomática y fluorescencia de la clorofila

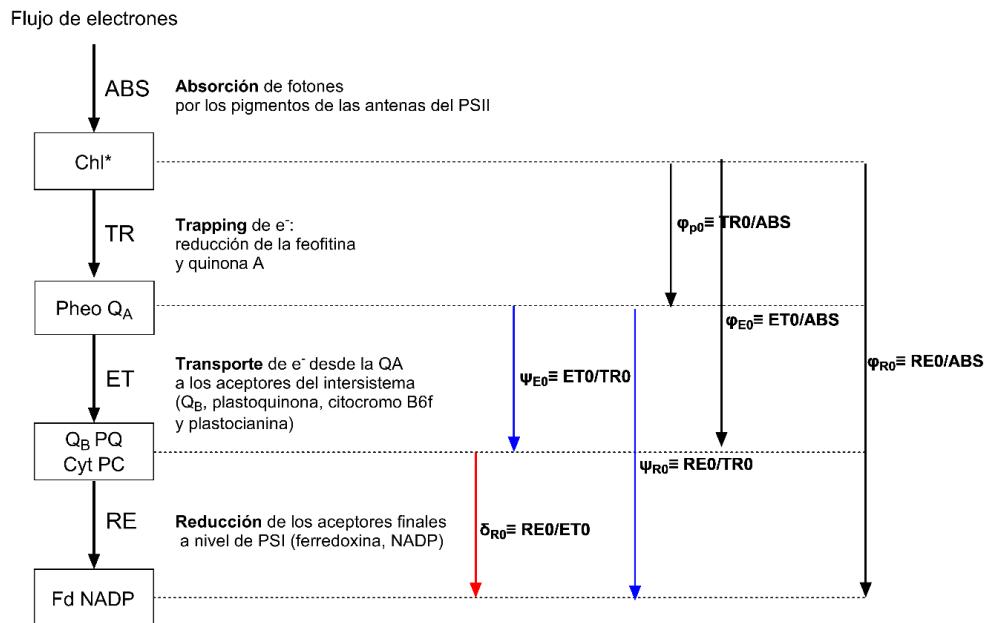
La Conductancia estomática (g_s) expresada como mmol de H_2O $seg^{-1} m^{-2}$, fue realizada con un porómetro portátil (Meter Group SC-1). Con respecto a las mediciones de los parámetros de fluorescencia de la clorofila (JIP-test), se efectuaron empleando un fluorómetro portátil (Figura 3) (Hansatech, PocketPea). Luego de una aclimatación de las hojas a la oscuridad durante 20 minutos aplicando el apósito clip.

Figura 3: A: Imagen de un fluorómetro portátil (Hansatech, PocketPea); B: Leafclips correspondiente al fluorómetro exemplificando su utilización en una hoja; C: Imagen de un porómetro portátil (Meter Group SC-1).



Las mediciones tanto con el porómetro como con el fluorómetro se llevaron a cabo en hojas de la misma edad (3ra hoja verdadera). De cada hoja se tomaron datos de dos folíolos opuestos promediando el valor. Debido a limitaciones de espacio en los fitotrones, el número de réplicas biológicas de cada tratamiento a cada temperatura no superó los 5 individuos.

Figura 4: Esquema simplificado de los componentes de la cadena de transportes de electrones desde el PSII hasta los receptores finales del PSI.



Eficiencias cuánticas (relaciones de flujo)

Producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria	Φ_{p0}	$= TR0/ABS = (Fm-Fo)/Fm = 1-(Fo/Fm) = Fv/Fm$
Producto cuántico máximo de disminución de excitación fotoquímica	Φ_{D0}	$= DI0/ABS = 1- \Phi_{p0} = Fo/Fm$
Probabilidad con la que un excitón atrapado puede mover un electrón después de Q_A^-	Ψ_0	$= ET0/TR0 = 1-Vj$
Probabilidad de un fotón absorbido mover un electrón después de Q_A^-	Φ_{E0}	$= \Phi_{p0} - \Psi_0 = (TR0/ABS)/(ET0/TR0) = ET0/ABS = (1-Fo/Fm)(1-Vj)$

Índices de vitalidad

Índice de potencial fotosintético	PIabs	$= [RC/ABS][\Phi_{p0}/(1- \Phi_{p0})] [\Psi_0/(1- \Psi_0)]$
Fuerza motriz de la fotosíntesis	DFabs	$= \log [PIabs]$

Tabla 2: Eficiencia cuántica usando los datos de la fase rápida de emisión de fluorescencia (González Moreno 2008).

Consumo de O₂ y viabilidad de las raíces

El consumo de O₂ en las raíces se midió según el método publicado por Mignolli et al. (2021). En síntesis, muestras frescas de raíces de plantas control e inundadas se colocaron en viales herméticos de 3 ml provistos de tapa con septo en goma. Luego de haber medido la concentración inicial de O₂ por medio del sensor a fibra óptica (FirestingO₂, Pyroscience GmbH) y después de una incubación de 2 horas a 30°C en oscuridad, se medió nuevamente la concentración de O₂ en los viales. A partir de la diferencia entre la concentración inicial y final de O₂, conociendo el peso fresco de las muestras y el volumen del espacio de cabeza de los viales, se calculó el volumen en ml de O₂ consumidos por gramo de peso por hora según la fórmula publicada en el trabajo de Mignolli et al. (2021).

Con respecto a la estimación de la viabilidad de la raíz, se adoptó el método histoquímico por medio de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difenil tetrazolio) (Majumdar 2017). Al ingresar libremente en las células vegetal, el MTT es reducido por oxidorreductasas mitocondriales, generando un compuesto insoluble en agua de color púrpura indicando la presencia de células metabólicamente activas y viables. Al tercer día de iniciado el tratamiento de inundación/alta temperatura y el correspondiente control, se cortaron segmentos de raíz de aproximadamente 3 cm de longitud a partir del ápice. Los mismos se colocaron inmediatamente en una solución pH 7 (buffer Na-fosfato 50mM) conteniendo MTT 10mM. Los segmentos de raíz se incubaron durante 1h en oscuridad a 37 °C para que se desarrollara la tinción. Sucesivamente, se enjuagaron las raíces y se sacaron fotos bajo lupa.

