



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

MAESTRÍA EN CULTIVOS INTENSIVOS

“Efectos fisiológicos de la inhibición de la percepción y síntesis de etileno en la mitigación del estrés por inundación en tomate (*Solanum lycopersicum L.*)”

Ing. Agr. (Esp.) Leandro Federico DE PEDRO

Tesis para optar el grado de:

MAGÍSTER EN CULTIVOS INTENSIVOS

Esperanza, 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

MAESTRÍA EN CULTIVOS INTENSIVOS

“Efectos fisiológicos de la inhibición de la percepción y síntesis de etileno en la mitigación del estrés por inundación en tomate (*Solanum lycopersicum L.*)”

Autor: Ing. Agr. (Esp.) Leandro Federico DE PEDRO

Directora: Ing. Agr. (Dr.) María Laura VIDOZ (CONICET-IBONE-UNNE)

Co-director: Ing. Agr. (Dr.) Carlos Alberto BOUZO (UNL)

Miembros del jurado:

Tesis para optar el grado de:

MAGÍSTER EN CULTIVOS INTENSIVOS

Esperanza, 2019

Dedico este trabajo a Verónica, nuestro ángel

AGRADECIMIENTOS

A Agostina, mi amada esposa, por su acompañamiento y el apoyo constante e incondicional para afrontar cada nuevo desafío de la vida.

A mis padres, María del Carmen y Jorge, por sus enseñanzas y formar las bases de quién soy hoy.

A la Dr. María Laura Vidoz, mi directora de tesis, por confiar en mis capacidades, por las correcciones y sugerencias para este trabajo, y por las oportunidades que me ha ofrecido para continuar mi desarrollo académico-profesional.

Al Dr. Carlos Alberto Bouzo, mi co-director y profesor de posgrado, por su acompañamiento y tiempo dedicado a las correcciones de mis trabajos de Especialidad y Maestría.

Al Dr. Francesco Mignolli, mi amigo, quien desempeñó el rol de segundo director (no formal) de esta tesis. Por compartir conmigo su plan de trabajo, por su colaboración y por su buena predisposición a ayudar. También por su generosidad, quien junto a Ma. Laura me abrieron las puertas de su familia y me han facilitado las condiciones para realizar la tan gratificante experiencia de formación en Pisa, Italia.

A Dario y Miria, padres de Francesco, por su invaluable generosidad, bondad y cariño.

Al Dr. Piero Piciarelli, director del *Laboratorio di Fisiologia Vegetale del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali dell'Università di Pisa* (UNIPi), por su gestión y amabilidad para obtener los permisos necesarios para mi estadía en Pisa.

A los profesores e investigadores del *Laboratorio di Fisiologia Vegetale* de la UNIPi, especialmente al Dr. Andrea Scartazza, por las enseñanzas y atenciones que han tenido conmigo para hacer de aquella una experiencia exitosa desde lo profesional y personal.

Al Dr. Michele Moles, mi amigo, por su colaboración para la concreción de algunos de los experimentos que formaron parte de este trabajo.

Al Gobierno de la Provincia de Formosa, por facilitar las condiciones para mi formación de posgrado.

A todos los que no se encuentran en esta lista pero que colaboraron directa e indirectamente en el desarrollo de esta tesis.

A Dios, por bendecirme con la oportunidad de conocer a tantas personas excepcionales durante estos años de formación y por protegerme en cada uno de mis viajes.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. <i>El tomate</i>	9
1.1.1. <i>Origen y taxonomía</i>	9
1.1.2. <i>La planta: descripción botánica y hábitos de crecimiento</i>	9
1.1.3. <i>Importancia económica del cultivo</i>	11
1.2. <i>Etileno</i>	13
1.2.1. <i>Historia: la molécula y la hormona</i>	13
1.2.2. <i>Biosíntesis de etileno</i>	14
1.2.3. <i>Señalización del etileno</i>	16
1.2.4. <i>Funciones fisiológicas del etileno durante el desarrollo de la planta</i>	18
1.2.5. <i>Etileno y el control de las respuestas al estrés</i>	19
1.2.6. <i>Inhibidores del etileno</i>	19
1.2.7. <i>Tomate mutante insensible al etileno Never ripe</i>	21
1.3. <i>Estrés en las plantas</i>	23
1.3.1. <i>Importancia del estudio del estrés</i>	24
1.4. <i>Estrés por inundación del suelo</i>	24
1.4.1. <i>Flooding, Waterlogging y Submergence</i>	26
1.4.2. <i>Alteraciones metabólicas y morfo-fisiológicas, relacionados al estrés por inundación</i>	27
1.4.3. <i>El etileno y la inundación</i>	28
1.4.3.1. <i>Efecto perjudicial del etileno en plantas afectadas por la inundación</i>	30
1.4.4. <i>Senescencia anticipada durante la inundación</i>	30
1.4.5. <i>Absorción de agua y nutrientes durante la inundación</i>	32
1.4.6. <i>Cierre de estomas e intercambio gaseoso durante la inundación</i>	33
1.4.7. <i>Fotosíntesis e intercambio gaseoso durante la inundación</i>	33
1.4.8. <i>Fluorescencia de la clorofila durante la inundación</i>	35
1.4.9. <i>Balance de carbohidratos durante la inundación</i>	37

2. HIPÓTESIS	39
3. OBJETIVOS	40
3.1. <i>Objetivo general</i>	40
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	40
4. METODOLOGÍA	41
4.1. <i>Experimentos realizados con el mutante Nr</i>	41
4.1.1. <i>Primera experiencia con Nr: Evaluación visual del progreso de la senescencia foliar durante la inundación</i>	41
4.1.1.1. <i>Material vegetal y condiciones experimentales</i>	41
4.1.1.2. <i>Obtención de las muestras y análisis estadístico</i>	42
4.1.2. <i>Segunda experiencia con Nr: Evaluación de parámetros fisiológicos y moleculares relacionados a la senescencia</i>	43
4.1.2.1. <i>Material vegetal y condiciones experimentales</i>	43
4.1.2.2. <i>Obtención de las muestras y análisis estadístico</i>	44
4.1.2.2.1. <i>Análisis de pigmentos foliares</i>	45
4.1.2.2.2. <i>Análisis del intercambio gaseoso</i>	45
4.1.2.2.3. <i>Análisis del contenido de proteínas solubles totales</i>	46
4.1.2.2.4. <i>Análisis de la actividad proteásica total</i>	47
4.1.2.2.5. <i>Contenido de enzima Rubisco</i>	48
4.1.2.2.6. <i>Estudio de la expresión génica en hojas en respuesta a la inundación</i> ...	50
4.1.2.2.6.1. <i>Extracción ARN</i>	50
4.1.2.2.6.2. <i>Purificación del ARN</i>	51
4.1.2.2.6.3. <i>Síntesis de ADNc</i>	51
4.1.2.2.6.4. <i>PCR en tiempo real</i>	52
4.1.2.2.7. <i>Fluorescencia de la clorofila a</i>	53
4.1.2.2.8. <i>Análisis de carbohidratos no estructurales</i>	53
4.1.2.2.9. <i>Detección in-situ de H₂O₂ mediante tinción con DAB</i>	55
4.2. <i>Experimentos realizados con inhibidores del etileno</i>	55
4.2.1. <i>Material vegetal y condiciones experimentales</i>	55
4.2.2. <i>Tratamientos con inhibidores</i>	56
4.2.2.1. <i>Experimento 1. Prueba preliminar para la evaluación de diferentes inhibidores del etileno</i>	56
4.2.2.2. <i>Experimento 2. Efecto del inhibidor AVG sobre el contenido de clorofila y la fluorescencia de la clorofila a</i>	56
4.2.2.2.1. <i>Obtención de las muestras y análisis estadístico</i>	57

5. RESULTADOS	58
5.1. <i>Análisis de pigmentos foliares</i>	58
5.2. <i>Análisis de pigmentos en tratamientos con AVG</i>	60
5.3. <i>Análisis de la fluorescencia de la clorofila a</i>	60
5.4. <i>Fluorescencia de la clorofila a en tratamientos con AVG</i>	61
5.5. <i>Análisis del estrés oxidativo</i>	62
5.6. <i>Análisis del intercambio gaseoso</i>	62
5.7. <i>Análisis de carbohidratos en hojas</i>	65
5.8. <i>Análisis del contenido de proteínas y actividad proteásica total</i>	67
5.9. <i>Análisis del contenido de la enzima Rubisco</i>	68
5.10. <i>Análisis de la expresión de CYP1, CYP2, CYP3, RcbL y RcbS</i>	68
6. DISCUSIÓN	70
7. CONCLUSIONES	79
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
9. ANEXOS	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de tomate a nivel mundial.....	9
Figura 2. Ruta de biosíntesis de etileno y ciclo de Yang en plantas superiores.....	15
Figura 3. Modelo simplificado de señalización del etileno en <i>Arabidopsis</i>	17
Figura 4. Impacto de las inundaciones sobre la agricultura a nivel mundial	24
Figura 5. Diferentes niveles de estrés por inundación	27
Figura 6. Establecimiento del experimento con las plántulas de tomate.....	42
Figura 7. Esquema del sistema utilizado para realizar el tratamiento de inundación (IBONE, UNNE, Argentina).....	42
Figura 8. Tratamiento de inundación (UNIPi, Italia).....	44
Figura 9. Esquema de sistema utilizado para realizar el tratamiento de inundación (UNIPi, Italia)	44
Figura 10. Adaptación de broches para medición de fluorescencia.....	57
Figura 11. Clorosis foliar en tomate durante la inundación en <i>Nr</i> y PRS durante la inundación	58
Figura 12. Contenido de clorofilas y carotenoides en <i>Nr</i> y PRS durante la inundación	59
Figura 13. Índice SPAD en AC durante la inundación	60
Figura 14. Parámetros de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en <i>Nr</i> y PRS durane la inundación.....	61
Figura 15. Eficiencia fotoquímica máxima del PSII en AC durante la inundación	62
Figura 16. Detección de H ₂ O ₂ mediante tinción con DAB	62
Figura 17. Parámetros de intercambio gaseoso <i>Nr</i> y PRS durante la inundación.....	63
Figura 18. Eficiencia del uso hídrico intrínseco en <i>Nr</i> y PRS durante la inundación	64
Figura 19. Eficiencia de carboxilación en <i>Nr</i> y PRS durane la inundación	64
Figura 20. Eficiencia máxima de carboxilación de la enzima Rubisco.....	65
Figura 21. Azúcares solubles totales <i>Nr</i> y PRS durante la inundación	66
Figura 22. Contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en <i>Nr</i> y PRS durante la inundación.....	66
Figura 23. Contenido de proteínas solubles totales <i>Nr</i> y PRS durante la inundación	67
Figura 24. Actividad proteásica total <i>Nr</i> y PRS durante la inundación	68
Figura 25. Contenido de enzima Rubisco en <i>Nr</i> y PRS durante la inundación.....	68
Figura 26. Niveles de transcripción de <i>CYP1</i> , <i>CYP2</i> , <i>CYP3</i> , <i>RbcL</i> y <i>RbcS</i> en <i>Nr</i> y PRS durante la inundación.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del tomate	11
Tabla 2. Principales componentes de la cadena de señalización del etileno	17
Tabla 3. Efectos fisiológicos a los que se relaciona el etileno	18
Tabla 4. Estrategias para la inhibición del etileno	20
Tabla 5. Condiciones de ciclado para la RT PCR	51
Tabla 6. Secuencia de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real.	52
Tabla 7. Condiciones de ciclado para la PCR en tiempo real.	52
Tabla 8. Eficiencia carboxilativa en <i>Nr</i> y PRS durante la inundación.	65

Publicaciones resultantes de la tesis:

De Pedro, L.F.¹, Mignolli, F.², Scartazza, A.³, Melana, J.⁴, Bouzo, C.A.⁵ y Vidoz, M.L.² (2020). **Maintenance of photosynthetic capacity in flooded tomato plants with reduced ethylene sensitivity.** *Physiologia Plantarum*, 170: 202-217. Doi: 10.1111/ppl.13141

¹Universidad Nacional de Formosa, Facultad de la Producción y del Medio Ambiente. ²Instituto de Botánica del Nordeste, Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Ciencias Agrarias. ³Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri (IRET). ⁴Instituto de Química Básica y Aplicada del Nordeste Argentino (IQUIBA, NEA-CONICET). ⁵ICi Agro-Litoral (UNL-CONICET), Laboratorio de Investigaciones en Fisiología y Biología Molecular Vegetal (LIFiBVe).

De Pedro, L.F.¹, Mignolli, F.², Scartazza, A.⁴ y Vidoz, M.L.^{2,3}. (2018). **Efectos fisiológicos de la inhibición de la percepción de etileno en la mitigación del estrés por inundación en tomate (*Solanum lycopersicum*).** 40° Congreso Argentino de Horticultura.

¹Inst. Universitario de Formosa. Fac. Producción y Medioambiente. UNaF, Formosa. ²Fac. Ciencias Agrarias, UNNE, Corrientes. ³Inst. de Botánica del Nordeste, UNNE-CONICET, Corrientes. ⁴Inst. Biología Agroambiental y Forestal, CNR, Roma.

Efectos fisiológicos de la inhibición de la percepción y síntesis de etileno en la mitigación del estrés por inundación en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

RESUMEN

La producción de etileno induce las principales respuestas fisiológicas durante la inundación en tomate. Sin embargo, elevadas concentraciones de esta hormona pueden desencadenar posteriormente un proceso precoz de senescencia que, con diferentes grados de severidad, afecte la productividad del cultivo y la supervivencia de la planta. El objetivo de esta tesis fue estudiar la relación que existe entre el etileno y ciertos procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan la capacidad de tolerancia al estrés por inundación en plantas de tomate. Para ello, se realizaron distintas experiencias en condiciones controladas de crecimiento donde se compararon, por un lado, plantas de 28 días de edad del mutante *Never ripe* (*Nr*), caracterizado por poseer una sensibilidad reducida al etileno, con su genotipo silvestre Pearson (PRS) y, por otro lado, plantas del cultivar Ailsa Craig (AC) sometidas a la aplicación del inhibidor de la síntesis de etileno aminoetoxi-vinilglicina (AVG) respecto a plantas de AC sin tratar. Los resultados mostraron que las plantas de *Nr* y AC+AVG retuvieron más clorofila y sufrieron una menor fotoinhibición de los centros de reacción del fotosistema II (PSII). La mayor proporción de clorofila *a* en *Nr*, se vinculó con una eficiencia fotoquímica del PSII superior. El aumento de la fracción de la energía disipada por vías no fotoquímicas en *Nr* se relacionó con mayor contenido de carotenoides, mayor relación carotenoides:clorofilas y menor presencia de especies reactivas de oxígeno. Las limitaciones no estomáticas de la fotosíntesis desempeñaron un papel importante en PRS, en correspondencia a una disminución de la actividad de la enzima Rubisco. El aumento de la expresión génica vinculada a enzimas proteolíticas en PRS afectó el contenido de proteínas, especialmente el de Rubisco. Se concluye que la capacidad de conservar los pigmentos, contar con mejores vías disipativas de la energía, menor degradación proteica y mayor actividad y eficiencia de carboxilación por la Rubisco, constituyen los motivos principales por los que las plantas de tomate con menor sensibilidad y síntesis de etileno tendrían una mayor capacidad de tolerar el estrés por inundación.

Palabras claves: inundación del suelo, tomate, fluorescencia de la clorofila, senescencia, never ripe.

Physiological effects of inhibited perception and synthesis of ethylene in the mitigation of flooding stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

ABSTRACT

Ethylene production induces some of the most important physiological responses to flooding in tomato. However, sustained high concentrations of this hormone can trigger an early senescence process that could affect crop productivity and plant survival. The objective of this thesis was to study the relationship between ethylene and the physiological, biochemical and molecular processes that affect the ability of tomato plants to tolerate flood stress. For this, different experiments were carried out under controlled growth conditions where, 28-day-old plants of the *Never ripe* (*Nr*) mutant, characterized by a reduced sensitivity to ethylene, were compared with its wildtype Pearson (PRS). In addition, Ailsa Craig (AC) cultivar plants treated with aminoethoxy vinyl glycine (AVG), an ethylene synthesis inhibitor, were compared with untreated AC plants. The results showed that *Nr* and AC+AVG plants retained more chlorophyll and suffered a lower photoinhibition of the photosystem II (PSII) reaction centers. The highest proportion of chlorophyll *a* in *Nr* was linked to a high photochemical efficiency of the PSII. The increase of the fraction of energy dissipated by non-photochemical pathways in *Nr* was related to a higher carotenoid content, a higher carotenoid:chlorophylls ratio, and lower presence of reactive oxygen species. The non-stomatic limitations of photosynthesis played an important role in PRS, corresponding to a decrease in the Rubisco enzyme activity. The increase in gene expression was linked to proteolytic enzymes in PRS affecting protein content, especially Rubisco. It is therefore possible to conclude that the ability to maintain pigments levels and to have better dissipative pathways of energy, less protein degradation, and greater activity and efficiency of carboxylation by Rubisco, could represent the main reasons why tomato plants with less sensitivity and synthesis of ethylene have a greater ability to tolerate flooding stress.

Key words: soil flooding, tomato, chlorophyll fluorescence, senescence, never ripe.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El tomate

1.1.1. Origen y taxonomía

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 (19), 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. 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 (19). 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. Fue Europa el punto de partida para su reingreso en América, pero esta vez en los países del norte (Estados Unidos y Canadá), siendo actualmente Estados Unidos el tercer productor mundial de tomate fresco, luego de China e India (Figura 1; 57).

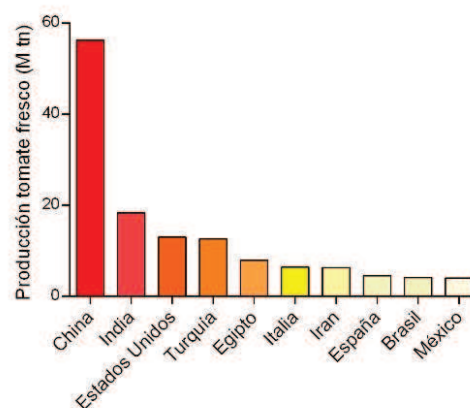


Figura 1. Producción de tomate a nivel mundial. Ranking de los 10 países con mayor producción de tomates frescos (millones de toneladas). Fuente: FAOSTAT, (57) consultado el 1/8/2018.

1.1.2. La planta: descripción botánica y hábitos de crecimiento

El tomate es una especie potencialmente perenne, pero se la cultiva como anual debido a la disminución del rendimiento (cantidad y calidad) luego del primer ciclo productivo. La planta, perteneciente a la familia Solanaceae (Tabla 1), 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 (73), como la tolerancia a ciertos tipos de estrés (184).

