



Universidad Nacional del Nordeste



Facultad de Ciencias Agrarias

**TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
MODALIDAD: TESINA**

“Estudio de parámetros fisiológicos durante la recuperación del estrés por inundación en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)”

Alumno: Morinigo, Santiago Joaquín

Directora: Ing. Agr. (Dra.) Vidoz, María Laura

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias.
UNNE.

AÑO 2018

Resumen

La presente tesina tuvo como objetivo general estudiar en forma preliminar la fisiología de las plantas de tomate durante la fase de recuperación de la inundación ya que esta especie, además de su gran importancia agronómica, brinda la posibilidad de extrapolar los resultados obtenidos a otros cultivos hortícolas de interés. Hasta el momento, la mayor parte de los estudios realizados en tomate y otras especies se refieren a las respuestas de la planta durante el período de inundación, ignorando las alteraciones que la planta pueda sufrir una vez que se retira el agua. Por este motivo, los estudios sobre la recuperación de las plantas de tomate a la inundación (un estrés cada vez más frecuente) permitirán, posteriormente, profundizar el análisis sobre la variabilidad existente entre los genotipos de tomate más cultivados y sobre la capacidad de una planta en esas condiciones de responder a otros estímulos bióticos y abióticos.

Antecedentes

Una de las consecuencias más evidentes del cambio climático está dada por el aumento de las precipitaciones a menudo torrenciales que, junto 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 y su productividad y, en muchos casos, conducen a la muerte de las mismas (Jackson & Colmer, 2005; Voesenek et al., 2006).

A medida que aumenta la intensidad de las precipitaciones y de la evaporación debido al calentamiento global, muchas zonas áridas se convierten en lugares aún más áridos, y muchos humedales (zonas principalmente rurales) están sujetos a inundaciones más frecuentes (Voesenek & Sasidharan, 2013). En Argentina, los pronósticos a largo plazo indican que los extremos climáticos serán una constante impredecible y que varias regiones serán afectadas por exceso hídrico en las próximas décadas (INTA informa, <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=27961>; <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=28555>). En particular, la Dirección Nacional de Emergencias y Desastres Agropecuarios declaró emergencia agropecuaria en varios departamentos de la provincia de Corrientes, debido a las intensas lluvias y desborde de ríos hasta el 31/03/2017 (Resolución N°205-2016 del Ministerio de Agroindustria).

El exceso de agua, entendido como la inmersión parcial de la planta (*flooding*) o sólo del sistema radical (*water logging*), 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 y dióxido de carbono para el proceso de la respiración y la fotosíntesis, respectivamente (Bailey - Serres et al., 2012). En efecto, la drástica disminución de la disponibilidad de O₂ en los tejidos sumergidos es uno de los efectos más graves a los que una planta inundada está expuesta. La necesidad de la planta de obtener suficiente oxígeno y CO₂ ha permitido la selección de algunos caracteres que promueven el intercambio de gases en condiciones de inundación. Vartapetian y Jackson (1997) han identificado cuatro tipologías de adaptaciones metabólicas y morfológicas de los vástagos de plantas sujetas a inundación parcial o total, aunque no todas pueden presentarse simultáneamente en la misma especie. La quiescencia es el mecanismo por el cual los tejidos sumergidos pueden tolerar largos períodos de limitación de oxígeno reduciendo el crecimiento y el metabolismo de las reservas. Otra estrategia consiste en el estímulo del

crecimiento favoreciendo la elongación de los entrenudos hasta retomar el contacto con el aire en caso de una completa sumersión de los tejidos (estrategia de escape). En tercer lugar, existe la capacidad de los vástagos de generar un nuevo sistema radical adventicio en la parte basal del tallo que reemplace las raíces en situación de asfixia. Por último, las plantas pueden reducir la demanda de agua de los tejidos no sumergidos cuyas raíces se encuentren en condición de hipoxia a través de la disminución de la conductividad estomática, limitando la incidencia de la radiación solar a través de la epinastia y la reducción del área foliar. Sin embargo, según Striker (2012), estrategias contrastantes como la de escape y de quiescencia, respectivamente exhibidas en plantas consideradas tolerantes y sensibles a la inundación, pueden manifestar un comportamiento del todo distinto una vez retirada el agua, es decir, durante la fase de recuperación.

La planta de tomate es generalmente considerada susceptible a la inundación (Kramer, 1951). Sin embargo, presenta adaptaciones morfológicas y fisiológicas que le permiten sobrevivir y, en una cierta medida, mitigar los efectos dañinos del estrés hipóxico debido al exceso de agua en el suelo. Entre ellas, la formación de aerénquima de origen lisígeno en el hipocótilo inundado (Kawase, 1981), la epinastia de las hojas (Jackson & Campbell, 1976) y la formación de un nuevo sistema radical adventicio en la base del tallo (Jackson, 1955) constituyen las adaptaciones más evidentes. En el caso de las raíces adventicias, su producción en condiciones de inundación se debe a una compleja interacción hormonal entre auxina y etileno (Vidoz et al., 2010). Se ha propuesto que las raíces adventicias formadas en condiciones de inundación constituirían la respuesta que mayormente determina la tolerancia del tomate a este tipo de estrés (Mc Namara & Mitchell, 1989; 1990). De hecho, el desarrollo de un nuevo sistema radical caracterizado por la presencia de espacios aerenquimáticos (Vidoz et al., 2016), restablecería en parte la conductividad estomática. Esto reduciría a su vez el daño al aparato fotosintético en plantas de tomate expuestas a inundación, cuyas raíces embrionales resultan afectadas por la hipoxia del suelo (Else et al., 2009). Más recientemente, el mutante de tomate *aerialroots* ha demostrado una mayor capacidad de acumulación de biomasa respecto al genotipo salvaje al ser sometido a inundación parcial, lo cual se explica por la abundante y constitutiva producción de primordios radicales adventicios que caracteriza este genotipo (Vidoz et al., 2016). Si bien existe un estudio precedente sobre el efecto positivo de las raíces adventicias para la recuperación del estrés por exceso de agua en tomate (Jackson, 1955), las bases fisiológicas y bioquímicas que explican dicho fenómeno aún se desconocen.