Análisis de azúcares solubles y almidón

Para la determinación de los azúcares, se molieron 100 mg muestras de raíz congeladas con 1ml de ácido perclórico al 5,5%. Los extractos fueron centrifugados a 12000 g por 10 min a temperatura ambiente y luego se recuperó el sobrenadante en tubos eppendorf. El pellet fue nuevamente congelado ya que se utilizó para la extracción y análisis del almidón. Los extractos fueron neutralizados agregando en cada tubo 200 µl de carbonato de potasio 3,5M. Se incubaron los tubos a 4 °C durante 30 minutos antes de centrifugarlos como lo descripto anteriormente. Finalmente, se recuperó el sobrenadante y se lo congeló hasta su análisis.

Para la cuantificación de los azúcares solubles se empleó el método colorimétrico del fenol/sulfúrico (Buyssse y Merckx 1993). Se tomaron 500 μ l de extractos neutralizados de las raíces, previa dilución 1:5, y se colocaron en tubos de ensayo de vidrio. Luego se agregaron 500 μ l de una solución de fenol al 28% en etanol 70% y se agregaron, a cada tubo, 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado mezclando vigorosamente. Finalmente, se leyó la absorbancia a 490nm en espectrofotómetro. Para la cuantificación, se realizó una curva de calibración con glucosa pura.

Para la determinación del almidón, el pellet que quedó de la extracción de los azúcares fue sometido a dos ciclos de lavados con etanol 80% a 80°C por 15 min. Al finalizar, se descartó el sobrenadante y el pellet se secó a 50 °C hasta evaporar el residuo de etanol. Luego se agregaron 700 μ l de NaOH 0,1 M y los tubos fueron incubados a 100 °C durante 1h. Luego de centrifugar a 12000 g por 5min a temperatura ambiente, se recuperaron 500 μ l de extracto y se neutralizaron con 50 μ l de HCl 1N. Finalmente, se agregaron 150 μ l de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* en la concentración de 0,1 Unidades ml^{-1} . Los tubos se incubaron overnight a 40 °C. La determinación de la glucosa liberada por hidrólisis del almidón fue llevada a cabo según el método del fenol/sulfúrico descripto anteriormente.

Análisis estadístico

El número de réplicas con que se trabajó dependió de la complejidad del análisis a realizar. Para las mediciones de conductancia estomática y fluorescencia (análisis no destructivos) se midió en 8 plantas por cada tratamiento y por cada régimen de temperatura. Con respecto a los estudios bioquímicos, se realizaron mediciones sobre un número de 4 muestras provenientes de diferentes plantas de cada tratamiento. Con respecto al tipo de análisis estadístico, se procedió al análisis de la Varianza Paramétrica (ANOVA a una vía) y a un post test de Tukey.

Lugar de trabajo

El trabajo se realizó en el laboratorio de la Cátedra de Fisiología Vegetal (Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE), el cual cuenta con equipamientos e infraestructura necesarios para

realizar los estudios fisiológicos y bioquímicos correspondientes a este trabajo de investigación.

Resultados y discusión

La exposición a temperaturas superiores al óptimo durante 6 días produjo cambios en la morfología de las plantas tanto en condición de control como de inundación (Figura 6). Entre ellos, la hiponastia (movimiento nástico caracterizado por la curvatura hacia arriba de hojas), fue lo más notorio (Figura 6, fuertemente evidenciado en el tratamiento Control a 35°C) (Quint et al., 2016; Casal y Balasubramanian, 2019; Jayawardena et al., 2019; Vu et al., 2019). En contraposición, se pudo observar que las hojas de las plantas inundadas mantenían una inclinación hacia abajo (epinastia) como resultado de una mayor expansión en las células adaxiales de la lámina y pecíolo (Jackson, 2002; Geldhof et al., 2023). Ambos movimientos násticos de las hojas podrían ser una respuesta de las plantas para limitar la incidencia de la luz, previniendo el sobrecaleamiento y reduciendo la tasa de transpiración (Bradford y Hsiao, 1982; Jayawardena et al., 2019). Es interesante observar cómo, en condiciones de alta temperatura e inundación, el ángulo de inserción del pecíolo de las hojas basales fue menos agudo que aquel de las plantas no inundadas, sugiriendo una competencia entre respuestas násticas bajo las condiciones de estrés por inundación y calor. Además, en alta temperatura e inundación se notó un marcado marchitamiento de las hojas más jóvenes posiblemente debido a una desregulación en la salida del agua de los tejidos, como resultado de la pérdida de estabilidad de las membranas plasmáticas.

La biomasa varió significativamente en respuesta a la inundación tanto en condiciones de temperatura óptima como de calor. La inundación afectó la biomasa de hojas y raíces (CxI) mientras que el tratamiento de alta temperatura incidió únicamente en el peso seco del tallo (Ópt.xCalor) (Tabla 3). La raíz fue el órgano mayormente perjudicado en inundación ya que sufrió una disminución del 68 y 66% a temperatura óptima y alta, respectivamente (Figura 7). En condiciones de hipoxia del suelo (Figura 11 A), la respiración se redujo notablemente (Figura 11 C; Mignolli et al., 2021) causando la pérdida del sistema radical (Vidoz et al., 2016). Asimismo, la biomasa y el área foliar fueron contundentemente menores en las plantas inundadas tanto en condiciones de temperatura óptima como de alta temperatura. De forma análoga, la tasa relativa de crecimiento (RGR) mostró una neta disminución en hojas y raíces,

indicando una menor partición de fotosintatos hacia estos órganos. Cabe destacar que, en alta temperatura, la materia seca acumulada en el tallo fue casi la mitad de las plantas inundadas a temperatura óptima (Figura 8). Asimismo, la RGR en tallo de plantas inundadas a temperatura alta fue menor sugiriendo que la menor altura de las plantas bajo alta temperatura podría estar asociada con una menor distribución de fotosintatos en el tallo.