El **tallo** es herbáceo, con un diámetro característico de entre 2 y 4 cm, inicialmente erecto y cilíndrico con abundantes pelos glandulares y no glandulares que crecen desde la epidermis y que al romperse liberan un fluido amarillento con olor característico. En un momento comprendido generalmente entre la hoja número 7 y 9 el ápice se transforma en una inflorescencia terminal y la yema lateral, situada en la axila de la última hoja iniciada, se convierte en el nuevo vértice y parece crecer a lo largo del eje inicial al desplazar la inflorescencia a una posición lateral (73). Este patrón de crecimiento simpodial continúa tras cada inflorescencia. En las axilas de las hojas se sitúan además yemas que dan brotes y pueden comportarse como principal, dando a la planta porte arbustivo. A medida que continúa el crecimiento y la planta gana peso, el tallo tiende a volcarse (decumbente o rastrero) y toma forma angulosa (147).

Según el **hábito de crecimiento** del tallo, las variedades comerciales pueden clasificarse en dos grandes categorías: determinados e indeterminados (9). Por definición, todas las cultivares de tomate se considerarían como “determinados”, dando que cada meristema apical termina en una inflorescencia. Sin embargo, ciertas variedades se clasifican como “indeterminados” debido a que continuamente producen unidades simpodiales (94). Estos últimos, se caracterizan por ser plantas de mayores tasas de crecimiento en las yemas vegetativas de las axilas de las hojas, y por conservar siempre su ápice en estado vegetativo, por lo que alcanzan gran altura. Además, poseen un solapamiento importante entre el crecimiento vegetativo y el reproductivo, observándose por lo general 3 hojas en promedio entre racimos consecutivos. A este grupo corresponden generalmente los tomates utilizados para producción en invernaderos (73). Los materiales de hábito determinado son, por el contrario, menos vigorosos, de baja altura (0,7 a 1,0 m) y con menor solapamiento entre fases; en este caso emiten entre 1 y 2 hojas entre racimos. Es común que luego de que la planta genere 3 o 4 racimos el ápice terminal pase al estado reproductivo (racimo terminal) cumpliendo un ciclo total de aproximadamente 100 días; si las condiciones son favorables, la planta puede retomar el crecimiento vegetativo desde un brote axilar. Los tomates determinados se los emplea más a menudo en cultivos a campo, aunque en Argentina también se los utiliza en invernaderos para concentrar la producción en períodos cortos (143).

Las **hojas** compuestas, pinatisectas e irregulares se disponen en forma alterna sobre el tallo con una filotaxia 2/5 (73), y con un número variable de folíolos lobulados (generalmente de 7 a 9). Al igual que el tallo, las hojas están recubiertas por pelos celulares y tricomas glandulares.

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. El ovario súpero puede ser bicarpelar (en el caso de tomates tipo cherry o perita) o pluricarpelar (tomates del tipo redondo), conteniendo numerosos primordios seminales, por lo que producen bayas polispermas. Los carpelos se presentan en posición oblicua con respecto al plano medio de la flor.

El **fruto** es una baya carnosa de superficie lisa o acostillada, cuyos lóculos están cargados de una sustancia gelatinosa que recubre a las semillas a la madurez. Luego de la polinización y fecundación comienza el desarrollo del fruto por procesos de división celular en primer lugar y luego de crecimiento celular. Desde que la polinización ocurre, transcurre un período de entre 6 y 10 semanas hasta la maduración del fruto. La mayoría de las variedades de tomate utilizadas en Argentina son híbridos, y según el tamaño y forma de los frutos se consideran tres principales tipos comerciales: redondo (incluye los denominados tomates “larga vida”), perita y cherry. En la última década la participación promedio de cada tipo comercial en la oferta del Mercado Central de Buenos Aires fue de 62,1 % para el Redondo; 33,6 % para el Perita y 4,2% de Cherry. El color es inicialmente verde, pero a la madurez varía en relación a la naturaleza y proporción de los dos pigmentos principales (licopeno y beta-caroteno) siendo el color rojo el más común, aunque también existen cultivares con frutos de color amarillo, pudiendo ser rojo, amarillo, naranja, violeta o combinaciones de éstos. Son frutos típicamente climatéricos cuyo peso fresco varía según el tipo comercial del que se trate entre 10 y 500 g, de los cuales el 92,5 - 95% está constituido por agua. Las **semillas** son pequeñas, grisáceas, de forma discoidal-lenticular comprimida, con el embrión enrollado y cuyo diámetro es más o menos uniforme, las que se encuentran recubiertas de vellosidades. Su viabilidad promedio es de 3 a 4 años y pueden encontrarse de 290 a 350 semillas por gramo (33).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del tomate según Foolad, (59)

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobinta
Superdivisión	Spermatophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>lycopersicum</i>

1.1.3. Importancia económica del cultivo

Desde el punto de vista económico, el tomate es, luego de la papa, la especie hortícola más cultivada a nivel mundial (73), y se sitúa en el primer lugar dentro de los cultivos que se realizan bajo cubierta. Su consumo es muy popular y constituye un alimento típico en las dietas de las poblaciones de todo el planeta.

Actualmente su cultivo se realiza en muchas partes del mundo y se adapta diferentes modalidades de producción de acuerdo a las características agro-climáticas, sociales, económicas y de mercado de cada región en particular. De acuerdo con los datos disponibles (57) se estima que más del 70% de la producción actual de tomate se concentra en apenas 10 países (Figura 1), entre los cuales China ocupa el primer lugar con más del 60%, seguido por India, Estados Unidos y Turquía.

Debe considerarse que originalmente fue cultivado respetando un ciclo primavero-estival, pero el desarrollo de nuevas técnicas y tecnologías de producción, como el uso de invernaderos y riego por goteo, ha permitido el cultivo fuera de estación para la obtención de primicias, como así también la producción en climas donde la planta no podría desarrollarse naturalmente (desiertos y climas fríos). El mejoramiento genético ha contribuido a que el tomate se posicione entre los alimentos de mayor producción mundial. En el mercado de semillas existe una gran oferta disponible abarcando variedades e híbridos de alto potencial. Además, la genética moderna ha introducido genes específicos para mejorar el comportamiento de la especie ante patógenos, como así también la calidad de la fruta en la post-cosecha (tomates larga vida).

En Argentina, los tipos de sistemas de producción de tomate se diferencian en dos, a campo y bajo cubierta. La producción de tomate a campo puede tener dos destinos, el consumo en fresco o la industria (producción de puré, pulpa y salsas principalmente), mientras que lo que se produce bajo cubierta tiene como principal destino el mercado en fresco. Según el Censo Nacional Agropecuario del año 2002 (últimos datos oficiales disponibles) (126), el 87% de la producción a campo se distribuye entre las provincias de Mendoza, Salta, Jujuy, Río Negro, San Juan, Buenos Aires, Catamarca y Santiago del Estero, y el 87,7% de la superficie cultivada en invernaderos se concentra en Corrientes (53,3%) y Buenos Aires (34,4%). Según el Ministerio de Agroindustria (125), el principal destino de la producción nacional es el mercado en fresco, estimándose un ingreso al Mercado Central de Buenos Aires de unas 120.000 toneladas anuales provenientes de la región NEA (Corrientes), NOA (Salta y Jujuy), Cuyo (Mendoza y San Juan) y Bonaerense (La Plata). Desde ya hace varios años, la producción de tomate para industria viene en crecimiento, adquiriendo actualmente una importancia considerable (entre el 35 y 40% del tomate comercializado), siendo el origen de la mayor parte de esta producción la región de Cuyo, NOA y Río Negro (126).

En la provincia de Formosa, la producción de tomate es mayoritariamente a campo y se concentra en la región productiva Subtropical Norte, conformándose en los últimos años una cuenca tomatera (aproximadamente 200 familias) con centro en la localidad de Laguna Naineck (2).

1.2. Etileno

1.2.1. Historia: la molécula y la hormona

La combustión incompleta de hidrocarburos libera etileno y otras olefinas o alquenos similares, que tienen la particularidad de poseer un doble enlace entre las moléculas de carbono. Este fenómeno fue aprovechado empíricamente desde hace más de un centenar de años por agricultores para la maduración de frutos, la protección de las cosechas y la inducción a floración en muchas especies cultivadas (1). Se debe señalar que el fundamento de estas técnicas y, sobre todo, la presencia y rol del etileno, fue por mucho tiempo desconocido. Tal es así que los primeros indicios del efecto negativo de un gas proveniente de la combustión parcial en lámparas a carbón, se observó por la senescencia y abscisión foliar en plantas dentro de invernaderos y del arbolado público iluminados con éstas. Luego de muchos años de investigación se pudo determinar la presencia de etileno en estos gases de iluminación, y en 1934 R. Gane y sus colaboradores lo estudiaron químicamente, identificándolo como un producto natural del metabolismo de las plantas, que debido a sus importantes efectos sobre los vegetales podía ser clasificado como una hormona (175; 179).

El etileno se caracteriza por su estructura simple, cuyo peso molecular es $28,05 \text{ g mol}^{-1}$, debido a que se trata de una molécula constituida por dos átomos de carbono y cuatro de hidrógeno. A diferencia de las restantes hormonas, se presenta en forma gaseosa a temperatura y presión ambiente. Esto le confiere características particulares como ser la facilidad para difundir libremente por los espacios intercelulares, posibilitando una respuesta generalmente rápida y uniforme, como así también difundir hacia el exterior de la planta constituyéndose en un factor de regulación de su concentración endógena (12). Además, otro modo de regulación de su concentración interna es a través de la velocidad de su síntesis, sin ser necesario un sistema metabólico adicional para limitar la concentración de hormona libre (10). Se considera que los meristemas son unas de las partes de las plantas más activas en la producción de esta hormona, aunque sus efectos se manifiestan durante todo el ciclo de vida, aún a concentraciones extremadamente bajas (10). No obstante, fueron identificados momentos precisos en los cuales se producen incrementos repentinos o “picos” característicos de producción de etileno como ser durante la abscisión de hojas, la senescencia de las flores y la maduración de los frutos. Un efecto típico del etileno es el denominado “triple respuesta” que fue descrito por primera vez en 1901 por Neljubov (179). Este fenómeno, hace referencia a la reducción del alargamiento del tallo, el engrosamiento del hipocótilo y el cambio de orientación del desarrollo generando un gancho plumular cerrado cuando las plántulas se hacen crecer en ausencia de luz y en presencia de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (17), molécula precursora del etileno. Hoy en día esta respuesta es utilizada como criterio de selección de mutantes insensibles al etileno.

1.2.2. Biosíntesis de etileno

En la Figura 2 se esquematiza la vía de biosíntesis de etileno en plantas superiores descrito por Yang y Hoffman (193). El aminoácido metionina es el precursor del etileno, y la formación de S-adenosilmetionina (SAM) a partir de la metionina se considera como la primera etapa de la ruta de síntesis. Esta reacción es catabolizada por la enzima SAM sintasa pero no es específica, ya que se comparte con otras rutas como la síntesis de poliaminas y la transmetilación de lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (10). La posterior conversión de SAM en ACC constituye la primera etapa específica de esta vía y es llevada a cabo por la ACC sintasa (ACS), enzima que, al igual que otras, es dependiente del fosfato de piridoxal (PLP o vitamina B6) el cual constituye un cofactor para su función enzimática (181). La conversión de SAM en ACC por medio de la ACS es considerada como el principal mecanismo regulador de la producción de etileno (65; 193), ya que aun en su fase de máxima actividad la enzima es muy escasa, y posee además una corta vida media. Los niveles de ACS son regulados por factores endógenos y exógenos como ser la presencia de auxinas, el estrés provocado por sequía, enfriamiento, inundación y heridas (65; 175). No todo el ACC se convierte en etileno, también puede ser enzimáticamente transformado en N-malonil ACC (Figura 2), el cual se acumula en vacuolas (65). La etapa final está representada por la oxidación de ACC a etileno mediada por la ACC oxidasa (ACO) enzima que requiere iones hierro y ascorbato para funcionar (181). La ACO tiene alta afinidad por su sustrato y, al ser una oxigenasa, necesita del oxígeno (O₂) para su actividad. Tanto la ACS como la ACO poseen mecanismos de inactivación que servirían como mecanismo bioquímico para limitar la producción de etileno (65). En la primera, la unión de la SAM a su sitio activo origina un compuesto que la inactiva irreversiblemente (inactivación por sustrato o “suicida”), mientras que en la ACO se supone una inactivación catalítica que aún se desconoce precisamente su mecanismo (10; 181).

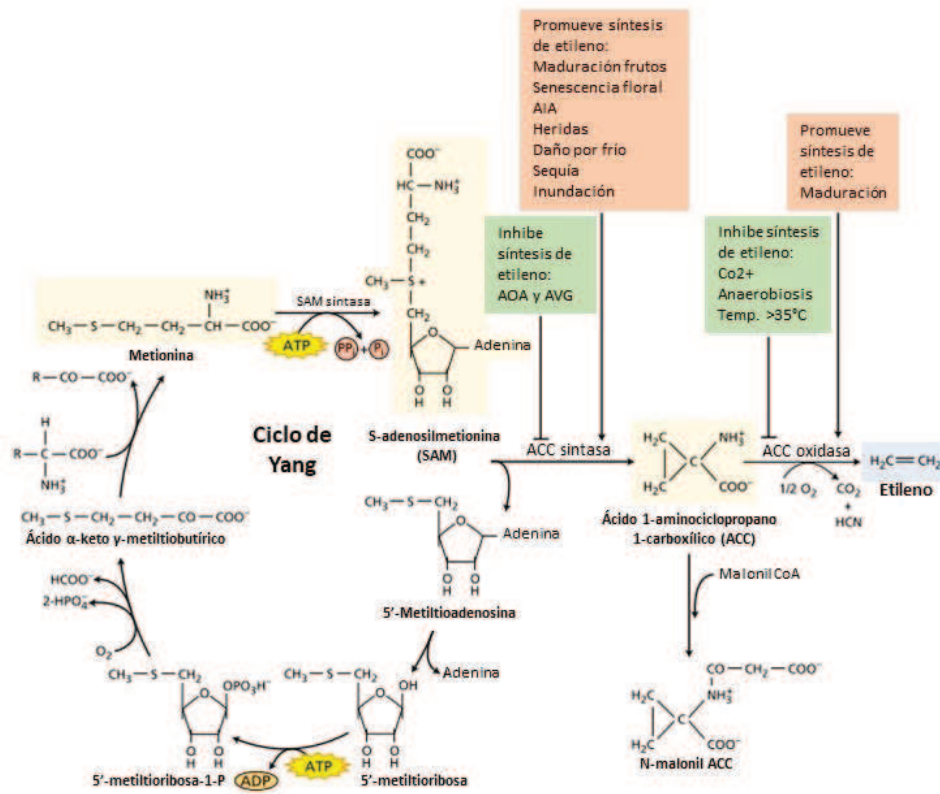


Figura 2. Ruta de biosíntesis de etileno y ciclo de Yang en plantas superiores. AIA, ácido indolacético; AOA, ácido amino-oxiacético; AVG, aminoetoxi-vinilglicina. Adaptado de Taiz y Zeiger, (175).

El denominado “ciclo de la metionina” o “ciclo de Yang” (Figura 2) representa un mecanismo de reciclaje del grupo CH₃-S de la metionina en forma de metiltioadenosina (MTA) y otros intermediarios. El resultado neto del ciclo de Yang es la formación de etileno desde el anillo de ribosa del ATP, mientras que el grupo sulfhidrilo se conserva para regenerar metionina. Esto posibilita mantener una alta tasa de producción de etileno a partir de la disponibilidad de ATP pese a la baja concentración de metionina intracelular (10).

Existe una gran diversidad de factores endógenos y exógenos que estimulan o suprimen la producción de etileno en las plantas. Como se comentó anteriormente, actividad de la ACS es uno de los principales mecanismos de regulación de la síntesis de la hormona (16; 110), y debido a que dicha enzima es codificada por una familia de genes extremadamente grande y muy diferentes entre sí, podría decirse que es un mecanismo complejo y específico. La expresión de los genes que inducen la producción de etileno dependerá, por tanto, de la especie que se trate, situación biológica en la que se encuentre o tipo de estrés al cual esté sometida, confiriéndole a la planta la capacidad de promover diferentes procesos en respuesta a determinado estímulo. Por ejemplo, en tomate, uno o varios genes intervienen en respuesta a las auxinas, otros durante la maduración del fruto y otros por heridas (10). La especificidad de las respuestas al etileno es algo muy interesante

y está siendo todavía estudiado. Por ejemplo, células muy cercanas pueden responder de manera diferente (ej. células que formarán el endosperma mueren, mientras que las del embrión continúan vivas durante el desarrollo de la semilla), o la posibilidad de que coexistan hojas senescentes y otras jóvenes en la misma planta. Existen teorías que permiten explicar algunas de estas cuestiones (179).

El etileno tiene la capacidad de regular su propia síntesis, proceso denominado “autocatálisis del etileno”, un comportamiento característico durante la maduración de los frutos climatéricos o la senescencia de ciertas especies de flores (193). Aparentemente, se produce inicialmente la inducción de la ACO, de manera tal que se incrementan los niveles de etileno sin que esto afecte al nivel de ACC, su precursor metabólico. Posteriormente se estimula la actividad de la ACS, con lo que aumenta el ACC, lo que junto a la previa inducción de ACO, se traduce en un aumento masivo de la generación de etileno (10). En otras ocasiones el etileno puede también atenuar rápidamente su biosíntesis mediante un proceso denominado autoinhibición en donde la inhibición de la ACS, ACO y el contenido de ACC juegan un papel fundamental (10; 193).

1.2.3. Señalización del etileno

La percepción y transmisión de la señal mediada por el etileno es un mecanismo muy estudiado (179), y gran parte de la base de este conocimiento se ha construido mediante numerosos estudios realizados inicialmente sobre familias de mutantes de *Arabidopsis thaliana* cuya sensibilidad y percepción de la hormona veían afectadas (68). Posteriormente se ha extendido a otras especies como el tomate (39; 99). En la Tabla 2 y la Figura 3 se resumen los principales componentes de la cadena de señalización del etileno y su funcionamiento. Además existen revisiones muy completas que podrían ser consultadas para mayor detalle al respecto (10; 37; 39; 98; 112).