Por esta razón, la presente tesina tuvo como objetivo general estudiar en forma preliminar la fisiología de las plantas de tomate durante la fase de recuperación de la inundación ya que esta especie, además de su gran importancia agronómica, brinda la posibilidad de extraer los resultados obtenidos a otros cultivos hortícolas de interés. Hasta el momento, la mayor parte de los estudios realizados en tomate y otras especies se refieren a las respuestas de la planta durante el período de inundación, ignorando las alteraciones que la planta pueda sufrir una vez que se retira el agua. Por este motivo, los estudios sobre la recuperación de las plantas de tomate a la inundación (un estrés cada vez más frecuente) permitirán, posteriormente, profundizar el análisis sobre la variabilidad existente entre los genotipos de tomate más cultivados y sobre la capacidad de una planta en esas condiciones de responder a otros estímulos bióticos y abióticos.

Objetivo general:

Estudiar la fisiología de plantas de tomate durante la fase de recuperación al estrés por inundación.

Objetivos específicos:

- Determinar la partición de biomasa en plantas de tomate sometidas a inundación y en la fase sucesiva de retirada el agua.
- Medir la variación del contenido de azúcares solubles y almidón en plantas de tomate durante la fase de recuperación de la inundación.
- Estudiar el efecto de las raíces adventicias sobre la acumulación de biomasa y de la conductividad estomática, durante la fase de recuperación del estrés por inundación.

Materiales y métodos

Plantas de tomate del cultivar Ailsa Craig (AC) fueron cultivadas en una cámara climatizada bajo un régimen constante de temperatura de $26\pm1^{\circ}\text{C}$, 60-70% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16hs. Como fuente lumínica fueron empleadas lámparas de sodio de alta presión (Vialox[®], 400W, OSRAM) capaces de generar $254 \text{ mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad a nivel de las plantas. A la semana desde la siembra las plántulas fueron trasplantadas en macetas de 0,8 L en sustrato a base de turba (Dynamics 2 pH 5.5-6.5, Agri service, Buenos Aires, Argentina). Los ensayos de inundación fueron realizados empleando plantas de 4 semanas de edad. Las macetas fueron colocadas en contenedores

de plástico de 60 cm de alto, 40 cm de largo y 25 cm de profundidad. Las plantas fueron sumergidas con agua hasta alcanzar el nudo cotiledonar. A los 10 días de inundación se retiró el agua y las plantas fueron aporcadas con sustrato húmedo para mantener vitales las raíces adventicias que se formaron a lo largo del hipocótilo de las plantas inundadas. A los 10 días de inundación y a los 5, 10 y 15 días de retirada el agua se midió el área foliar de acuerdo al procedimiento descripto por Vidoz et al. (2016). Cada hoja fue extendida en un plano horizontal y se le sacó una foto. Luego, cada imagen fue procesada con el software ImageJ® para obtener el valor del área. Además, se tomaron datos de biomasa de hojas, tallo, raíces y raíces adventicias.

El análisis de los azúcares solubles fue llevado a cabo mediante una extracción de 20-50 mg de muestras secas de hojas en 10ml de etanol 80% a 90°C durante 15 minutos en tubos de PVC de 15 ml. Luego de una centrifugación a 7000 rpm a temperatura ambiente por 10 min se recuperó el sobrenadante. La extracción fue repetida 2 veces más agregando 5 ml de solvente cada vez. El sobrenadante fue analizado para obtener el contenido de azúcares solubles según el método del fenol/sulfúrico descripto por Buysse y Merckx (1993). Brevemente, una alícuota de 0,5 ml del extracto fue puesta a reaccionar en presencia de 0,5 ml de una solución de fenol 28% en etanol 80%. Luego se agregaron 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado mezclando cuidadosamente. Una vez que la temperatura de la mezcla se equilibró con la temperatura del ambiente, se leyó la absorbancia a 490 nm mediante un espectrofotómetro. La concentración de azúcares solubles fue obtenida interpolando los valores de absorbancia de las muestras con una curva patrón realizada con concentraciones crecientes de glucosa (0, 20, 40, 60, 80, 128, 160 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Para realizar el análisis del almidón, los tubos con el residuo insoluble proveniente de la extracción de los azúcares solubles fueron puestos en estufa a 50°C durante 4hs para que evapore todo el etanol residual. Sucesivamente se agregaron 5 ml de agua destilada. Manteniendo en suspensión el depósito, se tomaron 0,5 ml para ponerlos en tubos eppendorf.

La suspensión fue calentada a 100°C durante 15 min, y una vez enfriada, se agregaron 0,4 ml de buffer acetato 200 mM pH 4,5. Luego, a cada tubo se agregó 0,1 mL de una solución 0,1 U μL^{-1} de la enzima α -amiloglucosidasa (*Rhizopusspp.* $\geq 40,000$ units/g solid, Sigma-Aldrich). Por cada muestra se prepararon “blancos” donde a la suspensión se agregó 0,1 ml de buffer acetato en vez de la solución con enzima. Los tubos fueron incubados *overnight* a 37°C. Finalmente, se procedió a la centrifugación de los mismos a 12000 rpm por 2 minutos y luego fue tomada una alícuota de 0,5 ml. La glucosa (que se obtuvo luego de la

hidrólisis del almidón) fue analizada con el método fenol/sulfúrico. Por cada muestra, a la absorbancia en presencia de la enzima fue restada la absorbancia de su propio blanco. El contenido de almidón, expresado como $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco $^{-1}$, fue calculado de acuerdo a Smith y Zeeman (2006).