La conductancia estomática (g_s) puede considerarse una medida indirecta del grado de apertura estomática de las hojas. Bajo condiciones de estrés, la disminución de la g_s constituye una de las primeras estrategias utilizada por las plantas para disminuir la tasa de transpiración y mantener la turgencia (Agurla, S., 2018) y depende de una compleja interacción de factores externos e internos de la hoja (Flexas et al 2004, Warren et al 2007, Medrano et al 2002; Oliveros M., et al 2009). Existe un rápido cierre de estomas durante la inundación, lo cual es una respuesta típica en plantas no adaptadas a dicho estrés. Esto ha sido visto en especies tropicales (Herrera 2010) y cultivos como soja (Oosterhu 1990), cebada (98. Yordanova 2005) y tomate (Bradford 1983; Horchani 2005; Else 2009; Bhatt 2015). En distintas especies, el estrés por calor induce una mayor apertura estomática reduciendo el sobrecalentamiento de las hojas (Sharma et al., 2014; Urban et al., 2017). Sin embargo, ya a partir del día 3, las plantas sometidas a inundación en alta temperatura tuvieron una marcada disminución del valor de g_s al igual que en condición de temperatura óptima (Figura 5 A). Debido a que en plantas control bajo los dos regímenes de temperatura no se observaron cambios significativos de g_s , es posible que las plantas de tomate respondan de forma distinta o que solo bajo temperaturas extremas se observe una respuesta a nivel estomático (Camejo et al. 2005; Nankishore et al., 2016; Haque et al. 2021).

La luz es un elemento clave de la fotosíntesis. Sin embargo, en condiciones de estrés, la transferencia/transformación de la energía lumínica se ve afectada en la mayoría de los casos, ya que un surplus de energía que no puede almacenarse en enlaces químicos resulta muy peligroso, provocando daño oxidativo (Scartazza 2016). Por lo tanto, el estudio de los parámetros de fluorescencia es una herramienta de suma utilidad para medir el estado y funcionamiento del aparato fotosintético de la planta, y la manera en que los distintos estreses ambientales pueden afectarlo (Maxwell 2000). Los parámetros de fluorescencia de la clorofila

que se analizaron expresan la eficiencia cuántica en distintas etapas del transporte de electrones entre los dos fotosistemas (Figura 4). La relación entre fotones absorbidos por los pigmentos de las antenas y los centros de reacción activos del PSII (ABS/RC; Fig. 5 B) muestra un aumento significativo al día 6 en hojas de plantas inundadas a temperatura óptima con respecto a su control, sugiriendo una disminución del número de centro de reacción activos. En cambio, las plantas inundadas en alta temperatura no mostraron diferencias significativas respecto a su control. TR0/ABS (Figura 5 C) mide la eficiencia cuántica máxima de la reacción fotoquímica primaria. Este parámetro disminuyó al día 6 en condiciones de inundación a temperatura óptima mientras que no varió significativamente en inundación y alta temperatura. Probablemente, la disminución del número de centros de reacción activos en inundación a temperatura óptima redujo la eficiencia de atrapamiento de los electrones por la feofitina y Q_A (reacción fotoquímica primaria). Cabe destacar que en alta temperatura los valores promedio de TR0/ABS, tanto del control como del inundado, fueron por encima de 0,75 indicando fotoinhibición y daños mínimos al PSII (Sattari Vayghan et al., 2020). ET0/TR0 expresa la eficiencia con la que un electrón atrapado se mueve más allá de Q_A hacia los transportadores del intersistema (Q_B , PQ, Cyt y PC) en la cadena de transporte de electrones (fase térmica) (Tabla 2). Este parámetro no varió de manera significativa entre los distintos tratamientos, aunque disminuyó con el pasar del tiempo. De la misma forma, el parámetro ET0/ABS, que indica la eficiencia del transporte electrónico hacia los transportadores del intersistema, solo disminuyó de forma significativa entre 3 y 6 días en plantas inundadas a temperatura óptima y en plantas control en alta temperatura (Figura 5 E). Los cocientes RE0/ET0 y RE0/ABS indican respectivamente la probabilidad de que un electrón se mueva desde los transportadores del intersistema hacia los aceptores finales en el PSI (ferredoxina, NADP) y la eficiencia de la reducción de los aceptores finales del PSI. Para ambos parámetros se observó un aumento significativo luego de 6 días en hojas de plantas mantenidas bajo régimen de alta temperatura sugiriendo que la transferencia de electrones por los transportadores móviles como la plastoquinona (PQ) y la plastocianina (PC) podría estar afectada por la temperatura. Debido a que la PQ se encuentra en la fase lipídica de las membranas tilacoidales, la fluidez de los lípidos de la membrana es un factor crucial que determina la respuesta a la temperatura del transporte de electrones en el sitio de la PQ (Yamasaki 2002). El análisis de la fuerza motriz de la fotosíntesis (*Driving Force*) arrojó valores negativos en todos los

tratamientos, sin embargo, la componente $\log\delta R_0/(1-\delta R_0)$ mostró valores menos negativos en plantas a temperatura alta, sugiriendo una transferencia de electrones al PSI más rápida (Figura 5 H) (Antunović Dunić 2023). Los datos de eficiencias del transporte de electrones a lo largo de la cadena de transporte fotosintética, indican que temperaturas superiores al óptimo favorecerían la transferencia de electrones en entre PSII y PSI. Sin embargo, el cierre de estomas en plantas inundadas podría limitar el acceso de CO_2 y, por ende, la carboxilación. Por lo tanto, un mayor flujo de electrones resultaría perjudicial en condiciones de inundación, ya que un mayor flujo de energía que no estaría siendo utilizada para la reducción del CO_2 causaría la hiperreducción del PSI y la formación de especies reactivas del oxígeno.

La temperatura y la disponibilidad de oxígeno se encuentran entre los principales factores que afectan a la respiración en las células. Por esta razón, nos planteamos la hipótesis que, en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno por la inundación y alta temperatura, el metabolismo respiratorio en la raíz puede estar afectado. Por lo general, el contenido en oxígeno del aire del suelo oscila entre el 10 y el 20 %. Normalmente, una mala aireación se convierte en un grave impedimento para el crecimiento de las plantas cuando la concentración de O_2 cae por debajo de 0,1 L/L (<10%, Weil R.R. and Brady 2017). En el caso del sustrato de las plantas inundadas, los valores rodeaban el 6% ya a partir del primer día de anegamiento (Figura 11 A). Cabe destacar que el nivel de oxígeno se mantuvo similar tanto a temperatura óptima como alta, pese a la diferente temperatura del suelo, 25 y 34 °C, respectivamente (Figura 11 B). Este último dato cobra particular importancia ya que un posible efecto de la temperatura sobre la respiración no dependería de un distinto grado de hipoxia del suelo. Luego del análisis de la tasa respiratoria en raíces, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre plantas control a lo largo de los 6 días del experimento. Sin embargo, en plantas inundadas, se registró una disminución abrupta luego de un solo día de tratamiento en alta temperatura con respecto a temperatura óptima (0,04 vs 0,20 ml O_2 $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ PF). El consumo de O_2 en las raíces a temperatura óptima bajó luego de 3 días de inundación y alcanzó los valores de las raíces en alta temperatura al cabo de 6 días (Figura 11 C).