Tabla 2. Principales componentes de la cadena de señalización del etileno

Componente	Descripción y funciones	Referencias
ETR1 (ethylene resistant 1)	Primera proteína identificada como receptor del etileno en <i>Arabidopsis</i> . Los mutantes <i>etr1</i> son insensibles al etileno. Análogo a proteínas histidinas-quinasas bacterianas. Se ubican en retículo endoplasmático. Necesitan Cu^{2+} para formar el dímero receptor del etileno. En tomate 7 proteínas: de ETR1 a ETR7 codificadas por genes <i>LeETR1</i> a 7 respectivamente.	(39; 68; 99)
CTR1 (constitutive triple response 1)	Proteínas quinastas, las que interactúan directamente con los receptores ETR y ERS. La mutación <i>ctr1</i> origina un fenotipo que manifiesta de forma constitutiva la respuesta al etileno. La interacción receptor-CTR actúa como un regulador negativo de la ruta de señalización. La unión del etileno a los receptores suprime la inhibición y desencadena la cascada de señalización.	(93; 112; 179)
EIN2 (ethylene insensitive 2)	Proteína integral de membrana. Se encuentra corriente abajo de los receptores y de la unión al CTR. Actúa después del CTR. Los mutantes <i>ein2</i> tienen bloqueadas las respuestas al etileno tanto en estado de plántulas como en plantas adultas. Regula la disponibilidad del factor de transcripción EIN3.	(13; 175; 179)
EREs (ethylene response elements)	Elementos de transcripción que se disponen por debajo de EIN2. Interactúan entre sí en la regulación transcripcional de los genes de respuesta al etileno. Se unen a secuencias concretas de los promotores de los factores de respuesta al etileno (ERF).	(15)
ERFs (ethylene response factors)	Se unen a los promotores de los genes regulados por el etileno, induciendo genes concretos controlando respuestas específicas del etileno. Interactúan con proteínas reguladas por otras hormonas determinando interconexiones hormonales.	(98; 179)

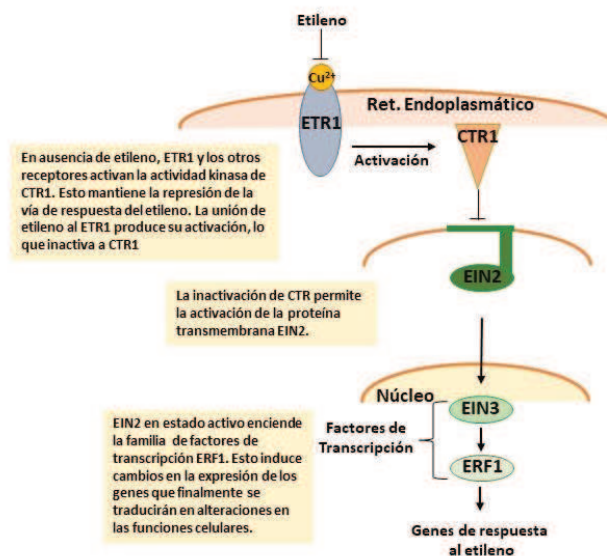


Figura 3. Modelo simplificado de señalización del etileno en *Arabidopsis*. Por simplicidad, solamente se representa el receptor ETR1, pero debe considerarse que son muchas las isoformas de estas proteínas. Adaptado de Taiz y Zeiger, (175).

1.2.4. Funciones fisiológicas del etileno durante el desarrollo de la planta

Los procesos fisiológicos que ocurren durante la vida del vegetal y que están regulados por el etileno son muchos y entre ellos podrían citarse la germinación de semillas, la iniciación floral, la senescencia foliar y la abscisión de órganos (1). Además, el etileno se caracteriza por ser una hormona vinculada a procesos inhibidores del desarrollo y en respuestas al estrés, por lo que resulta clave para los procesos de aclimatación (10). En la Tabla 3 se enlistan algunos aspectos considerados como respuestas generales mediadas por el etileno según diferentes autores. Además de esto, se debe tener en cuenta que la señalización de etileno está sujeta también a interconexiones con las señales de otros reguladores y estímulos (ej. giberelinas, auxinas, ácido jasmónico y luz) donde ciertos detalles aún no se han aclarado (112). Es así que todos estos son fenómenos muy complejos sobre los que aún debe profundizarse el conocimiento para su total comprensión.

Tabla 3. Efectos fisiológicos a los que se relaciona el etileno durante el proceso de desarrollo de las plantas.

Efecto fisiológico	Descripción	Fuente
Ruptura de dormición de semillas	En interacción con otras hormonas y factores ambientales.	(10)
Triple respuesta	Permite a la planta superar impedancias mecánicas durante el proceso de emergencia. En interacción con auxinas.	(17)
Promoción de la expansión radial de raíces	Inhibe crecimiento vertical de raíz mediante un cambio de ordenamiento de microtúbulos de celulosa. Proceso modulado por giberelinas.	(174; 175)
Promueve formación de raíces laterales y adventicias	En interacción con auxinas.	(40)
Inhibe expansión foliar	Inhibe alargamiento celular. En interacción con giberelinas.	(10)
Alargamiento del tallo y pecíolo en plantas sumergidas	A su vez se relaciona con un aumento de giberelinas y disminución del ácido abscísico (ABA).	(83)
Interviene en el proceso de muerte celular programada	Vinculado a procesos de formación de aerénquima, emergencia de raíces adventicias, muerte del endosperma de semillas, senescencia foliar y floral.	(179)
Constituye parte del sistema de defensa de la planta	Inhibición del desarrollo de la enfermedad ante infecciones patogénicas.	(153)
Regula el proceso de senescencia	(Ver apartado 1.4.4. Senescencia anticipada durante la inundación)	(102)
Maduración de frutos	Coordina y uniformiza proceso de maduración. En frutos climatéricos: inducción de genes específicos vinculados a la maduración. Antecede al pico respiratorio. Promueve ciertas ACS (autocatálisis). La aplicación exógena induce cambios madurativos. Frutos no climatéricos: No se produce pico respiratorio. En algunos casos se observó la inhibición de ACS por etileno (frutilla y cítricos).	(10; 17; 39; 116; 177)

1.2.5. Etileno y el control de las respuestas al estrés

En general, cuando las plantas se encuentran frente a diferentes condiciones predisponentes de estrés, tanto por agentes bióticos como abióticos, se ha observado una respuesta típica que implica una mayor producción de etileno, lo que algunos autores denominan “etileno del estrés” (193). En esta situación en particular, y aunque la respuesta suele ser bastante específica, se ha demostrado que la activación de la ACS y la ACO son mecanismos comunes (10). El etileno producido en dichas condiciones está involucrado en la activación de las respuestas al estrés como son la muerte celular, la abscisión, la senescencia y el aumento de la resistencia a enfermedades (39). Como ejemplo de estas respuestas se podría citar la promoción de la acumulación de prolina y el aumento de la actividad del sistema de detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS¹) durante el estrés por sequía (42); la inducción de epinastia² en situaciones de inundación y déficit hídrico (41); y las respuestas de la planta frente al ataque de diversos patógenos, un mecanismo complejo y muy específico de la interacción huésped-patógeno (153), pudiendo en algunos casos inducir la resistencia mediante la promoción de la expresión de proteínas relacionadas a la patogénesis (10) en un efecto combinado con el ácido jasmónico (175).

1.2.6. Inhibidores del etileno

El uso de inhibidores que actúen en diferentes etapas de señalización de las hormonas tiene, y ha tenido, gran importancia para la comprensión de los mecanismos y procesos fisiológicos con los que estos componentes vegetales están relacionados. Concretamente, los inhibidores de etileno, además de su uso con fines científicos, se emplean comercialmente como retardantes químicos de los procesos madurativos de frutos y la senescencia de hojas y flores, manteniendo las propiedades organolépticas y prolongando la vida post-cosecha de los mismos (13). A modo de resumen se presenta la Tabla 4 y una breve descripción de los inhibidores químicos del etileno más comunes.

¹ ROS. Por su acrónimo del inglés: Reactive Oxygen Species.

² La modulación diferencial de la velocidad de crecimiento de las células de la parte ventral del pecíolo respecto a las de la parte dorsal, produce un curvamiento de la hoja hacia abajo (110) disminuyendo la deshidratación foliar en una situación en la cual la conductividad hidráulica de las raíces es muy baja o nula (82).

Tabla 4. Estrategias para la inhibición del etileno. Tomado y modificado de Serek *et al.*, (165).

Proceso – Sitios	Inhibición físico-química	Inhibición molecular
ACC sintasa (ACS)	AVG; AOA; alto CO ₂	ACS antisentido ³ ; co-supresión de ACS
ACC		Expresión de la ACC desaminasa bacteriana
ACC oxidasa (ACO)	CoCl ₂ ; bajo O ₂ ; alta temperatura	ACO antisentido; co-supresión de ACO
Etileno	Ventilación; KMnO ₄	
Receptores	STS; 2,5-NBD; 1-MCP y otros ciclopropanos	Expresión de receptores mutados (ej. <i>etr1-1</i>)
Respuestas	Baja temperatura; citocininas	Expresión del gen bacteriano IPT (alta producción de citocininas)

Para mayor practicidad estos compuestos se podrían agrupar como:

• ***Inhibidores de la síntesis de etileno:***

- Aminoetoxi-vinilglicina (AVG) y Ácido aminoxiacético (AOA): Bloquean la acción de la enzima ACS por lo que se interrumpe la conversión de SAM en ACC. Su modo de acción es poco específico, ya que inhiben a todas aquellas enzimas que posean al fosfato de piridoxal como cofactor (13; 181) y su efecto es parcial porque no suprimen el efecto de etileno exógeno (175). Normalmente el AVG se utiliza en tratamientos pre-cosecha de frutos climatéricos (13) para facilitar el manejo y programación de la cosecha, mejorando la calidad de los frutos y disminuyendo las pérdidas por caída de frutos cerca de la recolección (ej. Retain AVG 15%, Summit Agro, Estados Unidos). El AOA ha tenido mayor difusión como retardante de la senescencia en producción de flores de corte (31; 204).
- Ion cobalto (Co²⁺): Actúa en la última etapa de la ruta biosintética de la hormona bloqueando la conversión de ACC en etileno (20, 27). El Co²⁺ logra la inhibición de la enzima ACO por una competencia con el hierro, un cofactor de esta enzima (24). También se ha reportado que el Co²⁺ inhibe la actividad de la ACS (131).

• ***Inhibidores de la acción del etileno:***

- Ion plata (Ag⁺): Ha sido uno de los primeros inhibidores identificados. Su aplicación se realiza comúnmente en forma de sales como el nitrato de plata (AgNO₃) (100) y el tiosulfato de plata (STS; Ag (S₂O₃)₂³⁻) (183). El efecto de Ag⁺ es muy específico y potente (175) ya que reemplaza al Cu²⁺ en los receptores del etileno (165), bloqueado por tanto la unión con la hormona y el inicio de la señalización. El STS ha tenido gran uso en la conservación de

³ Un ARNm antisentido es un ARNm transcrito que es complementario de un ARNm endógeno; es decir, la hebra complementaria (no codificadora) de una secuencia de ARNm (codificadora). La introducción de un transgen codificante para un ARNm antisentido es usada para bloquear la expresión de un gen de interés.

flores de corte (165), pero su uso es restringido ya puede ser muy tóxico para los humanos y el ambiente.

- 2,5-Norbornadieno o NBD: Inhibidor competitivo del etileno por los sitios del receptor. El NBD está disponible comercialmente, pero su olor desagradable limita su uso. Por otro lado, al ser un inhibidor competitivo (167) requiere estar presente continuamente para contrarrestar los efectos del etileno, por lo que su uso comercial también es limitado (165).
 - 1-Metilciclopropano (1-MCP): Es un potente inhibidor que se une irreversiblemente al receptor del etileno bloqueando la cascada de señalización (165). Esta olefina cíclica (C_4H_6) a temperatura y presión estándar es un gas, inodoro y muy estable, cuyos efectos son importantes a bajas concentraciones debido a la alta afinidad de los receptores, regulando también la producción de etileno mediante la inhibición del proceso autocatalítico (23). Su acción inhibitoria disminuye con el tiempo, a medida que progresa la síntesis de nuevos receptores (13). En el caso del tomate, el 1-MCP disminuye la expresión de los genes que codifican las enzimas ACS y ACO (99). Además, disminuye la expresión génica y actividad de muchas enzimas vinculadas a los procesos degradativos de la maduración de los frutos como poligalacturonasas, endoglucanasas y clorofilasas (38), y aumenta la de los sistemas de defensa y detoxificación de las ROS y del metabolismo de los fenoles (201). Es por ello que su aplicación más común es la conservación de la calidad en post-cosecha de productos fruti-hortícolas y flores de corte (13; 165). Posee también un uso muy difundido con fines de investigación, siendo un recurso importante para el estudio en fisiología vegetal (4; 50).
- **Oxidantes del etileno:**
- Permanganato de potasio ($KMnO_4$): Fuerte agente oxidante que reacciona con el etileno, y lo oxida produciendo H_2O , CO_2 , MnO_2 y KOH (191). El $KMnO_4$ disminuye los niveles de etileno en la atmósfera y para un mejor efecto en aplicaciones para el control de la maduración de frutos climatéricos necesita un vehículo (zeolita, vermiculita o perlita) al cual se adsorbe y aumenta su área de contacto (13).

1.2.7. Tomate mutante insensible al etileno Never ripe

Uno de los mayores avances en el estudio de las hormonas vegetales ha sido el desarrollo de mutantes para un solo gen y la comprensión de su acción molecular (149). Esto ha permitido determinar los efectos fisiológicos de las hormonas, sus rutas de biosíntesis y los mecanismos mediante los cuales se perciben y transmiten sus señales, como así también la interacción con otros reguladores del crecimiento. En el caso del etileno, los primeros mutantes fueron desarrollados en *Arabidopsis* y se los ha clasificado en dos grupos (175): los mutantes resistentes al etileno o insensibles al etileno, aquellos que no responden al etileno exógeno, por lo que no exhiben la denominada “triple respuesta”; y aquellos que sí la presentan incluso en ausencia de

etileno, conocidos como mutantes constitutivos. El tomate no estuvo al margen de estos avances y la investigación génica en esta especie, como por ejemplo desarrollo de mapas génicos, bibliotecas génicas y mutaciones, ha progresado muchísimo respecto a otras Solanáceas como la papa y el tabaco. Según Emmanuel y Levy (54), para el año 2002 el CM Rick Tomato Genetic Resource Center de la Universidad de California (Estados Unidos) contaba ya con 978 mutaciones monogénicas en tomate.

Puntualmente para las mutaciones sobre genes relacionados al etileno en tomate, las mismas podrían ser clasificadas en dos grandes grupos: aquellas con alta producción de etileno, como por ejemplo la mutación *epi* (*epinastic*) (138); y otras donde la producción de etileno es baja o normal, pero muchos de los procesos con los que se relaciona esta hormona se inhiben. En este segundo grupo (17) propusieron una división en función de su capacidad para sintetizar etileno durante la maduración, como así también, de la capacidad del etileno para restablecer la expresión génica relacionada con la maduración. Por un lado se ubicarían los loci "*rin*" (*ripening-inhibitor*) (152), "*nor*" (*non-ripening*) (178) y "*Cnr*" (*Colorless non-ripening*) (99), los cuales regulan el efecto del etileno únicamente sobre la maduración de los frutos. En éstos hay una baja producción de etileno y no hay aumento de la síntesis durante la maduración, manteniéndose un nivel basal. Al tratar los frutos con la hormona se induce parte de la expresión génica regulada por ella pero sin afectar a la maduración (69; 95; 116). El segundo grupo corresponde a las mutaciones que poseen una reducida sensibilidad al etileno en la mayor parte de la planta. La mutación *Nr* (*Never ripe*) (110; 151) caracteriza a este grupo, pudiéndose citar también a *Gr* (*Green-ripe*) y *Nr-2* (*Never-ripe 2*) (17; 14; 99).

El genotipo mutante *Nr* es capaz de producir etileno, pero cuya capacidad para percibir la hormona endógena, o suministrada exógenamente, se encuentra reducida (39; 110; 194) lo que impide que se desarrolle normalmente el proceso de señalización relacionado. Esto se debe a una mutación semi-dominante en el gen *LeETR3* (comúnmente denominada como *NR*) el cual codifica el receptor de etileno *LeETR3* o *NR*, lo que resulta en una menor sensibilidad general de la planta a dicha hormona. En este genotipo se muestran efectos pleiotrópicos de la baja sensibilidad al etileno en todos los tejidos de la planta, desde la inhibición de la triple respuesta, como así también la ausencia de epinastia y menor senescencia floral, evidenciada por la permanencia de la corola luego de la polinización y durante el crecimiento de los frutos (17; 99; 110; 194). En plantas de tomate normales, el tratamiento de las flores con etileno exógeno produce el desarrollo de la zona de abscisión del pedicelo y consecuente aborto floral. Sin embargo, se observó que este fenómeno es sustancialmente retrasado en los genotipos *Nr* (110). Los frutos de *Nr* producen etileno durante la maduración, pero la expresión de los genes asociados a este proceso se reduce enormemente (151; 194) y no puede restablecerse mediante tratamiento con etileno exógeno (110). Al ser una mutación que se manifiesta en la planta entera, su uso es muy difundido en el ámbito de la

investigación para estudiar el efecto del etileno en un gran número de procesos fisiológicos (39) y situaciones de estrés (67; 184; 185).

1.3. Estrés en las plantas

En condiciones óptimas para el crecimiento, las plantas pueden completar su normal desarrollo y generar las estructuras que le permitan establecer su descendencia en el momento adecuado de su ciclo de vida. Este desarrollo resulta de la relación entre su genotipo y el ambiente, cuestión de gran importancia en el caso de aquellas plantas que se cultiven con un interés comercial, a los fines de que las mismas puedan expresar su potencial genético de rendimiento. Sin embargo, este potencial raramente es alcanzado debido a que, normalmente, tanto en condiciones naturales como en sistemas agrícolas, las plantas están expuestas a factores del ambiente variables que constantemente determinan condiciones sub o supra-óptimas que repercuten en su desempeño, desencadenando una serie de alteraciones a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y molecular que finalmente alteran el desarrollo y rendimiento de la planta (101; 119; 139; 175). Estas tensiones que afectan a las plantas, en fisiología vegetal se conocen con el nombre de **estrés**, pudiendo ser tanto de origen **biótico** como **abiótico** (10). Este concepto de estrés, es definido como el efecto de un factor externo que ejerce una influencia desfavorable en la planta (139; 175). En el caso del estrés biótico, el mismo resulta del efecto fisiológico provocado por el ataque de insectos plaga que produzcan daños directos o indirectos, infecciones patogénicas que generen enfermedades, y/o la presencia de malezas que representen una competencia por recursos. Por su parte, el estrés abiótico puede ser de diferente naturaleza, incluyendo aspectos relacionados a los factores climáticos y edáficos. Entre los factores climáticos capaces de generar una situación estresante para las plantas se pueden citar la ocurrencia de temperaturas extremas (altas y bajas), la disponibilidad de agua en el suelo (exceso o déficit), la luz (sombreamiento, sobre-exposición, daños inducidos por rayos UV) y la calidad de la atmosfera (altos niveles de ozono O₃ a nivel superficial, por ejemplo) (101; 118; 129; 203). El suelo también puede condicionar el normal crecimiento de una planta debido a la presencia de sales en exceso, deficiencia o exceso de nutrientes, o la incapacidad para un correcto drenaje del agua de las precipitaciones y riegos excesivos (101). Por lo general, en la naturaleza los estreses abióticos resultan de una combinación de factores climáticos (ej. alta temperatura y sequía) o climáticos y edáficos (ej. excesivas precipitaciones y drenaje deficiente) (129; 172).