La medida de la conductividad estomática fue realizada durante el ensayo con plantas aporcadas y no aporcadas durante los primeros 5 días de retirada el agua. La medida fue obtenida empleando el porómetro portátil marca Decagon modelo SC-1, promediando, por cada planta, los valores de los folíolos apicales de la tercera, cuarta y quinta hojas.

La tinción histoquímica para visualizar la acumulación de peróxido de hidrógeno (y actividad de las peroxidásas) en hojas se realizó empleando el compuesto 3,3-diaminobencidina (DAB). Se preparó una solución de Na_2HPO_4 200 mM, luego se solubilizaron 50 mg de DAB en 45 ml de agua destilada ajustando inicialmente el pH a 3,0 con HCl 0,2 M. Se sacudió vigorosamente el tubo para favorecer la solubilidad del compuesto. Finalmente se añadieron 2,5 ml de Na_2HPO_4 200 mM para tener un pH alrededor de 7,0 y 50 μl de Triton X 10% (concentración final 0,01%). Se mantuvo la solución al reparo de la luz. El folíolo apical de la cuarta hoja de plantas control, inundadas, y después 3 y 7 días de retirada el agua (con y sin aporque) fueron puestos en erlenmeyers en presencia de unos mililitros de solución de DAB. Luego se aplicó vacío durante 5 minutos para favorecer el ingreso del líquido en los tejidos y se dejaron incubar por 18h en oscuridad y agitación constante. Luego de la incubación, los folíolos fueron diafanizados en una solución 3:1 (v/v) de etanol y ácido acético por un tiempo necesario a la completa remoción de los pigmentos y renovando cada tanto el solvente. Finalmente, se dejaron los folíolos diafanizados en agua destilada hasta su completa rehidratación y luego se fotografiaron.

Resultados

Como primer objetivo se evaluó si, durante la fase de recuperación, las plantas de tomate previamente sometidas a inundación lograban alcanzar a las plantas control en biomasa y área foliar. En el caso del área foliar total (Fig. 1A), las plantas fueron afectadas por el estrés, lo que determinó una reducción significativa de la superficie de las láminas foliares de alrededor de 1.6 veces con respecto a las plantas control después de 10 días de inundación. Sin embargo, al cabo de 15 días de retirada el agua, el área foliar de las plantas sometidas a estrés no mostró diferencias significativas con el área foliar de las plantas control. Si bien se observó una recuperación en términos de superficie total de hojas, la

acumulación de biomasa foliar se vio significativamente reducida con respecto a las plantas control durante el periodo post estrés (Fig. 1B). Es interesante observar cómo la relación entre el peso seco (biomasa) y el área foliar después de 10 días de sumersión fue prácticamente idéntica a la de las plantas control, mientras que se mantuvo siempre significativamente inferior cuando las plantas se encontraban en fase de recuperación (Fig. 1C). Del mismo modo, la biomasa del tallo se vio afectada durante la inundación, y la acumulación de materia seca en la sucesiva fase de recuperación no alcanzó los niveles del control (Fig. 1D). Con respecto a las raíces, el anegamiento produjo la muerte casi total del sistema radical original que no se pudo recuperar cuando fueron restauradas las condiciones de oxigenación del suelo, durante los 15 días de recuperación (Fig. 1E). El sistema radical adventicio, sin embargo, permitió a las plantas estresadas mantener la relación raíces (R, *root*) parte aérea (S, *shoot*) constante y similar a la de las plantas control, durante la fase de inundación y de recuperación (Fig. 1F). Cabe destacar que durante los 15 días posteriores a la retirada el agua, la velocidad de acumulación de biomasa (g d^{-1}) fue de 2.1, 1.7 y 1.9 veces más rápida para la biomasa de hojas, tallo y total, respectivamente, con respecto a la fase precedente de anegamiento (Tabla 1).