El dato de consumo de O_2 fue corroborado por medio de un ensayo histoquímico de viabilidad con el compuesto MTT. El MTT pertenece a la categoría de los tetrazolios y se caracteriza por ser una molécula que se reduce a formazan de color azul por acción de deshidrogenasas mitocondriales (Altman, F. P. 1976). Las fotos en la figura 9 muestran segmentos de

raíces teñidas con MTT al día 3. Mientras que en condiciones control a temperatura óptima y alta se observó una intensa coloración azul, en raíces de plantas inundadas habías porciones, en correspondencia del ápice, donde la tinción no se desarrolló. Cabe destacar que, en las raíces de plantas inundadas en alta temperatura, la parte descolorida fue mucho más extensa abarcando todo el segmento de raíz y confirmando que en estas condiciones la actividad respiratoria cesaría casi por completo.

La generación de energía a través de la cadena de transporte mitocondrial y la fosforilación oxidativa se reduce debido a que el O₂ está menos disponible como aceptor terminal de electrones. Por lo tanto, la generación de energía en las células depende casi únicamente de una glucólisis anaeróbica y fermentación con una reducción en la producción de energía del 65 al 97% ((Millar et al., 2011). Según Gibbs and Greenway (2003) existen dos modos de tolerancia a la anoxia: uno con altas tasas de catabolismo de carbohidratos anaeróbicos (efecto Pasteur) para compensar la ineficiencia del rendimiento de ATP por mol de hexosa catabolizada en ausencia de fosforilación oxidativa, y otro basado en una reducción del catabolismo anaeróbico de carbohidratos. El análisis de los azúcares no-estructurales (azúcares solubles y almidón) en raíces de plantas inundadas bajo alta temperatura mostró una drástica disminución al cabo de 3 días, alcanzando valores 17 veces menores que en el control (Figura 10 A). Es interesante observar que la concentración de azúcares solubles a temperatura óptima solo bajó significativamente a los 6 días alcanzando un valor promedio muy similar a aquellos de inundación en alta temperatura (Figura 10). Considerando el bajo consumo de O₂ en las raíces ya en una fase muy temprana de la inundación, es razonable creer que la disminución del metabolismo de los azúcares ocurra por una exacerbación de la vía fermentativa, probablemente con producción de etanol (Safavi-Rizi et al. 2020).

El aumento del contenido de azúcares que se vio al sexto día de inundación en alta temperatura (Figura 10 A) puede ser interpretado en dos maneras: como resultado de la hidrólisis de los componentes de las paredes celulares (celulosa) o como parte de un proceso de muerte programada que, sin embargo, no proporcionaría energía para la supervivencia de las células (Bragina et al., 2003; Souza et al., 2017).

Conclusiones

La combinación de alta temperatura e inundación frena rápidamente la respiración en las raíces y parece acelerar el consumo de azúcares en las raíces probablemente estimulando la vía fermentativa, ya que el consumo de oxígeno por respiración es muy bajo (Figura 10). Esto podría llevar a un agotamiento más rápido de las reservas, provocando una crisis energética en las células con pérdida de viabilidad de éstas, o en alternativa por la acumulación de compuestos tóxicos derivados de la fermentación (ácido láctico y/o etanol). El cese de la funcionalidad radical bajo inundación provocaría una menor absorción de agua que a su vez induciría un cierre de estomas (menor conductancia) (Figura 5 A). Sin embargo, la alta temperatura tendría un efecto positivo en la transferencia de electrones entre fotosistemas posiblemente debido a una mayor fluidez de la membrana tilacoidal, favoreciendo el movimiento de los *carriers* de electrones (PQ, PC) (Figura 5 F). Frente a un mayor flujo de electrones en la cadena de transporte fotosintético, el cierre estomático, obligaría a la disipación de estos por vías alternativas a la fotosíntesis, como por ejemplo fotorrespiración, y reacción de Mehler con generación de especies reactivas del oxígeno con pérdida de eficiencia de carboxilación y ganancia de biomasa.

Figura 5: Gráficos de barras correspondientes a A: conductancia estomática (gs) en función de los días (0,3 y 6); B: Parámetro de fluorescencia (ABS/RC) en función de los días (0,3 y 6); C: Parámetro de fluorescencia (TR0/ABS) en función de los días (0,3 y 6); D: Parámetro de fluorescencia (ET0/TR0) en función de los días (0,3 y 6); E: Parámetro de fluorescencia (ET0/ABS) en función de los días (0,3 y 6); F: Parámetro de fluorescencia (RE0/ET0) en función de los días (0,3 y 6); G: Parámetro de fluorescencia (RE0/ABS) en función de los días (0,3 y 6) y H: Fuerza motriz en función de los días (0,3 y 6)