Muchas especies se presentan como tolerantes a determinado estrés, y dicho concepto hace referencia a la capacidad o aptitud de la planta para hacer frente al mismo. Esta tolerancia se corresponde a procesos de aclimatación y/o adaptación (139; 175). La aclimatación se refiere a cambios no heredados (ni heredables) que se dan en un organismo en particular ante una situación estresante; mientras que la adaptación involucra cambios que se dan en una población de

individuos y que por presión de selección son genéticamente heredables (109). Estos cambios que contribuyen a la tolerancia al estrés resultan de la integración compleja de eventos que ocurren a diferentes niveles de organización en la planta, desde el nivel anatómico y morfológico, celular, bioquímico y molecular (139; 203).

1.3.1. Importancia del estudio del estrés

El estudio del estrés en las plantas vegetales tiene actualmente un rol preponderante en muchos grupos de investigación de todo el mundo. El cambio climático y los modelos de predicción alertan sobre un aumento de la frecuencia de los eventos climáticos extremos (119; 129; 139). Esto determina la necesidad de conocer mejor la manera en que las plantas detectan y responden a los estímulos del ambiente, con el fin de dirigir el conocimiento generado para la obtención de genotipos con mejores desempeños productivos en estos posibles escenarios desfavorables (118). La comprensión de la base genética de la variación de la tolerancia, y de los genes y procesos subyacentes, constituye un enfoque poderoso y prometedor para generar conocimientos que finalmente sean transmitidos a los cultivos, con el fin de mejorar la tolerancia a las condiciones de estrés biótico o abiótico (129; 145).

1.4. Estrés por inundación del suelo

Una de las consecuencias más evidentes del cambio climático está dada por el aumento de las precipitaciones (Figura 4A), que concomitantemente con el fenómeno de deshielo, son las principales causas de las inundaciones (108; 139).

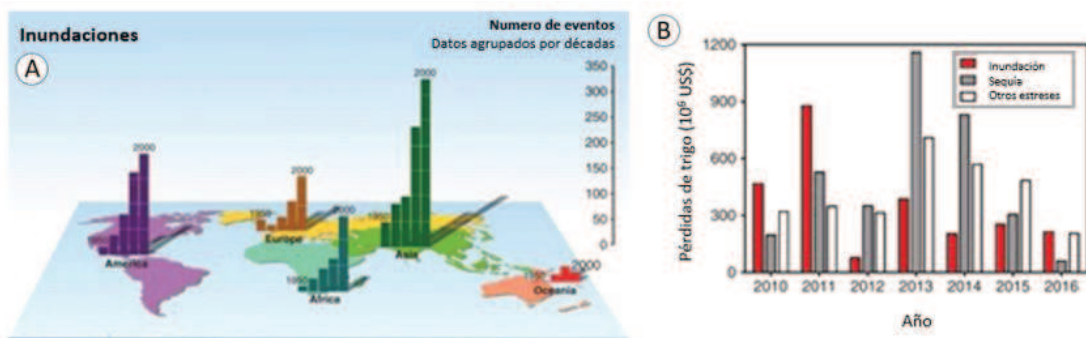


Figura 4. Impacto de las inundaciones sobre la agricultura a nivel mundial. A. Número de inundaciones por década desde 1950; B. Pérdidas anuales en la producción de trigo por inundaciones y otras razones. Tomado y adaptado de Pedersen *et al.*, (141).

En el caso de las regiones tropicales y sub-tropicales de muchas partes del mundo, la inundación del suelo es un problema importante para la supervivencia de las plantas y representa uno de los estreses abióticos más comunes que afectan negativamente su crecimiento y productividad, conduciendo a la muerte de las mismas en muchas oportunidades (7; 85; 141; 189). En promedio

la superficie del planeta expuesta a inundaciones todos los años es de más de 17 millones de km² (188), y el escenario futuro no es alentador. Los modelos de predicción del cambio climático advierten un incremento en la frecuencia de los eventos de inundación a nivel global, haciendo de dicho estrés una de las principales amenazas para la producción de alimentos (141; 145; 171). 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, mientras que muchos humedales (zonas principalmente rurales) están sujetos a inundaciones más frecuentes (188). Sumado a todo lo anterior, se prevé que el aumento demográfico y la expansión de las grandes urbes, exigirán la incorporación de tierras marginales a la agricultura, lo que obliga a la necesidad de obtener cultivos altamente productivos en tierras poco aptas que podrían estar sometidas a eventos periódicos de exceso de agua, como así también introducir nuevas especies tolerantes a inundaciones (171).

Cuando se analiza cuantitativamente el impacto del estrés, las consecuencias evaluadas en términos económicos indican pérdidas millonarias (Figura 4B). A nivel mundial se estiman daños del orden de los 60 mil millones de euros cada año (188). Sólo en los Estados Unidos, en el año 2011 las pérdidas de producción debidas a la inundación de los suelos representaron el 30% de las pérdidas totales del rendimiento agrícola, mientras que los pagos de seguros superaron los 3.000 millones de dólares (12).

En los últimos 5 años, en Argentina se han observado episodios de inundación en áreas agrícolas que han afectado a diferentes regiones productivas con distintos grados de severidad y perjuicios. Por ejemplo, en el año 2015 las precipitaciones registradas en el mes de agosto en Marcos Juárez (Córdoba) fueron un 445% superior a la media histórica, un 322% para Dolores (Buenos Aires), un 243% en San Miguel y un 143% en La Plata (80) lo que provocó la saturación e inundación del suelo. En el año 2017 se reportaron más de 10 millones de ha en el centro del país que fueron afectadas por la inundación, estimándose pérdidas de 1.140 millones de dólares (21). En el año 2019, el norte del país (provincias de Salta y Formosa) también ha sido escenario de esta catástrofe que perjudicó la producción y economía de la región, además de haber generado un importante impacto social. En el caso particular de la producción de tomate en la provincia de Formosa, ya son varios los años en los cuales las inundaciones han tenido efectos perjudiciales sobre el cultivo. El caso más reciente se presentó a principios de 2019, en donde las precipitaciones de marzo, abril y mayo, meses en los que se inician los cultivos de tomate a campo en la cuenca productiva de la provincia, han superado en un 36,8%, 66,5% y 55,2% las medias históricas de los últimos 10 años, respectivamente (CEDEVA, 2019, comunicación personal). Esto ocasionó pérdidas totales en muchos lotes, como así también importantes fallas en el establecimiento del cultivo. Tal fue la importancia de los daños ocasionados por el exceso hídrico, que desde el Gobierno Provincial (Decreto Provincial N° 151/19 del Poder Ejecutivo Provincial), con homologación a nivel

nacional (Resolución Oficial Nacional N° 308/2019 del Ministerio de Producción y Trabajo), se ha decretado la situación de emergencia agropecuaria (127).

Entre los cambios que se producen en suelos inundados se destacan la disminución del potencial redox (171), el descenso del pH incrementando la solubilidad de iones tóxicos y disminuyendo la disponibilidad de ciertos nutrientes, y la reducción de la concentración de oxígeno (76; 104). Este último proceso se debe a una disminución neta en la difusión de los gases en agua de alrededor de 10^{-4} veces y al consumo del oxígeno remanente por parte de los microorganismos presentes en el medio edáfico (12), lo que genera un ambiente hipóxico en la zona radical en un corto período de tiempo (7). Estas condiciones propician una marcada reducción en la tasa respiratoria radicular, limitando así la producción de ATP en las raíces. Esta situación tiene como consecuencia la afectación de diferentes procesos fisiológicos que requieren de energía, como ser la absorción activa de nutrientes. De esta manera se inicia un estado crítico para la planta en donde la inhibición de ciertos procesos metabólicos limita el crecimiento, conduciendo en última instancia, a la muerte de las plantas.

1.4.1. Flooding, Waterlogging y Submergence

En el estudio del estrés por inundación, es importante distinguir entre los conceptos a los que hacen referencia las palabras de lengua inglesa “*flooding*” y “*waterlogging*”. Tal diferenciación se basa en el nivel que alcanza el agua que satura el suelo respecto a la parte del vegetal que se encuentra inmersa en ella (Figura 5). En el caso del anegamiento o *waterlogging* (Figura 5A) todos los poros del suelo están cargados con agua, pero esta no forma una capa sobre la superficie del mismo, o en caso de existir, es muy delgada. Como es de suponer, en tales condiciones solo las raíces de la planta se encuentran en anaerobiosis. A diferencia del caso anterior, la inundación o *flooding* implica la presencia de una capa de agua (poco profunda o profunda) sobre la superficie del suelo, por lo que además de las raíces, una porción de la parte aérea se encuentra inmersa en el agua (Figura 5B). El escenario más extremo de inundación sería la inmersión completa de la planta o “sumersión” (136; 159) (Figura 5C), en donde se limita al máximo la posibilidad de capturar oxígeno atmosférico y fijar carbono (189), a lo que generalmente se le suman limitaciones lumínicas debido al espesor de capa de agua y su turbidez (171) .

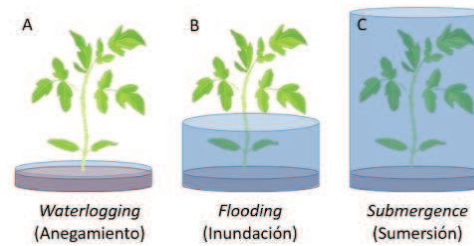


Figura 5. Diferentes niveles de estrés por inundación. A. *waterlogging* o anegamiento; B. *flooding*, inundado o sumersión parcial; C. *complete submergence*, sumersión completa.

1.4.2. Alteraciones metabólicas y morfo-fisiológicas, relacionados al estrés por inundación

En condiciones de exceso de agua, los suelos se saturan y por lo tanto se generan condiciones de hipoxia, es decir, deficiencia de oxígeno en el mismo. La razón por la cual ocurre este fenómeno, es en primer lugar debido a que el aire del suelo es desplazado por el agua, siendo el oxígeno remanente absorbido con rapidez por los microorganismos edáficos y por las mismas raíces (189). Además, el coeficiente de difusión del oxígeno (medido en $\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$) en un suelo saturado resulta varias veces menor a un suelo sin exceso de agua (171). La drástica disminución de la disponibilidad de O_2 en los tejidos vegetales sumergidos es uno de los efectos más graves a los que una planta inundada está expuesta (141). En primer lugar, la privación de oxígeno en las raíces provoca el cese de la actividad respiratoria, lo que acarrea un déficit energético en los tejidos sumergidos (113). En tales condiciones es común que la planta recurra a vías alternativas para la obtención de energía pero de menor eficiencia como la fermentación (12), evidenciado por el aumento de la actividad de enzimas fermentativas como la alcohol deshidrogenasa o ADH (185). Se ha descubierto que en algunas especies también existen mecanismos para optimizar el consumo de energía durante la inundación mediante una restricción general en el metabolismo y crecimiento celular (quiescencia), como por ejemplo la activación de ciertas enzimas que utilizan pirofosfato inorgánico en lugar de ATP para su funcionamiento (12; 182). Existe además una estrategia de escape del ambiente hipóxico, en donde se produce un rápido alargamiento de los tallos o hojas sumergidas cuyo resultado implica que el tejido fotosintético retome contacto con la atmósfera (12; 118). Aparte de la estrategia anterior, las plantas suelen presentar en condiciones de exceso de agua otras modificaciones de carácter morfo-fisiológico. Entre éstas se pueden citar la formación de aerénquima y raíces adventicias (11; 184).

A diferencia de las especies mejores adaptadas a estas condiciones, la mayoría de los cultivos de importancia económica presentan una marcada susceptibilidad a este tipo de estrés. Las consecuencias son muy variadas y dependen de la especie, edad de la planta y duración del estrés principalmente. A modo orientativo, un esquema de respuesta genérica podría ser la siguiente: la pérdida de funcionalidad de las raíces conduce al cierre estomático y por ende afecta al intercambio gaseoso y a la fotosíntesis. A su vez, se producen cambios en las relaciones fuente-destino, que junto a la menor absorción de nutrientes y producción de fotoasimilados,

desencadenan el inicio de un proceso de senescencia anticipada y remobilización de nutrientes desde los órganos más viejos de la planta hacia aquellos más jóvenes y de mayor actividad (22; 70; 104; 137; 171). En el caso particular de tomate, la inducción de la senescencia foliar prematura, la disminución del área foliar, la caída de la tasa fotosintética y la reducción de la producción de biomasa vegetativa y reproductiva, como así también el menor rendimiento del cultivo, dan cuentas claras de que se trata de una especie extremadamente sensible a la inundación (3; 22; 25; 53; 76). En cultivos no tolerantes, la inundación puede comprometer seriamente el rendimiento. Los efectos negativos del exceso de agua sobre los componentes del rendimiento han sido ampliamente descritos en la literatura, ejemplo de ello son los trabajos de San Celedonio *et al.*, (162) en trigo y cebada; el de Rao y Li (148) en legumbres, tomate, sorgo, maíz, batata, calabaza, pimiento y espárragos con reducciones del rendimiento en torno al 50% en la mayoría de ellos, y el de Kumar *et al.*, (107) en poroto mung (*Vigna radiata*) donde se observó una reducción del rendimiento del 52% a causa del estrés. Existen estudios llevados a cabo en tomate que han demostrado la manera en que este tipo de estrés afecta negativamente el rendimiento, con repercusiones principales sobre el número de flores, la cantidad y el peso de los frutos (55). La limitación de la actividad fotosintética resulta ser uno de los principales determinantes en la reducción del número de pimpollos florales, el aborto de flores y pequeños frutos, y el menor peso final de los mismos en tomate (76).

1.4.3. El etileno y la inundación

El etileno es la principal hormona vegetal implicada en diferentes respuestas de las plantas a condiciones de hipoxia (11). Es así que su síntesis se incrementa en situaciones en donde exista una baja tensión de oxígeno, ya que con valores menores de 12,5 kPa y hasta 3,0 kPa se favorece su síntesis, teniendo múltiples efectos en las plantas. Trabajos pioneros realizados en girasol (90) y en maíz (48) permitieron contar con las primeras evidencias del rol del etileno como molécula de señalización capaz de inducir las respuestas adaptativas durante la inundación. Hoy en día ya se tiene mayor precisión en la manera en que se produce la transducción de la señal mediada por el etileno en dichas condiciones (56; 182; 187). En muchas especies, la síntesis de etileno aumenta rápidamente durante la sumersión (171; 187). En hojas de plantas de tomate inundadas, la producción de etileno está estrechamente correlacionada con la acumulación de ACC en las raíces. De acuerdo con el modelo descrito por Jackson (82), en plantas de tomate sometidas a inundación el ACC se produciría en las raíces en pocas horas y sería transportado hacia la parte aérea de la planta a través del xilema. En las hojas, donde hay cantidades suficientes de oxígeno, se realizaría la conversión de ACC a etileno mediante la acción de la ACO (181). Esta rápida e importante producción de etileno en las hojas fluctúa entre el día y la noche durante las primeras 48 horas e, incluso después de cinco y diez días de iniciada la inundación, los niveles de etileno liberados por las hojas aún se mantienen consistentemente elevados en tomate (166).

La unión del etileno a sus receptores inicia una cascada de señales capaces de desencadenar diversas respuestas adaptativas durante el anegamiento (65; 187). Como se mencionó anteriormente, la inundación del suelo ocasiona el mal funcionamiento de las raíces, lo que normalmente conduce a la muerte de una gran parte de estas (187). El desarrollo de un nuevo sistema de raíces adventicias es crucial, ya que permite sustituir a las raíces originales que se pierden en condiciones de hipoxia (163; 186) restituyendo la conductividad hidráulica y la absorción de nutrientes (55; 76; 171). En arroz, la emergencia de las raíces adventicias es debida a la muerte celular programada de células epidérmicas inducida por el etileno. En tomate la producción de raíces depende también del etileno, el cual favorecería la acumulación de auxina en la parte basal del tallo sumergido estimulando de esta manera la formación de primordios radicales adventicios (184). Se ha demostrado que la emisión de raíces adventicias en tomate contribuye a la reapertura estomática durante la inundación (53) lo que permitiría restablecer el intercambio gaseoso en las hojas, proceso que, como se verá más adelante, normalmente se interrumpe durante este tipo de estrés en especies sensibles. De esta manera podría suponerse entonces que la producción de raíces adventicias mediada por el etileno en plantas de tomate inundadas mejora la tolerancia al estrés y su recuperación posterior (22; 55; 79; 105; 107).

Otra adaptación interesante es la formación de aerénquima comentado anteriormente, la cual consiste en la formación de cavidades o espacios aéreos en los mismos tejidos del parénquima que pueden tener distintos orígenes (171). Estos espacios aéreos forman un sistema continuo de baja resistencia para el transporte de oxígeno entre raíces y tallos, permitiendo la difusión y el intercambio de gases entre la parte de la planta en condiciones aeróbicas y aquella que se encuentra sumergida (48; 85; 171). En el caso de plantas de tomate inundadas, se ha demostrado que el etileno desempeña un rol importante en la formación de aerénquima lisígeno (por muerte celular programada) y en la hipertrofia en la zona cortical del tallo, en donde la acumulación de la hormona podría causar un aumento de la lisis celular a través de la activación de celulasas (91; 92; 185). Este concepto encuentra también estrecha relación con lo que propone (49) en su modelo sobre los mecanismos implicados la muerte celular programada y la formación del aerénquima lisígeno. En este proceso también están implicados el Ca^{2+} y ciertas ROS (12).

En condición de sumersión, la acción del etileno favorece el alargamiento del tallo hasta retomar contacto con el aire. En estas situaciones la hormona mediaría el catabolismo (arroz) o reduciría la síntesis (*Rumex* sp.) del ácido abscísico aumentando de esta manera la respuesta (arroz) o la biosíntesis de giberelinas (*Rumex* sp.) que a su vez estarían involucradas en la expansión de las células del tallo (11).

Como último aspecto podría mencionarse que el anteriormente comentado incremento de la actividad fermentativa (actividad ADH) en las partes sumergidas de plantas inundadas, parece estar regulada, al menos en parte, por el etileno en el caso del tomate (185). Esta sería una manera

por la que el etileno favorecería la mantención del metabolismo en el ambiente hipóxico mediante una producción mínima de energía.