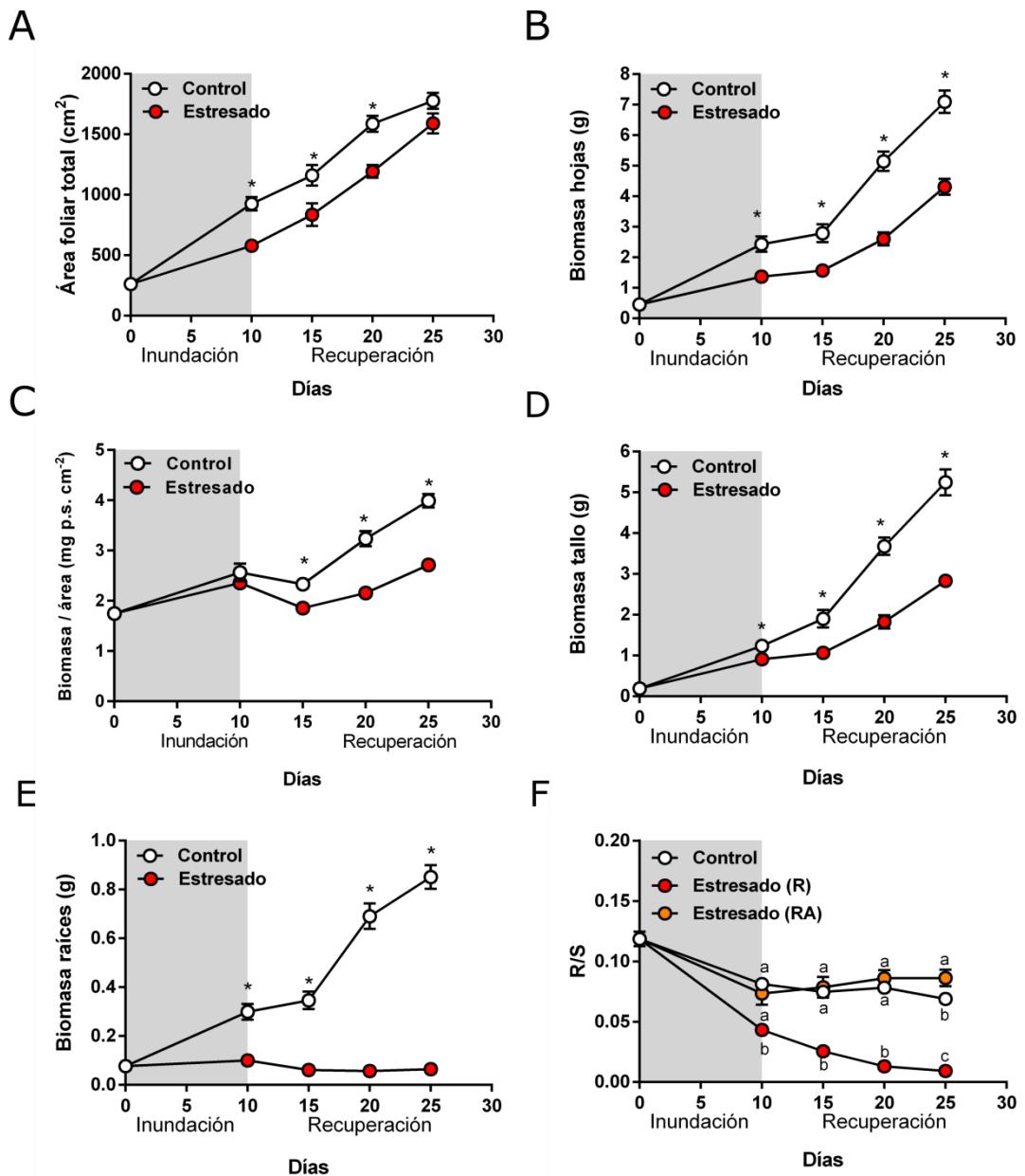


Figura 1: Efecto de la inundación y de la fase de recuperación sobre algunos parámetros de crecimiento de las plantas de tomate. Las plantas indicadas con el término “estresado”, fueron sometidas a 10 días de inundación (zona sombreada de los gráficos) y luego a 15 días de recuperación una vez retirada el agua en exceso. En cambio, las plantas denominadas “control” fueron mantenidas con riego regular durante todo el periodo. Se evaluaron el área (A) y la biomasa (B) de hojas, y además se analizó el índice biomasa/área foliar (C). Se midió también la biomasa de tallos (D) y raíces (E). En (F) se reporta el gráfico de la relación entre raíces (R)/parte aérea (S) y raíces adventicias (RA)/parte aérea. Cada punto representa el promedio ± Error Estándarde 10 plantas. El asterisco indica diferencia significativa entre plantas control y estresadas para el mismo día ($P<0,05$ Prueba t de Student). Las letras distintas en (F) indican diferencias significativas entre control, estresado (R) y estresado con aporque posterior (RA) para el mismo día ($P<0,05$ ANOVA y Tuckey post test).

Tabla 1: Tasa diaria de acumulación de biomasa (g por día) e incremento de área foliar (cm^2 por día) en plantas control y estresadas durante 10 días de inundación y 15 días de recuperación.

		Periodo de inundación	Periodo de recuperación
Área foliar total ($\text{cm}^2 \text{día}^{-1}$)	Control	66,33	56,79
	Estresado	31,67	67,43
Biomasa hojas (g día^{-1})	Control	0,197	0,311
	Estresado	0,091	0,196
Biomasa tallo (g día^{-1})	Control	0,104	0,267
	Estresado	0,072	0,128
Biomasa raíces (g día^{-1})	Control	0,022	0,037
	Estresado	0,002	-0,002
Biomasa total (g día^{-1})	Control	0,326	0,615
	Estresado	0,183	0,352

Con el objetivo de observar si durante la fase de recuperación hubo restablecimiento del contenido de carbohidratos no estructurales en las hojas, se llevaron a cabo análisis del contenido de azúcares solubles y almidón. Los datos presentados en la figura 2 muestran una disminución del contenido de azúcares solubles durante los primeros 10 días de recuperación, manteniéndose constante a los 15 días de retirada el agua. Comparando con las plantas control, la concentración de azúcares solubles acumulados en las plantas estresadas fue 1.5 veces menor a los 5 días post-inundación y más de 2.0 veces a los 10 y 15 días (Fig. 2A). Con respecto al almidón, las plantas que sufrieron estrés por inundación no acumularon almidón durante los 15 días desde el fin del estrés, el contenido se mantuvo constantemente más bajo que en el control (2.0, 2.2 y 3.0 veces menos a los 5, 10 y 15 días de recuperación, respectivamente). En las plantas no estresadas, el contenido de almidón aumentó progresivamente durante el periodo correspondiente a la fase de recuperación (Fig. 2B).