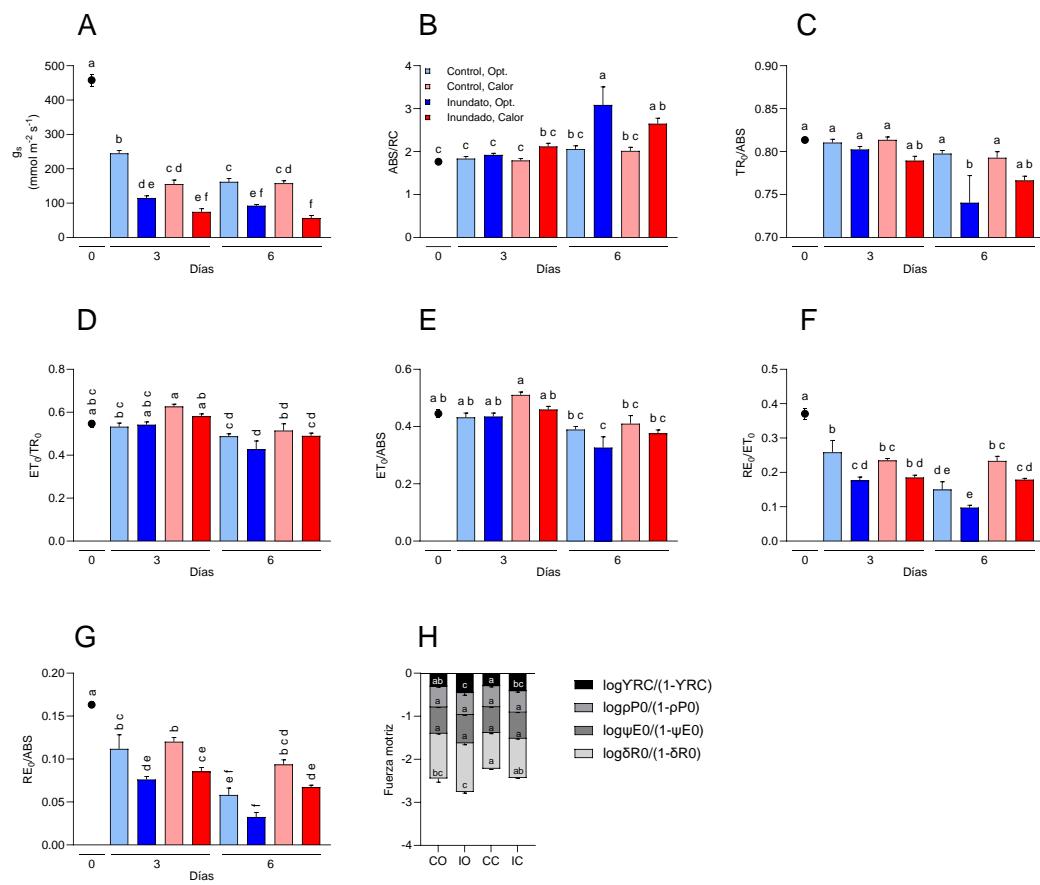


Figura 6: Imágenes de plantas de tomates en los distintos tratamientos al día 3 donde CO: tratamiento control con temperatura óptima; CC: tratamiento control sometido a un tratamiento de alta temperatura (35°C); IO: Tratamiento inundado con óptima temperatura y IC: tratamiento inundado con alta temperatura.

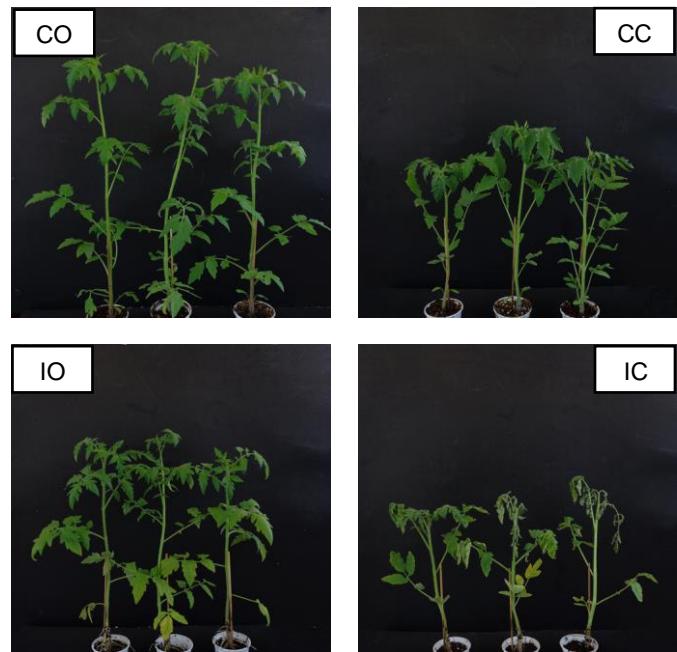
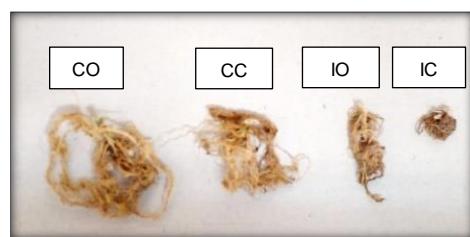


Figura 7: Fotografía de raíces al día 6 en los distintos tratamientos CO: Control 25°C ; CC: Control 35°C ; IO: inundación 25°C y IC: inundación 35°C .



	Peso seco hoja (g)			Peso seco tallo (g)			Peso seco raíz (g)		
	C	I	CxI Valor P	C	I		C	I	
Temp. Óptima	0.784 ±0.03 3 (10)	0.457 ±0.034 1 (10)	<0.000 1 ****	0.469 ±0.02 2 (10)	0.449 ±0.03 4 (10)	0.62 2 ns (10)	0.211 ±0.013 1 (10)	0.068 ±0.00 9 (10)	<0.000 1 ****
Calor	0.726 ±0.02 9 (9)	0.457 ±0.042 (10)	<0.000 1 ****	0.368 ±0.01 0 (10)	0.289 ±0.02 8 (10)	0.01 5 * (10)	0.160 ±0.014 (10)	0.055 ±0.00 6 (10)	<0.000 1 ****
Opt.xCal · Valor P	0.211 ns	0.988 ns		0.0006 ***	0.0018 **		0.015 * ns	0.240 ns	

Tabla 3: Biomasa de hojas, tallo y raíz para los distintos tratamientos donde C: control e I: inundación. Cada uno enfrentado a una temperatura óptima (25°C) y una elevada (35°C, calor)

Figura 8: Grafico de la tasa relativa de crecimiento (RGR) para los distintos tratamientos.

A: tasa relativa de crecimiento global por tratamiento; B: tasa relativa de crecimiento de raíces para los distintos tratamientos; C: tasa relativa de crecimiento del tallo para los distintos tratamientos y D: tasa relativa de crecimiento de hojas para los distintos tratamientos.