1.4.3.1. Efecto perjudicial del etileno en plantas afectadas por la inundación

A pesar que el etileno juega un rol central en las respuestas de aclimatación a la inundación, el aumento excesivo de su concentración podría tener efectos negativos que comprometan la tolerancia a dicho estrés (60). Existen en la actualidad muchos trabajos en los cuales, mediante el uso de inhibidores del etileno y plantas transgénicas, se ha demostrado un efecto perjudicial de esta hormona durante la inundación y anegamiento en diferentes especies vegetales (50; 65; 66; 137). En girasol, por ejemplo, se sugirió que existiría una estrecha relación entre los daños debidos al estrés por inundación y la síntesis de etileno (90). Además, se observó que la tolerancia de ciertos cultivares de arroz a la inundación completa, en término de menor clorosis foliar, menor actividad y expresión de la enzima clorofilasa, estaría asociada a una menor sensibilidad al etileno (50). Más recientemente, ensayos con algodón sometido a estrés por exceso hídrico, demostraron que el etileno era responsable de una menor asimilación de nitrógeno y actividad fotosintética, y mayor abscisión de frutos (137). En tomate se asume que el aborto de flores y frutos pequeños en estas condiciones de estrés posiblemente estén relacionadas al etileno (76).

Este efecto dual del etileno puede explicarse según un modelo descrito por Gepstein y Glick, (63). Los autores consideran que un incremento abrupto de etileno al comienzo del estrés es el responsable de la activación de todas las respuestas de tolerancia/resistencia de la planta, y que un segundo incremento de mayor importancia, debido a la síntesis *de novo* de ACC, iniciaría los procesos negativos como la senescencia, clorosis y abscisión.

1.4.4. Senescencia anticipada durante la inundación

Las plantas bajo estrés abiótico desarrollan mecanismos de protección donde, una de las respuestas primarias es la inhibición del crecimiento vegetativo, desviando los recursos hacia funciones relacionadas con la aclimatación al estrés. Entre las diversas respuestas que desarrollan en estas situaciones se encuentra la inducción de la senescencia, un mecanismo que podría contribuir a la supervivencia en condiciones ambientales adversas (63; 132). La senescencia es, por lo general, la última etapa del programa de desarrollo de una planta y normalmente termina con la muerte de células, de un órgano o de todo el organismo. Este proceso está asociado, por lo menos en parte, con un reciclaje de los nutrientes, los cuales son transportados desde las células senescentes hacia otras partes de la planta, tales como brotes, primordios florales, frutos en crecimiento y órganos de almacenamiento (61; 103; 175). Durante el proceso normal de la senescencia de una hoja, la actividad catabólica reduce la actividad fotosintética, hecho que incluso en condiciones óptimas de crecimiento representa una limitación en la productividad de una planta.

El etileno es el principal inductor de la senescencia foliar (103) siendo capaz de regular el nivel de clorofila en todas las hojas, incluidas las que están lejos de entrar en el programa de senescencia, e incluso aquellas que están con máxima función fotosintética (35; 199). Generalmente, altas tasas de producción de etileno se asocian a la degradación de clorofilas, proteínas, membranas y otros componentes celulares (3; 18; 35; 103; 146; 179; 199). La degradación de la clorofila caracteriza las etapas iniciales del proceso de senescencia (30) y está regulada por genes de la catálisis de la clorofila (CCG), los cuales se ven inducidos durante la señalización desencadenada por el etileno (50; 146). El uso de mutantes y plantas transgénicas ha sido clave para comprender el rol del etileno en este aspecto (87; 179), pero se debe remarcar que en la mayoría de los experimentos de este tipo no ha sido posible impedir o bloquear completamente el inicio de la senescencia foliar, sino más bien se consiguió un retraso de la misma respecto a sus tipos silvestres (mismo genotipo sin la mutación) (67; 110; 179). Esto indicaría que el etileno regula el momento de inicio de la senescencia, pero una vez que esto ocurre, el proceso se desarrolla casi normalmente (87). En el caso del tomate, la sobreproducción de etileno tiene efectos claros sobre las tasas de senescencia ya que mediante una menor síntesis y sensibilidad a la hormona se ha logrado retrasar el inicio y/o velocidad de este proceso (87; 110). El simple hecho de poder retrasar el inicio de la senescencia podría suponer un importante impacto sobre el rendimiento de los cultivos (199).

Al igual que muchos otros procesos fisiológicos, la senescencia está regulada por factores endógenos y ambientales. En condiciones de estrés, la senescencia prematura determina una reducción adicional en la producción cuantitativa y cualitativa de una planta (29). La función del etileno durante la senescencia inducida en condiciones desfavorables ha sido demostrada en varios trabajos realizados en condiciones de sequía (199), altas temperaturas (46), altas concentraciones de O₃ (67), e inundación (50).

En el proceso de reciclaje de nutrientes que ocurre durante la senescencia foliar, el nitrógeno y el carbono tienen una importancia relevante, siendo los cloroplastos la principal fuente de éstos. En suelos anegados, la senescencia foliar prematura es una consecuencia de una disminución del contenido de clorofila y proteínas solubles en las hojas (7; 70; 196; 197). La proteína del cloroplasto está constituida mayoritariamente por las enzimas del estroma, principalmente ribulosa 1,5-bisofato carboxilasa oxigenasa (Rubisco) y los complejos pigmento-proteínas de las membranas de los tilacoides, representados por los centros de reacción (RC) y las antenas cosechadoras de luz (LHC) (64; 77; 175). El etileno es capaz de inducir la degradación proteica durante la senescencia (35), especialmente de la Rubisco (3). Durante la senescencia ocurre un fuerte incremento de la actividad enzimática degradativa de proteínas (18). Las enzimas cisteín-proteasas constituyen uno de los grupos de proteasas más estudiados en las plantas debido al papel que desempeñan en la senescencia y la muerte celular programada. CYP1, CYP2 y CYP3, son tres cisteín-proteasas que son reguladas positivamente por el etileno durante el proceso normal de

senescencia foliar en tomate (47); y se ha observado también una importante inducción de algunas de ellas durante el estrés por anegamiento (3). Este incremento de estas enzimas podría vincularse de igual manera a un aumento del etileno, no obstante su relación en estas condiciones debería ser confirmada. Se ha demostrado que durante la senescencia foliar de tomate, el aumento en la concentración de etileno y de la expresión de la ACO, coinciden con una reducción de la expresión de los genes que codifican para la producción de clorofilas y genes específicos relacionados a la fotosíntesis como el *RbcS* (*Rubisco small subunit*) que codifica para la sub unidad más pequeña de la Rubisco (47; 87). Se considera que además de la fuerte actividad enzimática degradativa, la sobreproducción de ROS podría ser la principal responsable de la senescencia foliar durante el estrés por anegamiento o inundación, afectando principalmente las membranas celulares y los niveles de Rubisco y Rubisco activasa (3).

1.4.5. Absorción de agua y nutrientes durante la inundación

En las especies sensibles como el tomate, pocas horas después de iniciada la inundación del suelo, tanto por anegamiento como por inundación, se reduce la absorción de agua de la planta (26), siendo esto atribuido a una disminución de la conductividad hidráulica de las raíces (51; 52). Dicho fenómeno ha sido estudiado por muchos autores en varias especies vegetales (6; 70; 155), habiéndose propuesto que este comportamiento es atribuible a una disminución del pH citoplasmático a raíz del incremento en la concentración de CO₂ y la inhibición de la actividad de las acuaporinas en las membranas celulares. Las respuestas que se generan en la planta a partir de ese momento son variables y dependen de la especie que se trate (171). Un modelo general propuesto involucra al cierre de los estomas y la consecuente disminución de la tasa transpiratoria, siendo éstas las consecuencias más inmediatas (26; 72). En tomate esta respuesta tiene como consecuencia el mantenimiento de la turgencia de los tejidos (53; 76).

En tales condiciones se han registrado además notables disminuciones en la absorción y translocación de nutrientes minerales esenciales desde el suelo en plantas de algodón (137), trigo (176; 180) y alfalfa (169). Algunos autores proponen que en las raíces hipóxicas/anóxicas, la baja producción de ATP limita la absorción activa de nutrientes, lo que posiciona a la redistribución de los minerales en la planta en un papel esencial para la supervivencia (137). En plántulas de trigo a tan solo dos días de inundación, se observó una redistribución de nutrientes minerales móviles como el nitrógeno, desde las hojas más viejas hacia brotes jóvenes, lo que, si bien contribuye a aliviar en parte el estrés por la falta de nutrientes en la parte superior de la planta, favorece sustancialmente la promoción de la senescencia prematura en las hojas inferiores (180). La pérdida de actividad en las raíces, ocasiona que la traslocación de fotoasimilados entre fuentes y destinos, se vea también perjudicada.

1.4.6. Cierre de estomas e intercambio gaseoso durante la inundación

El rápido cierre de estomas durante la inundación es una respuesta típica en muchas especies como árboles tropicales (71; 72); soja (140); cebada (198); maíz (8); alfalfa (168) y tomate (22; 25; 53; 76). Esta respuesta se evidencia principalmente a través de una reducción de la conductividad estomática (g_s). Sin embargo, el mecanismo por el cual esto ocurre aún no se encuentra del todo dilucidado. Algunas hipótesis posibles desde el punto de vista de los cambios a nivel hormonal, involucraría principalmente al ácido abscísico (ABA) que se transporta hacia la parte aérea desde las raíces (7; 70), aunque otros autores descartan esta posibilidad (155). En el caso de plantas de tomate inundadas, no se encontró relación entre la menor g_s y el transporte de ABA, giberelinas y citocininas desde las raíces, ni con la depresión temporal del potencial hídrico en las hojas (ψ_h), mientras que la pérdida de función de la señalización de la raíz parecería ser uno de los motivos principales del cierre estomático en esta especie (53).

El cierre de estomas en plantas inundadas tiene principalmente dos consecuencias, donde una de ellas se relaciona con la economía hídrica de la planta y otra con el intercambio gaseoso. La primera se debe a la disminución de la tasa transpiratoria (E) (22; 25; 53) e incremento temporal de ψ_h (53). Estos procesos podrían constituir un mecanismo útil para evitar la deshidratación de los tejidos y la pérdida de turgencia del vegetal en una situación donde la condición anaeróbica de las raíces reduce su permeabilidad y conductividad hidráulica, disminuyendo consecuentemente la absorción y movimiento del agua en la planta (76). A pesar de ello se debe considerar que, de no revertirse esta respuesta inicial de protección, podrían acontecer efectos perjudiciales para la planta, ya que la segunda consecuencia del cierre estomático es la restricción del intercambio de gases entre la hoja y la atmósfera limitando la disponibilidad de CO_2 para la fotosíntesis (53; 70; 135). A esto se denomina comúnmente “limitación estomática de la fotosíntesis”. Por esta razón algunos autores proponen que mantener los estomas abiertos durante la inundación podría constituir un mecanismo adaptativo para sostener altas tasas de intercambio gaseoso en tales condiciones (5; 22; 78; 150; 154; 201).

1.4.7. Fotosíntesis e intercambio gaseoso durante la inundación

La afectación de la fotosíntesis puede darse en cuestión de horas o días, dependiendo de la tolerancia al estrés de cada especie (171; 195). En tomate por ejemplo, la reducción de g_s ocurre a la pocas horas desde el inicio de la inundación (25; 53) y afecta negativamente a la actividad fotosintética (53), demostrando la gran sensibilidad de la especie a este tipo de estrés (22). La ocasional reducción de la fotosíntesis (caída de la tasa de asimilación neta del carbono, A) por efecto de la inundación es común en muchas especies vegetales como algodón (137); maíz (197); árboles (72; 150); melón (195); soja (135); poroto (107) y tomate (22), siendo los mecanismos implicados en dicha disminución de muy variada naturaleza. Aún hoy se considera que se sabe

muy poco sobre la respuesta fotosintética a la inundación (201), pero podría ser considerado como un factor que pone en riesgo las posibilidades de supervivencia de la planta (123).

Según Striker (171) y Ashraf (7) las causas principales de la caída de A pueden resumirse en: cierre estomático, reducción del contenido de clorofila, reducción de la actividad carboxilativa de las enzimas y daños oxidativos en el fotosistema II (PSII). Aparentemente, durante las primeras horas de estrés las limitaciones estomáticas son la principal causa de la reducción de A (198), mientras que tras períodos más prolongados se alterarían las reacciones bioquímicas relacionadas a la fotosíntesis (34). Estas últimas se engloban dentro de las “limitaciones no estomáticas” de la fotosíntesis. Herrera *et al.*, (72), observaron que la caída de g_s en árboles de terrenos frecuentemente anegables explica solamente en parte la reducción de A . En algunas especies sensibles a la inundación la caída de A se corresponde con altas concentraciones intercelulares de CO_2 (C_i), a pesar de la reducción de g_s (113), evidenciando posibles restricciones en la eficiencia de carboxilación (dA/dC_i), sin que las limitaciones estomáticas tengan un único y dominante efecto sobre la caída de A (5; 196; 197; 201). Un ejemplo de ello es lo que ocurre en algodón durante el anegamiento del suelo, donde la reducción de A se debe tanto al cierre estomático como a causas no estomáticas y metabólicas que afectan la difusión de los gases, la bioquímica de la fotosíntesis y el rendimiento cuántico del PSII (137). En tomate también se ha reportado la disminución dA/dC_i y alta C_i cuando los estomas se encontraban cerrados, indicando la existencia de limitaciones no estomáticas de A durante la inundación (53).

Las limitaciones del tipo no-estomáticas durante la inundación pueden tener diferentes orígenes, pero se relacionan generalmente a la disminución en la actividad ($V_{c_{\max}}^4$) y abundancia de la Rubisco (3; 70; 113; 142). Se ha propuesto que la degradación de Rubisco y Rubisco activasa⁵ debido a una elevada actividad proteolítica (degradación enzimática) o el estrés oxidativo producido por alta producción de ROS, sean las responsables de la disminución de A vinculada a la senescencia foliar durante la inundación en tomate (3) y otras especies (171; 197). La cantidad y actividad de Rubisco en estas condiciones podría también verse limitada debido a la baja disponibilidad de N y otros nutrientes para su regeneración, producto de la inactividad de las raíces (3; 70; 86; 96; 197). Adicionalmente, la inhibición de los genes vinculados a la síntesis de la Rubisco podría ser otra causa de su disminución (47; 87). En este aspecto, existen evidencias que en hojas de tomate la síntesis de Rubisco y Rubisco activasa se encuentran negativamente reguladas durante la inundación (3).

⁴ $V_{c_{\max}}$: Tasa máxima de carboxilación (58). Una estimación o medida indirecta de la actividad de la enzima Rubisco. Se obtiene a partir del tramo lineal de la curva de respuesta de A a la C_i que se corresponde a bajas concentraciones de CO_2

⁵ Enzima cuya función es la de mantener a la Rubisco en estado activo mediante la remoción de grupos azúcares fosfatos de su sitio activo, los cuales podrían bloquear la unión al sustrato o impedir la carboxilación (3; 175). La activasa funciona como chaperona molecular, cambiando la conformación de Rubisco de inactiva (cerrada) a activa (abierta) y su actividad depende de la disponibilidad de ATP, por ende, de la luz (160)

Otra limitación a la fotosíntesis en plantas de tomate inundadas viene dada por una reducida capacidad de regenerar ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP)⁶, la cual podría estar vinculada a una baja disponibilidad de fósforo inorgánico (P_i) producto de la inhibida absorción de nutrientes por parte de las raíces (25). También la disminución del pH en los cloroplastos por la gran producción de fosfoglicerato (PGA), producto de los altos niveles de CO₂, puede interrumpir la formación del complejo Rubisco-CO₂-Mg²⁺ necesario para el equilibrio entre las reacciones de carbamilación y descarbamilación de la enzima (113). También existen trabajos que relacionaron la inhibición de la Rubisco con la acumulación de carbohidratos solubles (106).

Cuando se analiza lo que ocurre a nivel de la totalidad de una planta, puede observarse una disminución en la tasa de crecimiento de plantas bajo condiciones de exceso de agua, lo que ocasiona una menor demanda de triosas fosfato para la síntesis de sacarosa y la disminución del transporte del azúcar por floema. De esta manera se inicia una acumulación de almidón en las hojas que se traduce como un “feedback negativo” sobre la tasa fotosintética (171). Los desacoples y daños a los componentes del PSII y la cadena transportadora de electrones también son causas limitantes de *A* durante el anegamiento (197). En el caso del mutante enano de tomate Micro-Tom se observó que una de las principales causas de la disminución de *A* durante la inundación son los desacoples e inhibiciones que tienen lugar en el PSII, afectando algunos de los principales parámetros de la fluorescencia de la clorofila (79), donde además el etileno podría estar limitando estos procesos (46).

1.4.8. Fluorescencia de la clorofila durante la inundación

La luz es el elemento clave en la producción primaria, pero sin un sistema eficiente de transferencia/transformación, el exceso de energía luminosa puede resultar muy peligroso, provocando daños oxidativos debidos a la producción de ROS (164), situación común cuando las plantas se encuentran sometidas bajo algún estrés abiótico. En condiciones de inundación, la producción de ROS puede sobrepasar la capacidad de detoxificación⁷ de las plantas y generar daños oxidativos en las proteínas, peroxidación lipídica y pérdida de estabilidad de las membranas del aparato fotosintético (197).

Los parámetros de la fluorescencia ofrecen información sobre el estado y funcionamiento de los principales componentes del aparato fotosintético de la planta y la manera en que los distintos estreses ambientales pueden afectarlo (121). La mayor parte de las reacciones que emiten fluorescencia se llevan a cabo en el PSII, siendo dicho componente muy sensible a diferentes tipos de estrés⁸ (79; 134; 157). Por este motivo, la fluorescencia de la clorofila *a* constituye una

⁶ J_{max} : Velocidad máxima de transporte de electrones (58). Una estimación o medida indirecta de regeneración de RuBP. Se obtiene a partir del tramo de la curva de respuesta de *A* a la C_i que se corresponde a altas concentraciones de CO₂. Se vinculada al funcionamiento de la cadena de transporte de electrones, la síntesis de NADPH, ATP, y el ciclo reductivo de las pentosas fosfato.

⁷ Denominado también sistema *scavenging*

⁸ Ante desbalances energéticos es propenso a oxidar pigmentos y aminoácidos o formar ROS debido a su elevado potencial de oxidación (157)

herramienta de gran importancia para la detección temprana de los efectos perjudiciales del estrés sobre el vegetal (121).