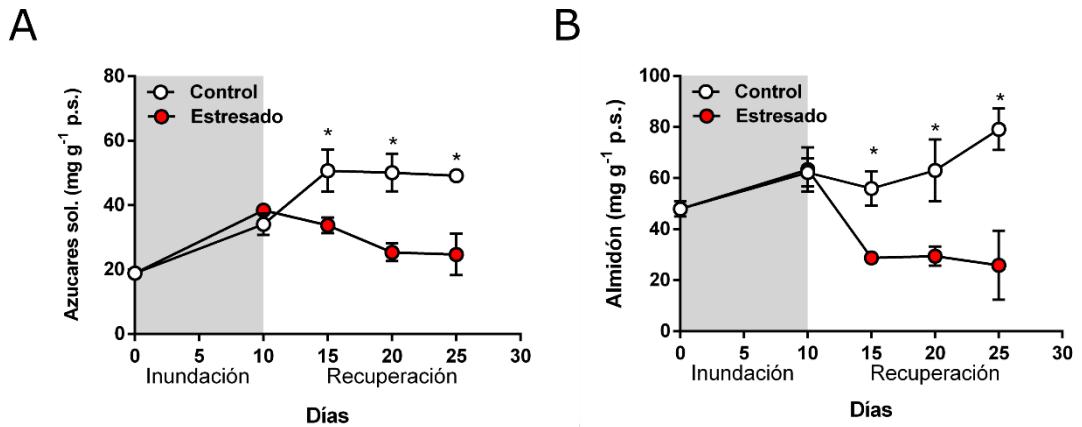


Figura 2: Contenido de azúcares solubles (A) y de almidón (B), expresados como mg de equivalentes de sacarosa por gramos de peso seco, en hojas de plantas control y sometidas a 10 días de inundación (área del gráfico sombreada) y 15 días de recuperación (estresado). Cada punto representa el promedio de 4 repeticiones biológicas, cada una compuesta de un pool de 3 plantas distintas. Los asteriscos indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba t de Student ($P<0,05$).

La conductividad estomática en hojas de plantas sometidas a 3 días de inundación fue significativamente menor que la conductividad de las plantas control, con valores de 197 vs 446 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ en plantas estresadas y control, respectivamente. Es interesante observar cómo, luego de 5 días de permanencia en agua, las plantas recuperaron parcialmente la conductividad estomática alcanzando valores que, si bien aún inferiores al control, fueron casi el doble de los valores medidos a los 3 días (Fig. 3). Se planteó la hipótesis de que las raíces adventicias, si eran mantenidas viables en la fase sucesiva a la inundación podían favorecer la recuperación de las plantas. Por esta razón, se midió la conductividad estomática en plantas a las cuales se aportó suelo al cuello (aporque) y en plantas sin esta práctica (no aporcadas). Se puede observar que solo un día después de haber removido el agua, la conductividad estomática de las plantas aporcadas ya fue estadísticamente superior a las no aporcadas y no mostró diferencia con las del control (Fig. 3). Desafortunadamente, debido a una improvisa falla técnica del porómetro, no fue posible continuar con las mediciones programadas para tiempos superiores a 1 día post-inundación.

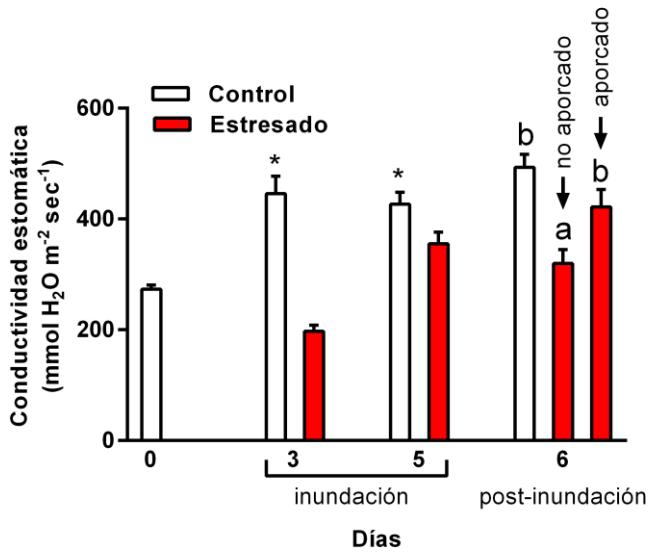


Figura 3: Conductividad estomática en hojas de plantas control y estresadas (inundadas durante 5 días). Luego de retirar el agua, la mitad de las plantas fue aporcada con sustrato para mantener viables las raíces adventicias y la otra mitad permaneció con las raíces adventicias expuestas. Después de un día (día 6 desde el inicio del ensayo) fue medida la conductividad estomática. Cada barra representa el promedio \pm Error Estándar de 10 plantas. Por cada planta se promediaron las medidas de 3 folíolos de la 3[°], 4[°] y 5[°] hoja. Los asteriscos indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba t de Student ($P<0,05$). Las letras distintas en el punto 6 indican diferencias significativas de acuerdo al test ANOVA una vía y al post-test de Tukey ($P<0,05$).