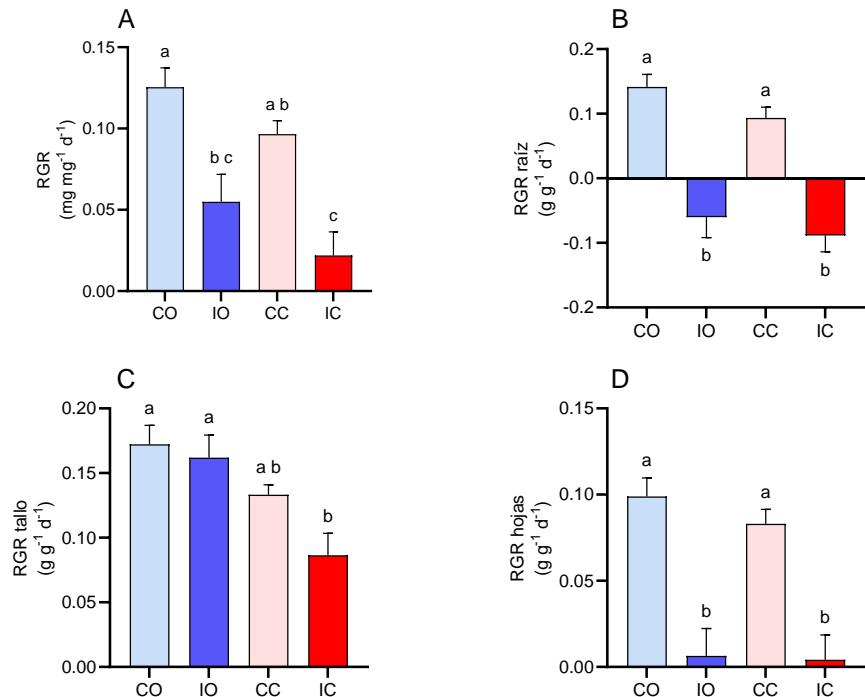


Figura 9: Fotografías de las raíces al día 3, correspondiente a los distintos tratamientos, después de ser tratadas con MTT CO: Control 25°C; IO: inundación 25°C; CC: Control 35°C y IC: inundación 35 °C.

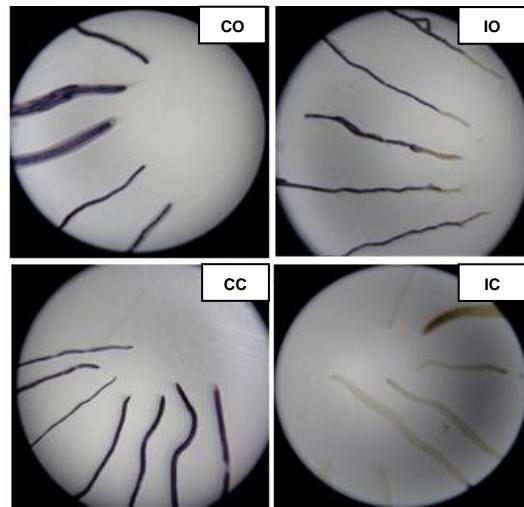


Figura 10: A: Azúcares solubles (mg/g PF) en función de los días (0, 1, 3 y 6) y B: Almidón (mg/g PF) en función de los días (0, 1, 3 y 6).

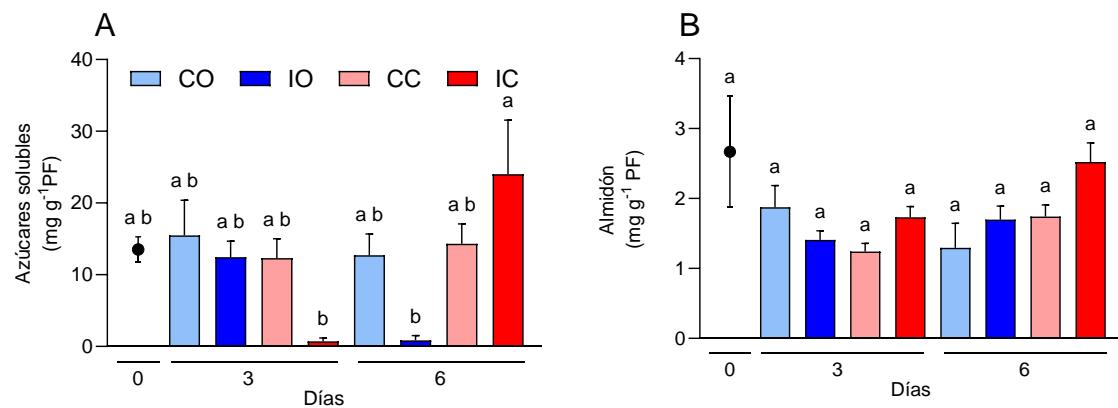
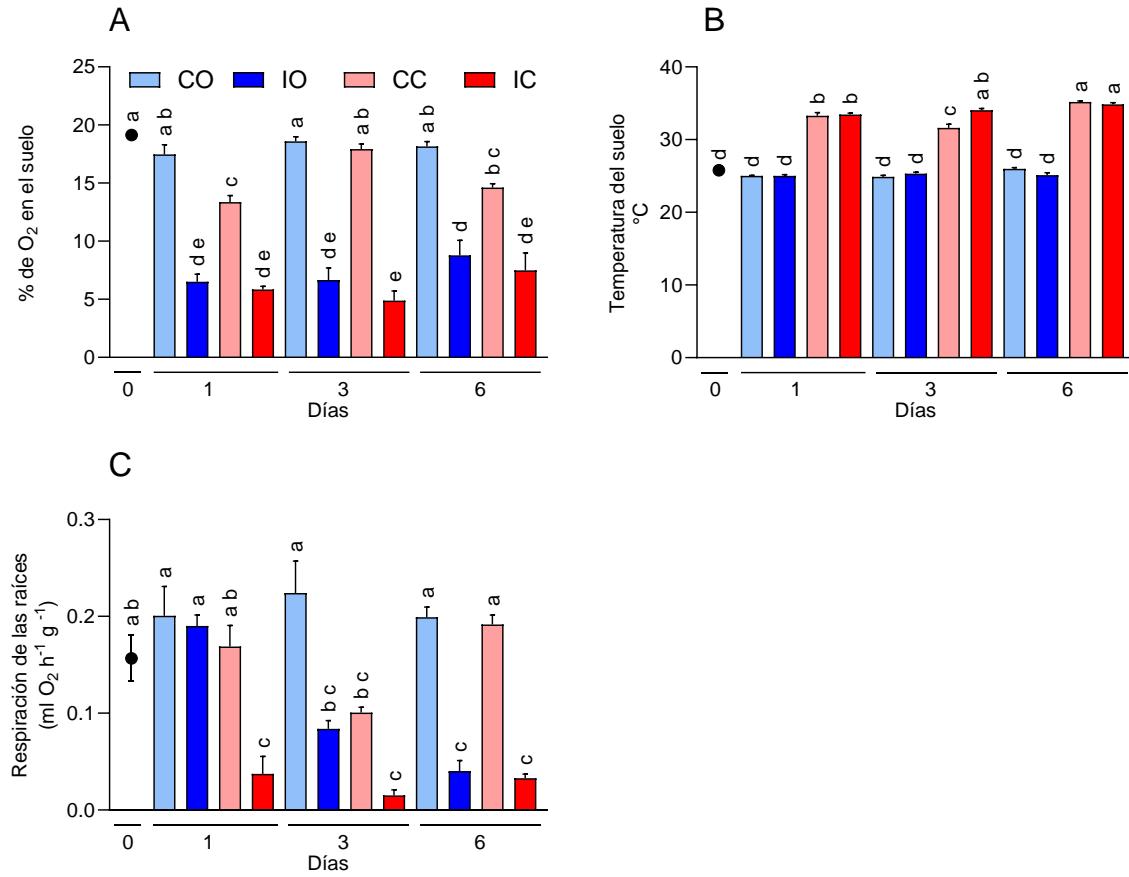