Las inundaciones provocan grandes perturbaciones en los parámetros de la fluorescencia de la clorofila (5; 7), y esto se relaciona al deterioro progresivo de la maquinaria fotosintética donde, posiblemente, la pérdida de clorofila y proteínas condicionen la eficiencia de los complejos cosechadores de luz, dando inicio a un desbordamiento de electrones y deterioro severo en la cadena de transporte electrónico (22). Se considera que la caída de los parámetros de intercambio gaseoso A y g_s durante la inundación podría inducir foto-inhibición en algunas especies (70; 150). La limitada disponibilidad de CO_2 para la fotosíntesis en plantas de tomate inundadas, afecta también la eficiencia fotoquímica del PSII (53). Esta imposibilidad de canalizar el poder reductor en la fijación de CO_2 podría además ser una de las razones por la cual se incrementa la producción de ROS durante la inundación en tomate (3; 7). La reducción de la eficiencia fotoquímica máxima (F_v/F_m) y la eficiencia fotoquímica actual de fotosistema II (Φ_{PSII})⁹ durante la inundación ha sido reportada en trabajos previos realizados en distintas especies (5; 70; 150; 168; 200), incluyendo también al tomate (22; 53; 55; 79), pudiendo constituir una importante limitación (no estomática) de la fotosíntesis (5; 201). Kläring y Zude (97) han sugerido que las modificaciones de los patrones de fluorescencia durante la hipoxia radical en tomate son indicios de limitaciones en los centros de reacción del PSII y en tasa de transporte de electrones. El etileno podría tener un efecto indirecto sobre el decaimiento de F_v/F_m durante el estrés producto de la inducción a la senescencia anticipada, tal como fue reportado en soja durante el estrés hídrico (46).

La reducción de F_v/F_m y Φ_{PSII} en situaciones de estrés puede ser indicativo de la existencia de un daño oxidativo, como así también reflejando un incremento de los mecanismos de fotoprotección, lo que reduciría la eficiencia fotoquímica del PSII¹⁰. La disipación térmica de la energía a través del *quenching*¹¹ no fotoquímico (NPQ) es considerado el mecanismo regulatorio más importante, inmediato y eficiente del excedente energético en el PSII protegiéndolo de la fotoinhibición¹² (157; 202). Su incremento durante el estrés es común y se ha visto en muchas especies sometidas a períodos de inundación (5; 168). En plantas de tomate inundadas se encontró que el NPQ aumenta gradualmente desde el inicio del estrés (53). La posibilidad de que el NPQ aumente en sincronía con la disminución del *quenching* fotoquímico (disipación de la energía mediante reacciones bioquímicas de la fotosíntesis) favorece a la planta con mejores posibilidades de sobreponerse a las condiciones estresantes, mientras que de no existir dicha respuesta podría indicar una deficiencia en la fotoprotección (150). En algunas oportunidades se ha demostrado

⁹ Por más información consultar revisiones de Maxwell y Johnson (121) y Murchie y Lawson (2013)

¹⁰ La energía proveniente de la des-excitación de la Chl *a* puede seguir tres vías diferentes: la vía fotoquímica (fotosíntesis), la disipación en forma de calor (NPQ) o su re emisión en forma de luz (fluorescencia). Estas tres vías son competitivas entre ellas, por lo que un aumento o disminución en cualquiera de estas fracciones implica una disminución o aumento en las otras respectivamente.

¹¹ El término inglés "*quenching*", se traduce al español como "enfriamiento" o "extinción", haciendo referencia en este caso a un mecanismo útil para la disipación de la energía en el fotosistema.

¹² Tipo de estrés oxidativo que genera daños celulares afectando el normal funcionamiento del fotosistema (121) y, en casos más severos, causa la degradación de sus componentes.

que especies tolerantes a la inundación han mantenido altos valores de F_v/F_m , Φ_{PSII} y NPQ durante el estrés (70; 201), por lo que dichos parámetros también son útiles para validar mecanismos de tolerancia a estas condiciones críticas del ambiente. Por ejemplo, en el caso del tomate, la menor reducción de F_v/F_m es indicador de una mejor tolerancia a la inundación (22; 55).

Las variaciones en la capacidad fotosintética y en los mecanismos de disipación de la energía se relacionan estrechamente con las diferencias en la composición de pigmentos de las hojas. Las modificaciones en la relación entre el contenido de clorofila *a* (Chl *a*) y el contenido de clorofila *b* (Chl *b*) (expresado mediante el índice Chl *a/b*) constituye un mecanismo de adaptación frente a diferentes tipos de estrés (96; 128; 164). El análisis de la composición de clorofilas por medio de Chl *a/b* da la posibilidad de realizar inferencias sobre los cambios conformacionales que suceden en el fotosistema en respuesta al estrés con el propósito de balancear la captación, conducción y disipación de la energía que llega a través de la luz¹³, evitando así potenciales daños del excedente energético en condiciones donde la maquinaria fotosintética no se encuentra en condiciones óptimas de funcionamiento. En algunas especies el índice Chl *a/b* se relaciona positivamente con Φ_{PSII} y F_v/F_m (120; 164). En el caso de la alfalfa se ha reportado la disminución de Chl *a/b* durante la inundación (168).

La capacidad NPQ de las plantas posee estrecha relación con el contenido y composición de los carotenoides (45; 164). Los carotenoides evitan la activación del oxígeno, protegiendo así los complejos de clorofila-proteína de la foto-oxidación y se considera que sin la protección ejercida por estos pigmentos se produciría una destrucción rápida y completa de los fotosistemas (173).

1.4.9. Balance de carbohidratos durante la inundación

La composición de carbohidratos, su partición y la función que desempeñan durante la inundación varían entre diferentes especies vegetales y el momento de la vida de la planta en la cual se produce la inclemencia. En algunas especies arbóreas, por ejemplo, se ha señalado que la tolerancia a la inundación se relaciona con la capacidad de las raíces de acumular azúcares (70; 150). Los estudios realizados en plantas concuerdan generalmente en un aspecto fundamental, la pérdida de funcionalidad de las raíces sumergidas, principalmente la inhibición de la respiración aeróbica, provoca que dicho órgano resienta su capacidad como destino, interrumpiéndose el flujo de savia en la planta y pudiendo ocasionar una acumulación de azúcares y almidón en las hojas (8; 22; 70; 150). La presencia de una elevada concentración de azúcares en la parte aérea de plantas en suelos inundados parece tener una relación directa con la capacidad de supervivencia de las mismas (70; 118). Bhatt *et al.*, (22) han propuesto que los carbohidratos que se acumulan en hojas de tomate durante la inundación le confieren a la planta mayor tolerancia al estrés,

¹³ Los cambios en Chl *a/b* sugieren una modificación de la estructura y el funcionamiento del aparato fotosintético en base a que la Chl *a* se localiza principalmente en los centros de reacción y antenas de ambos fotosistemas, mientras que Chl *b* está más bien restringida a los sistemas de captación de luz (120).

cumpliendo funciones como osmoreguladores, moléculas de señalización, reguladores metabólicos y/o fuentes de energía.

La osmoregulación durante la inundación pareciera constituir un mecanismo de adaptación efectivo en muchas especies frente a condiciones estresantes, ya que en varias ocasiones la disminución del potencial osmótico (ψ_s) en las hojas debido a la acumulación de azúcares, se relacionó positivamente con la mayor capacidad de tolerancia a dicho estrés (22; 70).

La función de los azúcares como moléculas de señalización considera la posibilidad de que la caída de A en situaciones de hipoxia radical esté controlada por un mecanismo de retroalimentación donde la alta concentración de carbohidratos en las hojas sea una señal para inhibir las reacciones de carboxilación en una situación donde la actividad de los destinos está fuertemente limitada (8; 190). En determinadas ocasiones se ha observado que altas concentraciones de azúcares solubles se han correlacionado con la represión y regulación negativa de genes de la fotosíntesis, como los que codifican las enzimas CAB y Rubisco, mientras que por otro lado han mejorado la capacidad de detoxificación de radicales libres que podrían generar estrés oxidativo por ROS (62; 161). El rol de los azúcares como metabolitos de señalización aún no están del todo esclarecidos y podrían constituir una interesante vía de regulación metabólica junto a las hormonas (117).

Que los carbohidratos acumulados en las hojas durante la inundación puedan ser utilizados para el mantenimiento del metabolismo tiene sus fundamentos considerando que, ante la reducción de la fotosíntesis neta, la planta se vale de las reservas y la pobre producción de fotoasimilados para mantener funcional el metabolismo. La progresiva falta de oxígeno en el suelo cumple la función de señalización e inducción de la acumulación de carbohidratos en la parte aérea para “preparar” a la planta ante un inminente período de estrés (70). La retención de azúcares podría permitir mantener el crecimiento de la parte no sumergida del vegetal tras la reducción de A en plantas de tomate (22).

2. HIPÓTESIS

El etileno producido por las plantas de tomate durante la inundación del suelo y la sumersión parcial de sus tejidos en agua, induce los procesos involucrados en la senescencia foliar anticipada.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares involucrados en una mayor tolerancia al estrés por inundación en plantas de tomate con menor sensibilidad o síntesis de etileno.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Estudiar la aparición de síntomas de senescencia en plantas de tomate inundadas.

3.2.1.1. Analizar los parámetros fisiológicos asociados a la senescencia foliar.

3.2.1.2. Medir los cambios bioquímicos y moleculares debidos al progreso de la senescencia en hojas.

3.2.2. Determinar las respuestas fisiológicas a la inundación en plantas de tomate inhibiendo la síntesis endógena de etileno.

4. METODOLOGÍA

4.1. Experimentos realizados con el mutante *Nr*

Con el objetivo de evaluar el efecto de una menor sensibilidad al etileno en la senescencia foliar de plantas de tomates sometidas a la inundación, se analizaron una serie de parámetros fisiológicos y moleculares relacionados con dicho proceso en plantas del mutante *Never ripe (Nr)* y de su genotipo salvaje Pearson (PRS). Como ya se mencionó anteriormente, el mutante *Nr* posee una mutación en uno de sus receptores del etileno (LeETR3) por lo que los efectos de la hormona se ven reducidos. Estas pruebas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste) y en el laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Ciencias Agrarias, Alimentarias y Agro-ambientales de la Universidad de Pisa (UNIPi, Italia).

4.1.1. Primera experiencia con *Nr*: Evaluación visual del progreso de la senescencia foliar durante la inundación

4.1.1.1. Material vegetal y condiciones experimentales

Se trabajó con plantas de PRS (accesión LA0012) y *Nr* (accesión LA0162) de 28 días de edad. Esta edad permite trabajar con plantas que ya poseen un número suficiente de hojas maduras para evaluar la respuesta al estrés. A su vez, su tamaño posibilita la realización de los ensayos en cámaras de crecimiento (condiciones controladas), metodología comúnmente utilizada en trabajos de fisiología vegetal (144). Las plantas fueron obtenidas por siembra en germinador. Los germinadores consistieron en placas de Petri de vidrio con papel absorbente en su interior sobre el cual se distribuyeron uniformemente las semillas (Figura 6A). Las placas fueron regadas con abundante agua destilada y posteriormente cerradas. La germinación se realizó en cámara climatizada a 26 ± 2 °C, 60% humedad relativa (HR), fotoperíodo de 15 h de luz y una irradiancia de $116 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ (lámparas fluorescentes). Transcurridos 7 días desde la siembra se realizó el trasplante a contenedores de plásticos de 250 cc (vasos de polietileno con orificios en la base para permitir el drenaje) con una mezcla de sustrato hortícola comercial (94-99% turba, Dynamics 2, Agri Service, Buenos Aires, Argentina) y perlita en una relación 2:1 respectivamente, y se regó con agua de red hasta el punto de saturación, evidenciado cuando comenzó el drenaje de agua por el orificio inferior (Figura 6B). Las plantas crecieron en cámara climatizada en condiciones controladas de temperatura, humedad y luz (26 ± 2 °C; 60% HR; fotoperíodo de 15 h y $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ de irradiancia emitidas por lámparas de sodio de alta presión). A fin de asegurar el correcto estado nutricional de las plantas se realizaron riegos diarios con solución nutritiva de Hoagland y Arnon (74) durante las tres semanas anteriores al inicio de la prueba.

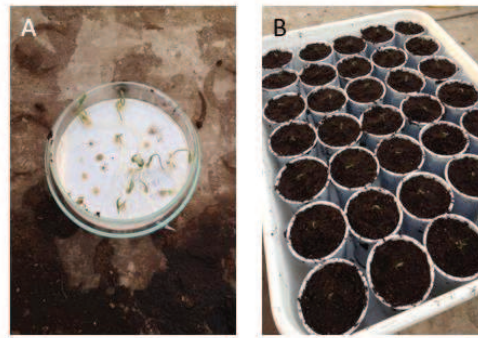


Figura 6. Establecimiento del experimento con las plántulas de tomate. A. Detalle de una de las placas de Petri utilizada para la germinación, en donde se observa el estado que presentan las plántulas de tomate a los 7 días desde la siembra; B. Aspecto de los contenedores de 250 cm³ de volumen en donde se observa el estado que presentaron las plantas recién trasplantadas.

Para la inundación (*flooding FL*), las plantas en sus respectivos contenedores, fueron introducidas en recipientes transparentes individuales (vasos de polietileno transparentes de 1 L). La simulación experimental de la inundación, se realizó manteniendo el nivel del agua durante toda la prueba 15 mm por encima del nudo cotiledonar. Para lograr que las plantas permanezcan sumergidas, fueron sujetadas individualmente al recipiente por medio de una varilla plástica y cinta adhesiva (Figura 7). Las plantas control (C) se mantuvieron a capacidad de campo regándolas regularmente con la misma calidad de agua utilizada para el tratamiento de inundación. La duración de cada experimento fue de 6 (seis) días, contando como 0 (cero) desde el momento que se realizó la sumersión de las plantas. A fin de evitar un posible efecto de la variación de la intensidad de la radiación lumínica en las diferentes zonas de la cámara, las plantas fueron intercambiadas de posición cada dos días.



Figura 7. Esquema del sistema utilizado para realizar el tratamiento de inundación (IBONE, UNNE, Argentina) en plantas de tomate de 28 días de edad.

4.1.1.2. Obtención de las muestras y análisis estadístico

El diseño experimental utilizado se corresponde al tipo completamente aleatorizado con 5 individuos por tratamiento ($n = 5$). Se evaluó el contenido relativo de clorofila (SPAD) con un dispositivo portátil SPAD-502 (Konica Minolta, Osaka, Japón) mediante mediciones matutinas (entre las 9:00 y 11:00 h) llevadas a cabo cada 2 días desde el inicio de la inundación (DDI) (0, 2, 4 y 6 DDI) sobre la primera hoja completamente desarrollada (tercera hoja, contando como 0 el nudo cotiledonar). Este criterio se tomó como regla para todas las experiencias siguientes. Al

finalizar la experiencia (6 DDI) se realizó un corte de las hojas más representativas de cada tratamiento y se fotografiaron para la apreciación visual del estado de senescencia foliar.

Para el análisis estadístico de los datos de SPAD se utilizó el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos), mediante análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. También fue realizada una prueba de comparaciones múltiples por Tukey ($P < 0,05$; $n = 5$) para evaluar la diferencia entre fechas de muestreo para cada tratamiento (2 vs. 4 vs. 6). Se utilizó la prueba t de Student para comparaciones entre tratamientos (C vs. FL) y entre genotipos (*Nr* vs. PRS) ($P < 0,05$; $n = 5$).

4.1.2. Segunda experiencia con Nr: Evaluación de parámetros fisiológicos y moleculares relacionados a la senescencia

4.1.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

Se trabajó con plantas de PRS (accesión LA0012) y *Nr* (accesión LA0162) de 28 días de edad (contados desde la siembra), las cuales fueron obtenidas por siembra en germinador. Los germinadores consistieron en bandejas de aluminio de 144 x 119 x 44 mm (515 cc) con papel absorbente en su interior sobre el cual se distribuyeron uniformemente las semillas. Las bandejas fueron regadas con abundante agua destilada y cerradas con bolsas de polietileno de alta resistencia de 230 x 320 mm de color transparente. La germinación se realizó en cámara climatizada a 26 ± 2 °C, 60 % HR, fotoperíodo de 15 h de luz y una irradiancia de $116 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ (lámparas fluorescentes). Transcurridos 7 días desde la siembra se realizó el trasplante de las plántulas a contenedores de plástico negro de 520 cm^3 con una mezcla de sustrato comercial (99% turba, Hawita Flor, Vechta, Alemania) y perlita (Agrilit 3, Perlite Italiana, Milán, Italia) en una relación 2:1 respectivamente. Las plantas crecieron en cámara climatizada en condiciones controladas de temperatura, humedad y luz (26 ± 2 °C; 60 % HR; fotoperíodo de 15 h y $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ de irradiancia emitidas por lámparas de sodio de alta presión). A fin de asegurar el correcto estado nutricional de las plantas se realizaron riegos diarios con solución nutritiva Hoagland y Arnon (74) durante las tres semanas anteriores al inicio de la prueba.

El tratamiento de inundación (FL) se llevó a cabo en contenedores plásticos transparentes con un volumen de 22 L (390 mm x 280 mm x 280 mm), con cuatro plantas en el interior de cada uno (Figura 8). Para simular las condiciones de inundación el nivel del agua se mantuvo durante toda la prueba 15 mm por encima del nudo cotiledonar. Para lograr que las plantas permanezcan sumergidas se ideó el sistema esquematizado en la Figura 9. La maceta que contenía cada planta fue a su vez introducida en otra de igual tamaño que contenía en su fondo, un espesor de 1 cm de piedras (canto rodado) en su interior (Figura 9A) para impedir la flotación. Ambas macetas se mantuvieron unidas por cinta de papel adhesiva, y para evitar que la parte aérea de las plantas quede introducida completamente en los contenedores plásticos transparentes, donde la variación de las condiciones climáticas podía ser importante respecto al resto de la cámara, cada maceta

individual fue apoyada sobre otra de iguales dimensiones, pero invertida y situada en el fondo del contenedor (Figura 9B). Las plantas correspondientes al tratamiento control (C) se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales y fueron mantenidas a capacidad de campo regando diariamente con la misma agua del tratamiento inundado. La duración del experimento fue de 6 días, contando como día inicial desde el momento comenzó la sumersión de las plantas. A fin de evitar el posible efecto de la variación de la intensidad de la radiación en las diferentes zonas de la cámara, los contenedores fueron cambiados de posición cada dos días.



Figura 8. Tratamiento de inundación (UNIPi, Italia). En cada contenedor se colocaron 4 plantas de tomate de 28 días de edad. El nivel de agua se mantuvo 1,5 cm por encima del nudo cotiledonar.

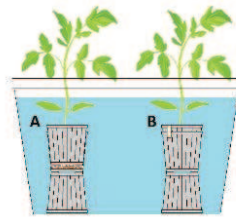


Figura 9. Esquema de sistema utilizado para realizar el tratamiento de inundación (UNIPi, Italia) en plantas de tomate de 28 días de edad. A. detalle de piedras en maceta para mantener a las plantas en sumersión; B. detalle de sujeción y sistema de elevación de macetas.