Luego de 10 días de recuperación, fue medida la biomasa de las plantas control, aporcadas y no aporcadas. En el caso de la biomasa foliar, no se observaron diferencias significativas entre plantas aporcadas y no aporcadas. Con respecto a la biomasa de tallo y raíces originales, las plantas no aporcadas acumularon mayor materia seca respecto a las plantas aporcadas. Sin embargo, como era previsible, las plantas aporcadas desarrollaron el doble de biomasa de raíces adventicias respecto a las plantas no aporcadas (Tabla 2). Si se considera la repartición de la biomasa entre hojas, tallo y raíces (comprendiendo raíces originales y adventicias) es interesante observar que entre las plantas aporcadas y las plantas control la repartición entre los distintos órganos fue muy similar, con diferencias del 0,91% para hojas, 1,4% para tallo y 0,51% para raíces. En cambio, en las plantas que no fueron aporcadas, las diferencias fueron de mayor entidad, resultando del 4,0; 4,8 y 0,73% para hojas, tallo y raíces, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 2: Biomasa (g de peso seco) de hojas, tallos, raíces y raíces adventicias en plantas control, y luego de 10 días de recuperación. Mitad de las plantas sometidas a la fase de recuperación fueron aporcadas con sustrato para mantener viables las raíces adventicias. Cada valor es el promedio ± Error Estándar de 10 plantas. El asterisco para las raíces adventicias indica diferencias significativas entre aporcado y no aporcado, de acuerdo a la prueba t de Student ($P<0,05$). Las letras distintas indican diferencias significativas entre control, aporcado y no aporcado por cada órgano de las plantas, de acuerdo a test ANOVA una vía y al post Test de Tuckey ($P<0,05$).^{*}

Biomasa (g) peso seco			
	Control	No aporcado	Aporcado
Hojas	2,517 ± 0,098 (10) a	1,474 ± 0,075 (10)b	1,617 ± 0,053 (10)b
Tallo	1,349 ± 0,055 (10) a	0,978 ± 0,049 (10)b	0,814 ± 0,099 (10)c
Raíces	0,505 ± 0,022 (10) a	0,174 ± 0,016 (10)b	0,080 ± 0,004 (10)c
Raíces adventicias	–	0,126 ± 0,013 (10)*	0,259 ± 0,018 (10)
R/S	0,132 ± 0,008 (10) a	0,122 ± 0,006 (10) a	0,139 ± 0,006 (10) a

Tabla 3: Distribución de la biomasa entre hojas, tallos y raíces más raíces adventicias en plantas control y luego de 10 días de recuperación, con y sin aporque. Los datos representan el promedio ± Error Estándar de 10 plantas. Las letras distintas indican diferencias significativas entre control, aporcado y no aporcado por cada órgano de las plantas de acuerdo a test ANOVA una vía y al post-test de Tuckey ($P<0,05$).

Partición de biomasa (%)			
	Control	No aporcado	Aporcado
Hojas	57,47 ± 0,012 (10)b	53,40 ± 0,017 (10)c	58,38 ± 0,012 (10)a
Tallo	30,88 ± 0,011 (10)b	35,68 ± 0,018 (10)a	29,45 ± 0,010 (10)c
Raíces + RA	11,66 ± 0,006 (10)b	10,93 ± 0,005 (10)c	12,17 ± 0,004 (10)a

La tinción histoquímica con DAB permite individuar la presencia en los tejidos de peróxido de hidrógeno. En un ensayo realizado con plantas inundadas y sucesivamente sometidas a un tiempo de recuperación, se vio que luego de 6 días de anegamiento la tinción del foliolo fue mucho más intensa respecto al control (Fig. 4A, B). A los 3 días de retirada el agua, las hojas de las plantas aporcadas y no aporcadas se tiñeron intensamente respecto al control (Fig. 4 C, D, E). Sin embargo, a los 7 días de recuperación, en hojas de plantas aporcadas, la intensidad del precipitado marrón disminuyó notablemente mientras que en hojas de plantas que no fueron aporcadas mantuvo su intensidad (Fig. 4 F, G, H).