Figura 11: A: Porcentaje de oxígeno en el suelo (sustrato) en función de los días (0, 1, 3 y 6); B: Temperatura del sustrato (°C) en función de los días (0, 1, 3 y 6) y C: Respiración de las raíces (ml O₂/h.g) en función de los días (0, 1, 3 y 6).



Literatura citada:

1. Agurla, S., Gahir, S., Munemasa, S., Murata, Y., Raghavendra, A.S. (2018). Mechanism of Stomatal Closure in Plants Exposed to Drought and Cold Stress. In: Iwaya-Inoue, M., Sakurai, M., Uemura, M. (eds) Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1081. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1244-1_12
2. Altman, F. P. (1976). Tetrazolium salts and formazans. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 9(3), 1–56.).
3. Antunović Dunić, J.; Mlinarić, S.; Pavlović, I.; Lepeduš, H.; Salopek-Sondi, B. Comparative Analysis of Primary Photosynthetic Reactions Assessed by OJIP Kinetics in Three Brassica Crops after Drought and Recovery. *Appl. Sci.* 2023, 13,3078. <https://doi.org/10.3390/app13053078>
4. Bailey-Serres J., Lee S.C. and Briton E. (2012) Waterproofing crops: effective flooding survival strategies. *Plant Physiol.* 160: 1698-1709
5. Banti V., Mafessoni F., Loret E., Alpi A., Perata P., (2010) The Heat-Inducible Transcription Factor HsfA2 Enhances Anoxia Tolerance in Arabidopsis, *Plant Physiology*, 152:1471–1483.
6. Banti, V., Loret, E., Novi, G., Santaniello, A., Alpi, A. And Perata, P. (2008), Heat acclimation and cross-tolerance against anoxia in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, 31: 1029-1037.
7. Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32 (1), 170
8. Bradford, K.J. (1983). Effects of soil flooding on leaf gas exchange of tomato plants. *Plant Physiology*, 73
9. Bragina, T. V., Rodionova, N. A., & Grinieva, G. M. (2003). Ethylene production and activation of hydrolytic enzymes during acclimation of maize seedlings to partial flooding. *Russian Journal of Plant Physiology: A Comprehensive Russian Journal on Modern Phytophysiology*, 50(6), 794–798.
10. BUYSSE, J., & MERCKX, R. (1993). An Improved Colorimetric Method to Quantify Sugar Content of Plant Tissue. *Journal of Experimental Botany*, 44(10), 1627-1629. <https://doi.org/10.1093/jxb/44.10.1627>
11. Camejo et al. 2005; Nankishore et al., 2016; Haque et al. 2021 Depietri, Y., Renaud, F.G. & Kallis, G. Heat waves and floods in urban areas: a policy-oriented review of ecosystem services. *Sustain Sci* 7, 95–107 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11625-011-0142-4>
12. De Pedro (2019) “Efectos disiologicos de la percepcion y sintesis de etileno en la mitigación del estrés por inundación en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)”
13. Else, M.A., Davies, W.J., Malone, M. y Jackson, M.B. (1995). A negative hydraulic message from oxygen-deficient roots of tomato plants?. *Plant Physiology*, 109

14. Geldhof, B., Pattyn, J., & Van de Poel, B. (2023). From a different angle: genetic diversity underlies differentiation of waterlogging-induced epinasty in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1178778.
15. Gibbs, J., & Greenway, H. (2003). Review: Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Functional Plant Biology: FPB*, 30(3), 353.
16. González Moreno, Sergio;Perales Vela, Hugo;Salcedo Alvarez, (2008) Martha O la fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas Revista de Educación Bioquímica, Vol. 27, Núm. 4, diciembre, 2008, pp. 119129
17. Guerreiro, S. B., Dawson, R. J., Kilsby, C., Lewis, E., & Ford, A. (2018). Future heat-waves, droughts and floods in 571 European cities. *Environmental Research Letters*, 13(3), 034009.
18. Guglielminetti L., Perata P. and Alpi A. (1995) Effect of anoxia on carbohydrate metabolism in rice seedlings *Plant Physiol.* 108: 735-741.
19. Haque, M.S.; Husna, M.T.; Uddin, M.N.; Hossain, M.A.; Sarwar, A.K.M.G.; Ali, O.M.; Abdel Latef, A.A.H.; Hossain, A. *Heat Stress at Early Reproductive Stage Differentially Alters Several Physiological and Biochemical Traits of Three Tomato Cultivars*. *Horticulturae* 2021, 7, 330. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100330>
20. Heuvelink, E. (2005). Developmental processes. Heuvelink, E. (Ed.). Tomatoes. Segunda Edición. (pp 53-83). CABI Publishing, Wallingford.
21. Hoagland, D.R. y Arnon, D.I. (1938). The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circulation, 347
22. Jackson M.B. and Colmer T.D. (2005) Response and adaptation by plants to flooding stress. *Ann. Bot.* 96: 501-505.
23. Jayawardena DM, Heckathorn SA, Bista DR, Boldt JK. Elevated carbon dioxide plus chronic warming causes dramatic increases in leaf angle in tomato, which correlates with reduced plant growth. *Plant Cell Environ.* 2019; 42: 1247–1256. <https://doi.org/10.1111/pce.13489>
24. Kundzewicz ZW, Mata LJ, Arnell NW, Doll P, Kabat P, Jimenez B, Miller KA, Oki T, Sen, Z., Shiklomanov IA (2007) Freshwater resources and their management. In: ML Parry, Canziani OF, JP Palutikof, PJ Linden, CE Hanson Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, pp 173–210
25. Loreti, E., Valeri, M. C., Novi, G., & Perata, P. (2018). Gene regulation and survival under hypoxia requires starch availability and metabolism. *Plant Physiology*, 176(2), 1286–1298.
26. Majumdar, S., Guha, T., & Kundu, R. (2017). MTT assay for cytotoxicity assessment in oryza sativa root tissue. *Bio-protocol*, e2620-e2620.
27. Mignolli, F., Barone, J. O., & Vidoz, M. L. (2021). Root submergence enhances respiration and sugar accumulation in the stem of flooded tomato plants. *Plant, Cell & Environment*, 44(11), 3643–3654.
28. Millar, A.H., Whelan, J., Soole, K.L. & Day, D.A. (2011) Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 79–104.