4.1.2.2. Obtención de las muestras y análisis estadístico

El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorizado con 8 repeticiones para cada tratamiento ($n = 8$). En el caso de las determinaciones que requerían la destrucción del material vegetal, a los 6 DDI se realizó el muestreo foliar para posteriormente analizar: pigmentos foliares, carbohidratos no estructurales, proteínas solubles, actividad proteásica total y expresión génica. Para ello se utilizó una tijera para deshojar y separar los folíolos de cada hoja. Con un sacabocados de 9 mm de diámetro (aproximadamente 10 mg de peso fresco por disco) se tomaron las muestras del folíolo apical para pigmentos y proteínas (una muestra por planta), mientras que para expresión génica, se apilaron los folíolos apicales de todas las plantas y se realizó un muestreo compuesto (tres muestras compuestas por tratamiento) con un sacabocados de 4 mm de diámetro. Las muestras para la determinación de pigmentos fueron tratadas en el momento (material fresco), mientras que para el resto de análisis fueron guardadas inmediatamente en freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las metodologías utilizadas para cada determinación se detallan a continuación.

4.1.2.2.1. Análisis de pigmentos foliares

Con el objetivo de estudiar la senescencia foliar considerando la pérdida de pigmentos, se analizaron los contenidos de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), clorofila total (Chl (*a+b*)) y carotenoides totales (Car). Para ello se siguió la metodología propuesta por Caser *et al.*, (32) modificando proporcionalmente las cantidades de material vegetal y reactivos utilizados para adaptarlo al uso de microtubos de reacción. Para ello se cortó y pesó un disco foliar de 9 mm diámetro (10 mg aproximadamente) con un total de cinco repeticiones por tratamiento. Inmediatamente fueron colocados en tubos plásticos de reacción con tapa de un volumen de 1500 μL y se agregaron 1000 μL de metanol al 99,8 %. Las muestras fueron colocadas en cámara fría a 4 °C, manteniéndolas en oscuridad y agitación constante durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron diluciones 1:10 (100 μL de extracto en 900 μL de metanol 99,8 %) y se procedió a la lectura de la absorbancia en espectrofotómetro (UV-1800, UV spectrophotometer, Shimadzu) a 665,2; 652,4 y 470,0 nm.

Para el cálculo del contenido de cada pigmento se utilizó una planilla de Excel siguiendo las fórmulas desarrolladas por Lichtenthaler (114):

$$\text{Chl } a = 16,72 \times A_{665,2} - 9,16 \times A_{652,4}$$

$$\text{Chl } b = 34,09 \times A_{652,4} - 15,28 \times A_{665,2}$$

$$\text{Chl } (a+b) = 1,44 \times A_{665,2} - 24,93 \times A_{652,4}$$

$$\text{Car} = (1000 \times A_{470,0} - 1,63 \times \text{Chl } a - 104,96 \times \text{Chl } b) / 221$$

Donde: $A_{665,2}$ es la lectura de absorbancia a 665,2 nm; $A_{652,4}$ es la lectura de absorbancia a 652,4 nm y A_{470} es la lectura de absorbancia a 470,0 nm. Los resultados finales fueron expresados en microgramo por gramo de peso fresco ($\mu\text{g g PF}^{-1}$). Con los resultados obtenidos se calcularon además las relaciones Chl *a/b* y Car/Chl (*a+b*).

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos), aplicando la prueba t de Student para comparaciones entre tratamientos (C vs. FL) y entre genotipos (*Nr* vs. PRS) ($P < 0,05$; $n = 5$).

4.1.2.2.2. Análisis del intercambio gaseoso

Durante la prueba se realizaron medidas no destructivas para determinar el rendimiento fotosintético e intercambio gaseoso con el sistema portátil LI-6400 (LI-COR Inc., Nebraska, Estados Unidos). Las mediciones se realizaron sobre el folíolo apical de la hoja resguardando la integridad del mismo para las siguientes mediciones.

Las lecturas con el LI-6400 se realizaron entre las 9:00 y 12:00 h, sobre hojas completamente desarrolladas de 8 plantas por tratamiento ($n = 8$) a la intensidad de luz de crecimiento ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$), temperatura foliar de 25 ± 1 °C, 60 % de HR, presión de 101,9 mPA y concentración de CO_2 de 400 ppm. Para el análisis del intercambio gaseoso se registraron las medidas instantáneas de: tasa de asimilación neta de carbono (*A*), conductividad estomática (g_s) y

concentración intercelular de CO_2 (C_i). La eficiencia del uso hídrico intrínseca (A/g_s) se calculó a partir de la razón entre las lecturas individuales de A y g_s . Las lecturas se realizaron a las 48 h (2 DDI), 96 h (4 DDI) y 144 h (6 DDI) de iniciado el tratamiento.

Con el fin estudiar la respuesta de las plantas al incremento del CO_2 , el último día de la prueba (6 DDI), se realizó la medición de A en hojas sometidas a diferentes concentraciones atmosféricas de CO_2 (C_a) a fin de inducir en la planta la apertura gradual de los estomas y, de ésta manera, incrementar C_i . En este caso, las mediciones se realizaron sobre la tercera hoja de tres plantas por tratamiento ($n = 3$), a una intensidad lumínica de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ (luz saturante) y haciendo variar C_a entre 50, 75, 100, 150, 200 y $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$, porción de la curva $A-C_i$ que según el modelo del mecanismo de asimilación de CO_2 de Farquhar *et al.*, (58) responde a la actividad de la enzima ribulosa 1-5 bi-fosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) y la pendiente de la curva (dA/dC_i) representa la eficiencia de dicha actividad. Se optó por limitar el estudio al primer tramo de la curva ya que de extender la medición hasta concentraciones de C_a saturantes ($2500 \mu\text{mol mol}^{-1}$), el tiempo requerido para tal registro, considerando la necesidad de realizar las réplicas para cada tratamiento y el hecho de que se debe permitir a la planta un período de al menos 5 minutos entre cada punto de la curva para su aclimatación a las nuevas condiciones, implicaría un tiempo de medida excesivo si se considera que la prueba tiene una duración total de 6 días. A partir del análisis de regresión de los datos recabados se construyó la curva $A-C_i$ y se estimó la eficiencia máxima de carboxilación de la Rubisco ($V_{c_{\max}}$) ($n = 3$) (58), donde necesariamente las mediciones son normalizadas a 25°C usando el modelo de respuesta de la Rubisco a la temperatura de Bernacchi (164). Para el cálculo de $V_{c_{\max}}$ se utilizaron planillas de Excel prediseñadas para tal fin.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos), aplicando para A , g_s , C_i y A/g_s la prueba t de Student para comparaciones entre tratamientos (C vs. FL) y entre genotipos (Nr vs. PRS) ($P < 0,05$; $n = 8$) y análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significancia α igual a $0,05$ entre fechas de muestreo (2 vs. 4 vs. 6), realizando el test de comparaciones múltiples por Tukey ($P < 0,05$; $n = 8$). En el caso de dA/dC_i y $V_{c_{\max}}$ se aplicó la prueba t de Student para comparaciones entre tratamientos (C vs. FL) y entre genotipos (Nr vs. PRS) ($P < 0,05$; $n = 3$).

4.1.2.2.3. Análisis del contenido de proteínas solubles totales

Para determinar el contenido de proteínas totales se extrajeron las muestras con un sacabocados de 9 mm de diámetro, cortando dos discos foliares (20 mg aproximadamente) por planta y por hoja. La extracción de las proteínas fue efectuada siguiendo la metodología propuesta por Battelli *et al.*, (18). Para preservar las proteínas, todo el procedimiento se realizó en hielo a fin de disminuir la actividad proteolítica de la muestra. La homogeneización del tejido foliar se realizó en un volumen de $250 \mu\text{L}$ de tampón de extracción frío (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 1 mM,

DTT 1 mM, Triton X-100, 0,1% (v/v)) en tubos plásticos de reacción con tapa de 1500 μ L y mediante el uso de un pilón plástico especial para dichos tubos. Los residuos se eliminaron mediante la formación de un pellet por centrifugado durante 10 min a 14.000 rpm a 4 °C. El sobrenadante (proteínas en solución) se rescató en un tubo nuevo y se conservó a -80 °C.

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante la reacción de Bradford (28), utilizando el kit “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad, Hercules CA, USA). Éste es un método sencillo y rápido, que se basa en la unión del colorante hidrofóbico azul de Coomassie a las proteínas de la muestra. El colorante en solución acuosa y en presencia de ácido fosfórico adopta un color pardo, pero al incorporarse al interior de la proteína, origina un color azul intenso con un pico máximo de absorbancia a 595 nm que puede medirse fácilmente por espectrofotometría.

Para ello, se preparó la mezcla de reacción con 1 parte del reactivo Dye concentrado en 4 partes de agua bi-destilada. Para hacer posible la cuantificación, se preparó una curva patrón de seis puntos crecientes en orden de concentración de proteína de suero bovino (BSA) pura como sugiere el protocolo del kit. Los extractos proteicos fueron descongelados en hielo, y debido al alto contenido proteico de las hojas visto en pruebas preliminares, se realizaron diluciones con agua bi-destilada (1:5) a fin de realizar una correcta lectura en el espectrofotómetro. Para las reacciones se utilizaron tubos plásticos de 1500 μ L con tapa, mezclando un volumen de 1000 μ L de mezcla de reacción y 20 μ L de muestra diluida o del patrón de la curva correspondiente. Para el blanco, se utilizaron las mismas proporciones, pero reemplazando la muestra por agua bi-destilada. Se mezclaron las reacciones con un agitador y se dejó incubar a temperatura ambiente (TA) durante 10 min antes de proceder a la lectura de absorbancia en espectrofotómetro (UV-1800, UV spectrophotometer, Shimadzu) a una longitud de onda de 595,0 nm. En una planilla de Excel se construyó la curva a partir de los patrones, y mediante el cálculo de la ecuación de la recta, y considerando el peso fresco de cada muestra, se determinó el contenido proteico expresándolo en microgramos de proteína por miligramos de peso fresco (μ g mg⁻¹).

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos), aplicando la prueba t de Student para comparaciones entre tratamientos (C vs. FL) y entre genotipos (*Nr* vs. PRS) ($P < 0,05$; $n = 5$).

4.1.2.2.4. Análisis de la actividad proteásica total

La actividad proteásica total en hojas de plantas de tomate sometidas a inundación fue realizada a partir de los extractos proteicos de hojas obtenidos con el siguiente buffer de extracción: Tris-HCl 50 pH 7.0, 2-mercaptoetanol 10mM, polivinilpolipirrolidona insoluble (PVPP) 2,5%, Triton X 0,1%. El método, detallado por Battelli *et al.*, (18), se basa en la liberación de cromóforos azoderivados unidos a las molécula de caseína a medida que esta última viene degradada por las proteasas presentes en el extracto vegetal. Una vez liberados los azoderivados absorben luz en el rango del espectro visible y por lo tanto pueden ser medidos por espectrofotometría. La liberación

de estos compuestos es proporcional a la cantidad de proteasas presentes y cuanto más intensa es la actividad de las proteasas, más cromóforos se generan y por lo tanto el color de la reacción es más intenso.

Mediante una prueba preliminar de actividad con tampón acetato 50 mM a diversos pH (3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 y 6,0) y en base a la bibliografía consultada, se optó por realizar el protocolo a pH 5,5 (máxima actividad proteolítica observada). Las mezclas de reacción consistieron en 225 μL de buffer acetato 50 mM pH 5,5; 250 μL de azocaseína al 0,4% (p/v, diluida en NaOH 0,1 N) y 5 μL de 2-mercaptoetanol 0,25 M. Por último, se agregaron 20 μL del extracto proteico y se dejó incubar durante toda una noche a 32 °C (se registró el tiempo exacto de incubación para el cálculo posterior de actividad). Al día siguiente y previo a la medición, la reacción se detuvo con el agregado de ácido tricloracético “TCA” al 50% (p/v) a fin de hacer precipitar las proteínas aún no degradadas. Las muestras fueron centrifugadas a 4 °C durante 10 min a 14.000 xg.

Para cuantificar la actividad proteolítica de la muestra luego de la incubación, se tuvo como referencia el valor de la misma al tiempo cero. Para ello se utilizaron los “blancos” de cada muestra donde se usó la misma mezcla de reacción que se explicó anteriormente, con la diferencia de que primero se adicionó el TCA 50% (p/v) y luego el extracto de la muestra. De esta manera se evita que las proteasas inicien su actividad por no contar con el sustrato. Los blancos fueron incubados junto al resto de las reacciones.

La lectura de la absorbancia de las muestras y sus respectivos blancos se realizó con espectrofotómetro (UV-1800, UV spectrophotometer, Shimadzu) a una longitud de onda de 440 nm. Para el cálculo de la actividad proteolítica de cada muestra, se utilizó una planilla de Excel siguiendo la ecuación:

$$\text{Actividad (abs. } \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) = \frac{Abs_{440M} - Abs_{440B}}{Prot \times t}$$

Donde: *Actividad*, es la actividad proteolítica de la muestra en absorbancia por μg de proteína por minuto; Abs_{440M} , es la lectura de absorbancia de la muestra a 440 nm; Abs_{440B} , es la lectura de la absorbancia del blanco o “tiempo cero”; *Prot*, es el contenido de proteína en la reacción en μg ; *t*, es el tiempo de total de la incubación en minutos.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos), aplicando la prueba t de Student para comparaciones entre tratamientos (C vs. FL) y entre genotipos (Nr vs. PRS) ($P < 0,05$; $n = 5$).

4.1.2.2.5. Contenido de enzima Rubisco

Para la cuantificación de la enzima Rubisco se utilizó la técnica SDS-PAGE, una separación por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, del inglés “*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*”) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) al 12,5%.

Los geles fueron preparados en placa vertical con un espesor de 1,5 mm. Cada gel se compuso de dos partes, la primera o superior que cumple la función de acumular las proteínas a fin de lograr una corrida pareja llamada gel acumulador (del inglés “*stacking gel*”), y la segunda o inferior, llamada gel separador (del inglés “*separating gel*”) que posee mayor grado de reticulación, a fin de retener las diferentes proteínas a distintos niveles según su masa molecular. Luego de montar los cristales en el soporte de la cuba electroforética se selló la base con una solución de agarosa al 1% preparada en el mismo buffer que se utilizó para la corrida electroforética (“*running buffer*”). Para los geles de separación se preparó una solución con 22,5 mL de acrilamida:bisacrilamida al 30% (en una relación 39:1 respectivamente), 13,5 mL de buffer tris HCl 1,5 M pH 8,8, 17,4 mL de agua destilada, 540 µL de SDS 10%, 300 µL de amonio persulfato (APS) 10% y 60 µL de TEMED (tetrametiletilendiamina). Hasta completar la polimerización de los geles de separación se cubrió la superficie libre de los mismos con 1 µL de butanol, para evitar la oxidación producida al contacto con el aire. Comprobada la gelificación, se procedió al lavado del butanol y cargado del gel acumulador. Este último se preparó con una solución de 5,4 mL de acrilamida:bisacrilamida al 30% (relación 39:1), 9 mL Tris HCl 0,5 M pH 6,8, 21,4 mL agua destilada, 360 µL de SDS 10%, 240 µL APS 10% y 36 µL TEMED. Una vez cargado el *stacking gel*, se colocó el molde en forma de peine para la delimitación de las calles. A partir de la cuantificación realizada por el método de Bradford, se calculó la cantidad de extracto necesario a fin de cargar 25 µg de proteína para cada muestra, luego se agregó un volumen de buffer de muestras (para 10 mL de buffer: 1 mL Tris HCl 1 M pH 6,8 + 4 mL SDS 10% + 2 mL glicerol, 2,5 mL beta-mercaptoetanol + 500 µL de azul de bromofenol). Con el fin de fragmentar la proteína para el análisis se realizó un golpe térmico en el que se colocaron las muestras a 95 °C durante 4 min en bloque térmico. Como patrón se utilizó un marcador (Kaleidoscope Prestained Standards) que incluye siete bandas de referencia (7,1; 20,6; 28,9; 34,8; 49,1; 80,0; 124,0 y 209,0 kDa). La corrida electroforética se realizó en presencia de buffer de corrida (14,4 gr glicina + 3 gr Tris + 1000 mL agua) a voltaje constante y amperaje variable 50 mA durante 60 min y 150 mA durante 90 min. La fijación de las proteínas se realizó en la solución 1 (50% metanol + 10% ácido acético + 40% agua destilada) durante 30 min; la coloración se realizó en la solución 2 (50% metanol + 10% ácido acético + 40% agua destilada + 0,25% coomassie brilliant blue r-250) durante 120 min; por último, la decoloración se realizó en la solución 3 (5% metanol + 7,5% ácido acético + 87,5% agua destilada) hasta eliminar la coloración de fondo (240 min aproximadamente).

El análisis de los geles se realizó con el programa Gel Analyzer, utilizando comparaciones entre la intensidad y superficie de las bandas correspondientes a las dos subunidades de la proteína Rubisco: subunidad mayor RbcL (56 kD) y subunidad menor RbcS (14 kD). Las diferencias se calcularon como contenido relativo tomando como referencia los valores de PRS control.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos), aplicando la prueba t de Student para comparaciones entre tratamientos (C vs. FL) y entre genotipos (*Nr* vs. PRS) ($P < 0,05$; $n = 3$).

4.1.2.2.6. Estudio de la expresión génica en hojas en respuesta a la inundación

Con el fin de estudiar la variación en la expresión de los genes de las plantas de tomate en respuesta a la inundación, y su relación con la senescencia, se realizó el análisis del nivel de transcripción de algunos genes mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real Time PCR). Se han estudiado cinco genes que podrían vincularse directamente con el proceso de senescencia: genes responsables de la síntesis de la sub-unidad grande y pequeña de la enzima Rubisco (*RbcL* y *RbcS* respectivamente), y genes relacionados a la producción de cisteín-proteasas en tomate (*CYP1*, *CYP2* y *CYP3*).

Durante el último día de prueba (6 DDI) se realizó un muestreo compuesto, sobre las mismas hojas donde se realizaron las demás determinaciones, de cuatro plantas por tratamiento mediante el uso de un sacabocado por golpe, registrando detalladamente el peso de cada una de ellas (100 mg PF aproximadamente). Las muestras fueron guardadas inmediatamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día de su procesamiento.

4.1.2.2.6.1. Extracción ARN

Para realizar la extracción de ARN y obtención del ADNc (ADN complementario), se siguió la metodología descrita por Mignolli *et al.*, (124). El material fresco (100 mg aproximadamente) fue homogeneizado en un mortero de vidrio con 1000 μL de reactivo TRI-REAGENT® (Sigma-Aldrich) y posteriormente transferido a un tubo de reacción de 1500 μL . Luego de una incubación de 5 min a TA, se procedió al centrifugado a 11.000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. El sobrenadante fue rescatado en un tubo nuevo y se agregaron 200 μL de cloroformo, se agitó vigorosamente (agitador vórtex) durante 15 s e incubó nuevamente durante 5 min a TA. Se realizó una nueva centrifugación a 11.000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min y se recuperó la fase acuosa (superior y de color claro) en un nuevo tubo y se mantuvo en hielo para agregar 250 μL de una solución salina concentrada (citrato de sodio 0,8 M y cloruro de sodio 1,2 M, Sigma-Aldrich) y 250 μL de isopropanol. Luego se repitió la agitación, incubación y centrifugación antes mencionadas. El pellet resultante se lavó dos veces con etanol 75% mediante agitación en vórtex y centrifugación a 8.500 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. Con el fin de eliminar cualquier resto de etanol, los tubos se colocaron en estufa con circulación de aire a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. La resuspensión del pellet (ARN) se realizó en 50-60 μL de agua DEPC (Dietil pirocarbonato).