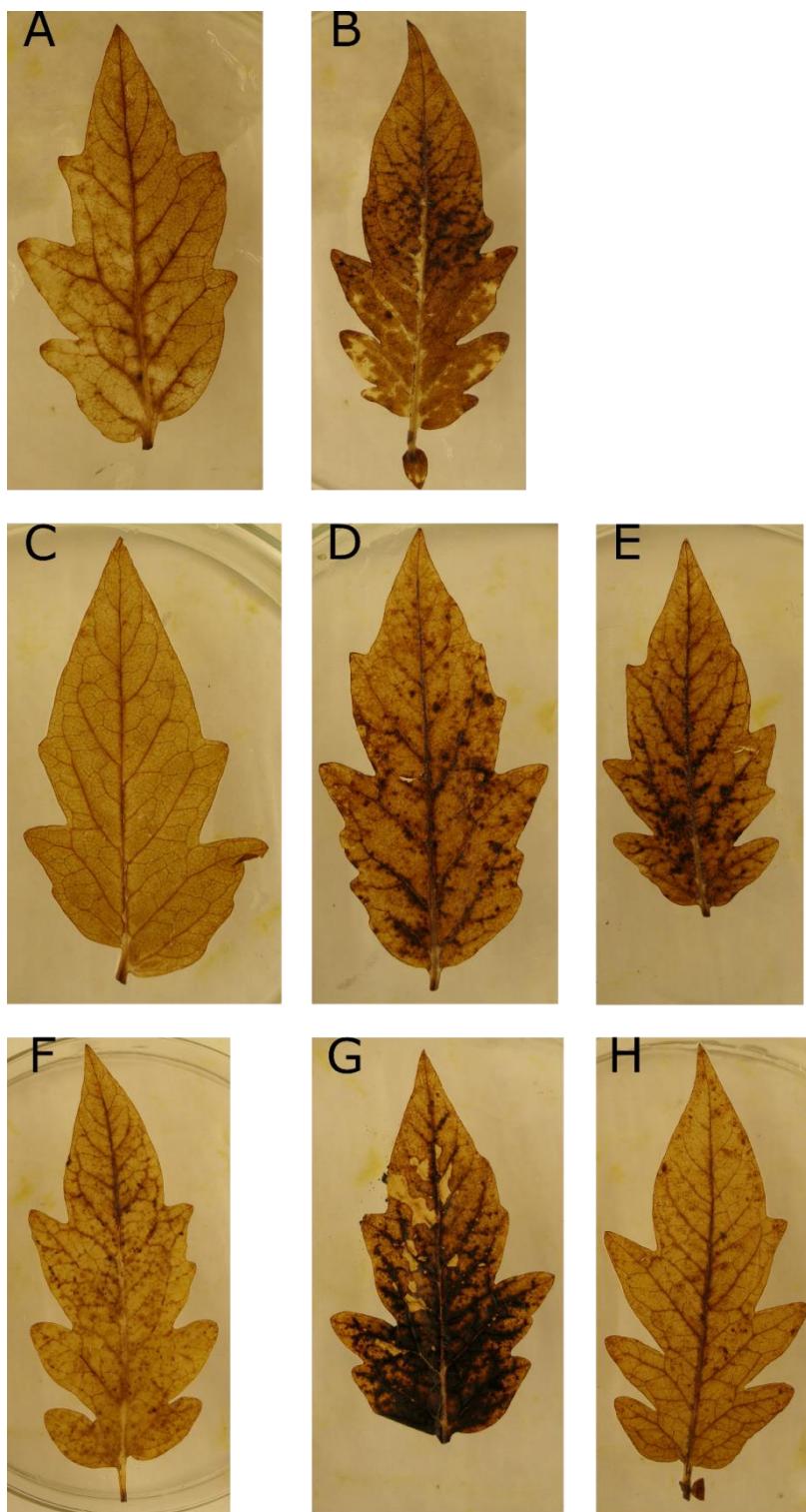


Figure 1: Efecto de la inundación y del aporque durante la fase post-inundación sobre la acumulación de H_2O_2 por medio de la tinción histoquímica con DAB (Diaminobencidina). Fotos de folíolos apicales de plantas control (A, C, F) e inundadas por 10 días (B). Las fotos D y G representan los folíolos de plantas en fase de recuperación luego de 3 y 7 días sin aporcar, respectivamente. Las fotos E y H fueron tomadas a folíolos de plantas en fase de recuperación a las cuales se realizó aporque, luego de 3 y 7 días respectivamente.

Discusión

La inundación afecta a las plantas de tomate alterando diversos parámetros fisiológicos, entre ellos, la capacidad de acumular biomasa en las distintas partes de la planta y de incrementar el área foliar (Fig. 1A, B, D, E). Esto podría deberse a una menor fijación de carbono como consecuencia del mayor cierre estomático en plantas inundadas (Fig. 3), lo que también fue observado por Else et al. (2009). Es interesante destacar que al iniciarse la producción de raíces adventicias, dicho parámetro se incrementa (Fig. 3) debido a que las raíces adventicias restablecen la capacidad de la planta de absorber agua. La coloración realizada con DAB permitió observar que, durante la inundación, se produce la acumulación de H₂O₂, lo que podría generar un daño oxidativo (Fig. 4 A, B).

Hasta el momento, la mayor parte de los estudios realizados en tomate y otras especies se refieren a las respuestas de la planta durante el período de inundación, ignorando las alteraciones que la planta pueda sufrir una vez que se retira el agua. En los experimentos realizados se observó que, si bien la acumulación de biomasa en la fase de recuperación se mantuvo por debajo del nivel de las plantas control, la tasa de acumulación de biomasa hojas, tallo y total se duplicó en esta fase con respecto al periodo de inundación. De forma similar, en plantas de *Medicago sativa* expuestas a inundación, el sucesivo restablecimiento de las condiciones aeróbicas permitió recuperar la funcionalidad fotosintética y de asimilación de algunos nutrientes; sin embargo, el crecimiento de las plantas resultó fuertemente afectado debido a la necesidad de las mismas de re-direccionalizar los fotoasimilados hacia las raíces y hacia hojas para la reparación del aparato fotosintético (Smethurst et al., 2005). Con respecto al área foliar se pudo apreciar que, luego de 15 días de recuperación, las plantas estresadas alcanzaban los mismos niveles que el control, aunque la biomasa de las mismas era significativamente inferior. Esto podría indicar que en la planta se prioriza la formación de superficie capaz de interceptar radiación y captar CO₂ por sobre su espesor (Fig. 1 A, B, C). El nuevo sistema radical adventicio que se forma durante la fase de inundación (siempre y cuando se mantenga viable con la práctica del aporque) permite mantener la relación R/S aun cuando muere el sistema original de raíces (Fig. 1 E, F).

En plantas inundadas, el contenido de azúcares solubles y almidón se mantuvo similar al de las plantas control (Fig. 2 A, B), pero dichos valores se redujeron notablemente durante la fase de recuperación, en la cual la planta aumentó su tasa de acumulación diaria de biomasa, pudiendo asemejarse a una estrategia de quiescencia. Según Striker (2012), estrategias contrastantes como la de escape y de quiescencia, respectivamente exhibidas en

plantas consideradas tolerantes y sensibles a la inundación, pueden manifestar un comportamiento del todo distinto una vez retirada el agua, es decir, durante la fase de recuperación. De hecho, en aquellas plantas donde muchos de los carbohidratos fueron consumidos para la elongación durante la fase de inundación (escape), tuvieron un crecimiento modesto durante el periodo post-inundación. En cambio, las plantas quiescentes durante el estrés, mantuvieron un mayor nivel de carbohidratos que fueron empleados como fuente de energía una vez restablecida la oxigenación de los tejidos, determinando una mayor tasa de crecimiento.