29. Nankishore, A., & Farrell, A. D. (2016). The response of contrasting tomato genotypes to combined heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 202, 75 – 82.; Camejo, D., Rodríguez, P., Morales, M. A., Dell'Amico, J. M., Torrecillas, A., & Alarcón, J. J. (2005). *High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility*. *Journal of Plant Physiology*, 162(3), 281–289.; Haque, M.S.; Husna, M.T.; Uddin, M.N.; Hossain, M.A.; Sarwar, A.K.M.G.; Ali, O.M.; Abdel Latef, A.A.H.; Hossain, A. *Heat Stress at Early Reproductive Stage Differentially Alters Several Physiological and Biochemical Traits of Three Tomato Cultivars* *Horticulturae* 2021, 7, 330. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100330>
30. Oliveros Díaz Mauricio, Caicedo Vera Jaime A. La conductancia estomática (gs), importancia función y factores de influencia. medición de la conductancia estomática (gs) a través del porómetro de difusión estable en diferentes cultivos.
31. Rasmussen, T.S. and Henry, R.J. (1990), Starch determination in horticultural plant material by an enzymic-colorimetric procedure. *J. Sci. Food Agric.*, 52: 159-170.
32. Rivero, R. M., Mittler, R., Blumwald, E., & Zandalinas, S. I. (2022). Developing climate-resilient crops: improving plant tolerance to stress combination. *The Plant Journal*, 109(2), 373-389.
33. Safavi-Rizi, V., Herde, M., & Stöhr, C. (2020). RNA-Seq reveals novel genes and pathways associated with hypoxia duration and tolerance in tomato root. *Scientific Reports*, 10(1), 1692.
34. Sattari Vayghan H, Tavalaei S, Grillon A, Meyer L, Ballabani G, Glauser G, Longoni P. Growth Temperature Influence on Lipids and Photosynthesis in *Lepidium sativum*. *Front Plant Sci.* 2020 Jun 4;11:745. doi: 10.3389/fpls.2020.00745. PMID: 32655589; PMCID: PMC7325982
35. Sharma DK, Andersen SB, Ottosen CO, Rosenqvist E. Wheat cultivars selected for high Fv /Fm under heat stress maintain high photosynthesis, total chlorophyll, stomatal conductance, transpiration and dry matter. *Physiol Plant.* 2015 Feb;153(2):284-98. doi: 10.1111/ppl.12245. Epub 2014 Aug 8. PMID: 24962705.
36. Souza, K. R. D., de Oliveira Santos, M., Andrade, C. A., da Silva, D. M., Campos, N. A., & Alves, J. D. (2017). Aerenchyma formation in the initial development of maize roots under waterlogging. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 29(4), 165–175.
37. Urban J, Ingwers M, McGuire MA, Teskey RO. Stomatal conductance increases with rising temperature. *Plant Signal Behav.* 2017 Aug 3;12(8):e1356534. doi: 10.1080/15592324.2017.1356534. Epub 2017 Aug 8. Erratum for: Addendum to: Urban J, Ingwers MW, McGuire MA, Teskey RO. Increase in leaf temperature opens stomata and decouples net photosynthesis from stomatal conductance in *Pinus taeda* and *Populus deltoides x nigra*. *J Exp Bot.* 2017;68:1757-67. doi:10.1093/jxb/erx052. PMID: 28786730; PMCID: PMC5616154.; Sharma DK, Andersen SB, Ottosen CO, Rosenqvist E. Wheat cultivars selected for high Fv /Fm under heat stress maintain high photosynthesis, total chlorophyll, stomatal conductance, transpiration and dry matter. *Physiol Plant.* 2015 Feb;153(2):284-98. doi: 10.1111/ppl.12245. Epub 2014 Aug 8. PMID: 24962705.).
38. Vidoz M.L., Loret E., Mensuali-Sodi A., Alpi A. and Perata P. (2010) Hormonal interplay during adventitious roots formation in flooded tomato plants. *Plant J.* 63: 551-562.

39. Vidoz M.L., Mignolli F., Aispuru H.T. and Mroginski L.A. (2016) Rapid formation of adventitious roots and partial ethylene sensitivity result in faster adaptation to flooding in the aerial roots (aer) mutant of tomato. *Sci. Hort.* 201: 130-139
40. Voesenek L.A.C.J., Colmer T.D., Pierik R., Millenaar F.F. and Peeters J.M. (2006) How plants cope with complete submergence. *New Phytol.* 170: 213-226.
41. Wahid A., Gelani S., Ashraf M. and Foolad M.R. (2007) Heat tolerance in plants: an overview. *Environ Exp Bot* 61: 199-223.
42. Wang, S.S.-Y., Kim, H., Coumou, D., Yoon, J.-H., Zhao, L. and Gillies, R.R. (2019), Consecutive extreme flooding and heat wave in Japan: Are they becoming a norm? *Atmos Sci Lett*, 20: e933.
43. *Weil R.R. and Brady N.C. (2017) The Nature and Properties of Soils, 15th edition, ISBN 978-0-13-325448-8, by , published by Pearson Education © 2017*
44. Yamasaki T, Yamakawa T, Yamane Y, Koike H, Satoh K, Katoh S. Temperature acclimation of photosynthesis and related changes in photosystem II electron transport in winter wheat. *Plant Physiol.* 2002 Mar;128(3):1087-97. doi: 10.1104/pp.010919. PMID: 11891263; PMCID: PMC152220.
45. Zhang, W., & Villarini, G. (2020). Deadly compound heat stress-flooding hazard across the central United States. *Geophysical Research Letters*, 47, e2020GL089185
46. Zhou R, Yu X, Ottosen C-O, Rosenqvist E, Zhao L, Wang Y et al. Drought stress had a predominant effect over heat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. *B M C Plant Biology*. 2017;17. 24.