Es de destacar que, si bien existen numerosos estudios sobre los mecanismos de tolerancia a la inundación (Loreti et al., 2016), las respuestas de las plantas después del estrés han sido menos consideradas pese a ser esenciales para la evaluación de la capacidad de recuperación de las plantas (Striker, 2012) En este sentido se planteó la hipótesis que el mantenimiento de las raíces adventicias que se formaron durante la fase de inundación constituirían una ventaja para la recuperación una vez retirada el agua. Los datos de conductividad estomática, por ejemplo, indican que las plantas que fueron aporcadas lograron restablecer la misma conductividad que las plantas control (Fig. 3). Los datos de biomasa indicarían que muchos de los fotoasimilados se repartieron hacia las raíces adventicias (Tabla 2). Si bien no se observó diferencia estadística entre la relación raíces y parte aérea en plantas aporcadas y no /R/S (Tabla 2), la repartición de la biomasa entre los distintos órganos vegetativos de las plantas aporcadas y plantas control fue similar indicando el efecto positivo de las raíces adventicias durante la fase de recuperación (Tabla 3). Uno de los factores que más inciden en la producción de biomasa durante la fase de post-inundación es el estrés oxidativo (Tamang & Fukao, 2015). Es de destacar que la acumulación de H_2O_2 disminuyó hasta los niveles del control luego de 7 días de retirada el agua, en plantas en las cuales se mantuvieron viables las raíces adventicias(Fig. 4 F, G, H). En conclusión, las observaciones realizadas permitieron discernir que las respuestas de aclimatación durante la inundación, en particular la formación de un nuevo sistema de raíces adventicias, tienen un costo energético alto al retirarse el agua, lo cual impactaría negativamente sobre diversos procesos fisiológicos mientras que acentuaría la senescencia y el estrés oxidativo. Sin embargo, si se logra mantener la viabilidad de estas raíces adventicias, se vio que la planta se ve beneficiada, ya que el mayor volumen de raíces permitiría recuperar la apertura estomática y la absorción de agua y nutrientes, atenuando el estrés oxidativo y restituyendo la funcionalidad del aparato fotosintético.

Bibliografía

- Bailey-Serres J., Lee S.C. & Britton E. (2012) Water proofing crops: effective flooding survival strategies. *Plant Physiol.* 160: 1698-1709.
- Buyssse J. & Merckx R. (1993) An improved colorimetric method to quantify sugar content of plant tissue. *J. Exp. Bot.* 44: 1627-1629.
- Else M., Janowiak F., Atkinson C. & Jackson M.B. (2009). Root signals and stomatal closure in relation to photosynthesis, chlorophyll a fluorescence and adventitious rooting off flooded tomato plants. *Ann. Bot.* 103: 313-323.
- Jackson M.B. & Campbell D.J. (1976) Water logging and petiole pinastis in tomato: the role of ethylene and low oxygen. *New Phytol.* 76: 21-29.
- Jackson M.B. & Colmer T.D. (2005) Response and adaptation by plants to flooding stress. *Ann. Bot.* 96, 501-505.
- Jackson W.T. (1955) The role of adventitious roots in recovery of shoots following flooding of the original root systems. *Am. J. Bot.* 42: 816-819.
- Kawase M. (1981) Effect of ethylene on aerenchyma development. *Amer. J. Bot.* 68: 651-658.
- Kramer P.J. (1951) Causes of injury to plants resulting from flooding of the soil. *Plant Physiol.* 26: 722-736.
- Kundzewicz Z.W., Mata L.J., Arnell N.W., Doll P., Kabat P., Jimenez B., Miller K.A., Oki T., Sen Z. & Shiklomanov I.A. (2007) Fresh water resources and their management. Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden & C.E. Hanson, Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 173-210.
- Loreti E., van Veen H. & Perata P. (2016) Plant response to flooding stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33: 64-71.
- McNamara S.T. & Mitchell C.A. (1989) Differential flood stress resistance of two tomato genotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114: 976-980.
- McNamara S.T. & Mitchell C.A. (1990) Adaptive stem and adventitious root responses of two tomato genotypes to flooding. *HortScience* 25: 100-103.

- Smethurst C.F., Garnett T. & Shabala S. (2005) Nutritional and chlorophyll fluorescence responses of lucerne (*Medicago sativa*) to water logging and subsequent recovery. *Plant Soil* 270: 31-45.
- Smith A.M. & Zeeman S.C. (2006). Quantification of starch in plant tissues. *Nature Protocols* 1: 1342-1345.
- Striker G.G. (2012) Time is on our side: the importance of considering a recovery period when assessing flooding tolerance in plants. *Ecol. Res.* 27: 983-987.
- Tamang B.G. & Fukao T. (2015) Plant adaptation to multiple stressors during submergence and following desubmergence. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 30164-30180.
- Vartapetian B.B. & Jackson M.B. (1997) Plant adaptation to anaerobic stress. *Ann. Bot.* 79: 3-20.
- Vidoz M.L., Loret E., Mensuali-Sodi A., Alpi A. & Perata P. (2010) Hormonal interplay during adventitious roots formation in flooded tomato plants. *Plant J.* 63: 551-562.
- Vidoz M.L., Mignolli F., Aispuru H.T. & Mroginski L.A. (2016) Rapid formation of adventitious roots and partial lethality results in faster adaptation to flooding in the aerial roots (aer) mutant of tomato. *Sci. Hort.* 201: 130-139.
- Voesenek L.A.C.J. & Sasidharan R. (2013) Ethylene- and oxygen signalling- drive plant survival during flooding. *Plant Biol.* 15: 426-435.
- Voesenek L.A.C.J., Colmer T.D., Pierik R., Millenaar F.F. & Peeters J.M. (2006) How plants cope with complete submergence. *New Phytol.* 170: 213-226.