4.1.2.2.6.2. Purificación del ARN

La cuantificación del ARN total extraído se realizó mediante espectrofotometría (UV-Vis espectrofotómetro, Genesys 5, Spectronic, Inc.) a una longitud de onda de 260 nm realizando una dilución del extracto (10 µL de extracto en 390 µL de agua DEPC). Con los datos de absorbancia se procedió al cálculo de concentración de ARN mediante la siguiente ecuación:

$$\mu gARN = \left(\frac{A_{260} \cdot fd \cdot 40}{1000} \right) \cdot V$$

Donde $\mu gARN$ son los micro-gramos de ARN presentes en la muestra; A_{260} es la absorbancia de la muestra a 260 nm; fd es el factor de dilución (en este caso 400/10); 40 es el factor de extinción molar ($1 A_{260} = 40 \mu g \text{ ARN/mL}$); 1000 es un factor de conversión de µL a mL; V , el volumen de elución de la muestra (en este caso 60 µL)

Con el fin de eliminar el ADN genómico presente en las muestras se realizó una digestión con ADNasas mediante el kit TURBO DNA free (Applied Biosystems/Ambion, Austin, Texas, Estados Unidos) mezclando: un volumen de extracto equivalente a 5 µg de ARN, 5 µL de buffer (10X TURBO DNase) y 1 µL de ADNasas (TURBO DNase). La mezcla de reacción se llevó a volumen con agua ultra pura. De esta manera se buscó lograr una concentración de ARN purificado de 0,125 µg/µL para la síntesis posterior de ADNc. La reacción se incubó durante 30 min a 37 °C y luego se agregaron 5 µL de un buffer inhibidor de ADNasas (DNase Inactivation Reagent) realizando agitación durante 2 min. Mediante centrifugación (14.000 rpm a TA durante 2 min) se hizo precipitar los restos de buffer con el inhibidor, y luego se rescataron 40 µL del producto sobrenadante (0,125 µg ARN purificado/µL).

4.1.2.2.6.3. Síntesis de ADNc

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT PCR) se obtuvo ADNc a partir del ARN purificado. Para esto se utilizó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, USA), haciendo reaccionar mediante PCR tradicional: 1,25 µg de ARN purificado con RT buffer 10X, dNTPs Mix (desoxirribonucleótidos trifosfatados) 10x, RT Random Primers (hexámeros cebadores al azar) 10x, 50 U de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (retro-transcriptasa) y agua DEPC en un volumen final de reacción de 20 µL. El programa de ciclado utilizado fue el recomendado por el fabricante (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones de ciclado para la RT PCR

Etapa	Temp. (°C)	Tiempo (min)
1	25	10
2	37	120
3	85	5

A partir de la relación μg ARN purificado: μL de retro-transcriptasa, se obtuvo una concentración final de $0,0625 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADNc. Con agua ultra-pura se realizó la dilución correspondiente para lograr una concentración la de $10 \text{ ng ADNc}/\mu\text{L}$ necesaria para la Real Time PCR.

4.1.2.2.6.4. PCR en tiempo real

Mediante la técnica de Real Time PCR se cuantificó la expresión de los genes *RbcL*, *RbcS*, *CYP1*, *CYP2* y *CYP3* (Tabla 6). Para la reacción se utilizó el kit HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus ROX (Solis BioDyne). Las mezclas de PCR contenían $5 \mu\text{L}$ de ADNc producto de la retrotranscripción, $0,5 \mu\text{L}$ de cada cebador en una concentración de $10 \mu\text{M}$ y $4 \mu\text{L}$ de HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX), en un volumen final de $20 \mu\text{L}$. Las PCR fueron realizadas en la plataforma ABI PRISM 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) siguiendo las condiciones de ciclado descritas en la tabla 7. Una vez obtenidas las curvas relativas al nivel de fluorescencia emitido, a través del software 7500 Software (Applied Biosystems) fueron calculados los Ct de cada reacción de amplificación. Finalmente, se calculó el nivel de expresión de todos los genes normalizándolos respecto a la expresión del gen de referencia (gen housekeeping) *LeEfl α* usado como control interno. Cada una de las muestras provenientes del muestreo compuesto de hojas fue analizada utilizando tres réplicas técnicas.

Tabla 6. Secuencia de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real.

Cebador	Secuencia	Código	Referencia
LeEfl α Fw	5'-CATCAGACAAACCCCTCCGT-3'	X14449.1	(186)
LeEfl α Rv	5'-GGGGATTTTGTGTCAGGGTTGTAA-3'	X14449.1	(186)
RbcS Fw	5'-TCCCCTGGATACTACGATGG-3'	NM_001308943.1	Este trabajo
RbcS Rv	5'-CTTCGCCTCTTGAACCTCAG-3'	NM_001308943.1	Este trabajo
RbcL Fw	5'-GCTGCCGAATCTTCTACTGG-3'	KX086703.1	Este trabajo
RbcL Rv	5'-GGTAGCATCGCCCTTTGTAA-3'	KX086703.1	Este trabajo
CYP1 Fw	5'-CGGTCAAGCCACCTACAGAG-3'	NM_001247395.2	Este trabajo
CYP1 Rv	5'-CAGCATCCCCAAGAGAAGCA-3'	NM_001247395.2	Este trabajo
CYP2 Fw	5'-AACAAAGCCCCGACCTAATCT-3'	NM_001328680.1	Este trabajo
CYP2 Rv	5'-TTCACGCCAGTCAAATCAG-3'	NM_001328680.1	Este trabajo
CYP3 Fw	5'-ACCATGCTGTTCTTGCTGTG-3'	NM_001309384.1	Este trabajo
CYP3 Rv	5'-CAATCTGCTCCCATGAGTT-3'	NM_001309384.1	Este trabajo

Tabla 7. Condiciones de ciclado para la PCR en tiempo real.

N° ciclos	Proceso	Temp. (°C)	Tiempo (min)
1	Activación inicial	95	15
40	Desnaturalización	95	15
	Hibridación y alargamiento	60	30

A partir de la información obtenida con el software utilizado, se procedió al cálculo de los niveles de expresión para cada gen mediante una planilla de Excel diseñada para tal fin.

4.1.2.2.7. Fluorescencia de la clorofila a

Para el estudio de la fluorescencia de la clorofila se utilizaron el sistema portátil LI-6400 (Li-Cor, Inc., Lincoln, NE, USA) equipado con un cabezal integrado con cámara de fluorescencia (Li-6400-40 leaf chamber fluorometer, Li-Cor Inc., Nebraska, Estados Unidos) y un fluorómetro de pulsos de amplitud modulada Mini-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Alemania). Al igual que las lecturas de intercambio gaseoso, los parámetros de fluorescencia se tomaron sobre el folíolo apical de la hoja resguardando la integridad del mismo para las siguientes mediciones, respetando además la misma frecuencia de muestreo.

La fluorescencia máxima con todos los centros de reacción de PSII en estado reducido bajo iluminación actínica (F_m') y la fluorescencia producida por los centros de reacción al estado actual de la muestra durante la iluminación actínica (F') se determinaron sobre hojas adaptadas a la luz y a la misma intensidad lumínica que la utilizada en la cámara climatizada ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$), mientras que la fluorescencia máxima de la muestra aclimatada a la oscuridad (F_m) y la fluorescencia basal de la muestra adaptada a la oscuridad (F_o) se midieron en ausencia de luz tras un período de aclimatación de 60 min con el fin de asegurar la “descarga” de los centros de reacción del fotosistema.

Los parámetros de eficiencia fotoquímica actual del PSII (Φ_{PSII}), índice de Stern-Volmer del *quenching* no fotoquímico (NPQ) y eficiencia fotoquímica potencial o máxima del PSII (F_v/F_m) fueron calculados mediante fórmulas según citan Scartazza *et al.*, (164) en donde:

$$\begin{aligned}\Phi_{\text{PSII}} &= (F_m' - F')/F_m' \\ \text{NPQ} &= (F_m'/F_m) - 1 \\ F_v/F_m &= (F_m - F_o)/F_m\end{aligned}$$

Para el caso de Φ_{PSII} se utilizaron los parámetros registrados con el LI-6400, mientras que el Mini-PAM se utilizó para NPQ y F_v/F_m .

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos), aplicando la prueba t de Student para comparaciones entre tratamientos (C vs. FL) y entre genotipos (Nr vs. PRS) ($P < 0,05$; $n = 8$) y análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ entre fechas de muestreo (2 vs. 4 vs. 6), realizando el test de comparaciones múltiples por Tukey ($P < 0,05$; $n = 8$).

4.1.2.2.8. Análisis de carbohidratos no estructurales

Para el análisis de las fracciones glucosa, fructosa y sacarosa se siguió la metodología propuesta en Moles *et al.*, (130). Se realizó una extracción ácido-base para lo cual se pesaron 100 mg de hojas frescas y se colocaron en tubos plásticos de reacción con tapa de 1500 μL , los cuales fueron homogeneizados en 500 μL de ácido perclórico (HClO_4) al 5,5% mediante el uso de un pilón

plástico especial para dichos tubos. Luego de una incubación a 4 °C durante 60 min las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 14.000 rpm a fin de formar un pellet con los residuos. La solución sobrenadante se rescató en un nuevo tubo de reacción y se neutralizó (a pH 5,5-7,5) con carbonato de potasio (K_2CO_3) 3,5 M. Las muestras se dejaron incubar nuevamente durante 30 min a 4 °C, luego fueron centrifugadas durante 10 min a 14.000 rpm y se recuperó el sobrenadante registrando con precisión su volumen.

La determinación de los azúcares libres se realizó por el método enzimático con hexoquinasa, glucosa-6 fosfato deshidrogenasa y fosfo gluco-isomerasa. Para las reacciones se utilizaron 200 μ L de extracto diluido 1:10 (20 μ L extracto más 180 μ L de agua destilada) preparando cada muestra por duplicado, la primera para la determinación de glucosa y fructosa libres, y la segunda para la determinación de sacarosa. A la primera fracción de cada muestra se agregaron 100 μ L de la Solución A (para 10 reacciones: 800 U de invertasa liofilizada + 1 mL buffer acetato de sodio 50 mM pH 4,6), mientras que a la segunda fracción se le añadieron 100 μ L de la Solución B (buffer acetato de sodio 50 mM pH 4,6). Además, para la posterior cuantificación, se creó un patrón a partir de una serie de diluciones de glucosa (0, 28, 56, 112, 224, 448 y 896 nmoles de glucosa), de las cuales se hicieron reaccionar 200 μ L con 100 μ L de Solución B. Tanto a la primera como a la segunda fracción y a los estándares, se los dejó incubar durante 60 min a 37 °C. Finalizada la primera incubación, se agregó a todas las reacciones 700 μ L de Solución C (para 10 reacciones: 4 mL buffer Tris-HCl 300 mM pH 7,6 + 3 mL $MgCl_2$ 10 mM + 15 mg ATP + 6 mg NADP + 5 U hexoquinasa + 5 U glucosa-6 fosfato deshidrogenasa) y se inició la segunda incubación a 37 °C durante 30 min. Luego se leyó la absorbancia de todas las muestras y el patrón con espectrofotómetro (UV-1800, UV spectrophotometer, Shimadzu) a una longitud de onda de 340 nm. Posteriormente, se agregó a la segunda fracción 10 μ L de Solución D (para 10 reacciones: 100 μ L de buffer Tris-HCl 300 mM pH 7,6 + 10 U fosfo-gluco-isomerasa) y se colocó nuevamente en incubación a 37 °C durante 15 min. Transcurrido dicho tiempo, se procedió a la lectura de la absorbancia a 340 nm.

Con las lecturas de absorbancia de los patrones se construyó la curva correspondiente y se calculó la ecuación de la recta, con la cual fue posible cuantificar cada uno los azúcares respetando las consideraciones y ecuaciones que se detallan a continuación:

1. La absorbancia de las muestras tratadas con las soluciones B y C = **Glucosa libre**
2. La absorbancia de las muestras tratadas con las soluciones A y C = glucosa libre + glucosa derivada de la sacarosa. Por lo que **Sacarosa = 2 - 1**
3. La absorbancia de las muestras tratadas con las soluciones B, C y D = glucosa libre + fructosa libre. Por lo que **Fructosa = 3 - 1**

El contenido total de carbohidratos se determinó mediante la suma de las tres fracciones. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software

Inc., San Diego, California, Estados Unidos), aplicando la prueba t de Student para comparaciones entre tratamientos (C vs. FL) y entre genotipos (Nr vs. PRS) ($P < 0,05$; $n = 5$).

4.1.2.2.9. Detección in-situ de H_2O_2 mediante tinción con DAB

El principio de la técnica se basa en que la diaminobencidina (DAB) reacciona con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), generando un sustrato que reacciona con la enzima peroxidasa, dando como resultado un producto que precipita y forma una señal visible de color marrón oscuro de forma permanente. Para esto, se preparó la solución de tinción con DAB (1 mg/mL) solubilizando 50 mg de la droga pura (3,3-diaminobezidine, Sigma-Aldrich) en 45 mL de agua destilada. Posteriormente se ajustó a pH 3,0 con HCl 0,2 M. Se agitó vigorosamente y se añadieron 2,5 mL de Na_2HPO_4 200 mM para que el pH llegue a aproximadamente a 7,0. Finalmente se llevó a un volumen a 50 mL. Se cortaron los folíolos terminales de la hoja de cada tratamiento. Los mismos se colocaron en un erlenmayer de 125 mL (envuelto en aluminio) y se agregaron unos mL de solución de DAB suficiente para cubrir las láminas. Posteriormente se aplicó vacío durante 5 min. Los erlenmayer se incubaron a 27 °C en agitación (130 rpm) durante toda la noche (8-10 hs). Luego de la incubación, se descartó la solución de DAB, y se enjuagaron los folíolos con agua destilada. La diafanización del tejido foliar se realizó en una solución de etanol:ácido acético 3:1 (v:v) hasta completa decoloración (pérdida de clorofila). Finalmente los folíolos fueron fotografiados con cámara digital.

4.2. Experimentos realizados con inhibidores del etileno

Se realizaron dos experimentos con el objetivo de evaluar el efecto de inhibidores del etileno sobre ciertos parámetros de la senescencia foliar de plantas de tomates sometidas a la inundación. Las pruebas se llevaron a cabo en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias e Instituto de Botánica del Nordeste, de la Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes (Argentina).

4.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

Se trabajó con plantas de 28 días de edad del genotipo Ailsa Craig (AC accesión LA2838A), ya previamente empleadas en otros trabajos experimentales de inundación (184), las cuales fueron obtenidas por siembra en germinador. Tanto la obtención de las plantas como las condiciones experimentales para el crecimiento e inundación coinciden con los descritos para la “primera experiencia con Nr”.

4.2.2. Tratamientos con inhibidores

4.2.2.1. Experimento 1. Prueba preliminar para la evaluación de diferentes inhibidores del etileno

Se realizó una prueba preliminar para evaluar la efectividad de tres productos diferentes: amino-etoxivinil-glicina (AVG); ácido amino-oxiacético (AOA) y cloruro de cobalto (CoCl_2) sobre el retraso de la senescencia en plantas de tomate inundadas, y elegir alguno de ellos para la prueba definitiva. En todos los casos se preparó una solución del producto en agua destilada a fin de conseguir una concentración final de 250 μM . Para la preparación de las soluciones de AOA y Co^{2+} se utilizaron drogas puras (Co^{2+} , en forma de cloruro de cobalto - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), mientras que para el AVG se utilizó un producto de uso agrícola cuya presentación comercial es en forma de polvo soluble a una concentración del 15% (Retain, Summit Agro, Estados Unidos). Todas las soluciones fueron preparadas el mismo día en el que se inició el experimento, y se les agregó 50 μL de un surfactante hidrofílico no iónico (Tween 20) para mejorar la humectación. La aplicación de los productos se realizó mediante aspersión foliar con un atomizador de acción manual hasta el punto de goteo.

Previo a la aplicación de los inhibidores y el inicio del tratamiento de inundación, las plantas fueron separadas al azar conformando 8 grupos de 5 plantas cada uno ($n = 5$), determinando así un control absoluto (plantas bien drenadas y sin aplicación de inhibidor), tres controles (plantas bien drenadas) para evaluar posibles efectos fitotóxicos de cada inhibidor, un tratamiento inundado sin aplicación de inhibidores y tres tratamientos inundados a los cuales se le aplicó un inhibidor a cada uno

Al observarse claros efectos fitotóxicos para AOA y Co^{2+} (no se muestran los resultados), se tomó la decisión utilizar únicamente AVG para las experiencias posteriores, inhibidor para el cual la toxicidad observada fue menor.

4.2.2.2. Experimento 2. Efecto del inhibidor AVG sobre el contenido de clorofila y la fluorescencia de la clorofila a

En base a los resultados observados en la *prueba preliminar* con los inhibidores se optó como mejor opción al AVG. Se buscó repetir la experiencia realizada en la prueba preliminar, ajustando en esta segunda oportunidad la dosis y el momento de aplicación. La metodología utilizada coincidió con la descrita para la *prueba preliminar*, solo que ante la presencia de síntomas de fitotoxicidad (clorosis incipiente en región apical del tallo con hojas aún no desarrolladas completamente) se optó por reducir la dosis de principio activo a 100 μM .

4.2.2.2.1. Obtención de las muestras y análisis estadístico

Se evaluó el contenido relativo de clorofila (SPAD) con un dispositivo portátil SPAD-502 (Konica Minolta, Osaka, Japón) y la eficiencia fotoquímica máxima del PSII (F_v/F_m) con un fluorómetro portátil Handy PEA (Hansatech, Kings Lynn, Inglaterra), mediante mediciones matutinas (entre las 9:00 y 11:00 h) llevadas a cabo cada 2 días (0, 2, 4 y 6 DDI) desde el inicio de la prueba. La medición de F_v/F_m se realizó en hojas de tomate previamente aclimatadas a la oscuridad (60 min). Para ello se utilizaron unos broches (Figura 10A) especialmente diseñados por el fabricante del instrumento, que permiten bloquear completamente la llegada de luz a un sector de la hoja sobre el cual se realiza posteriormente la medición. Fue necesaria una adaptación de los mismos (Figura 10B) para evitar daños mecánicos en los folíolos debido a la presión que ejerce el broche y la utilización de un soporte para que el peso del broche no vuelque la planta ni dañe la hoja (Figura 10C).

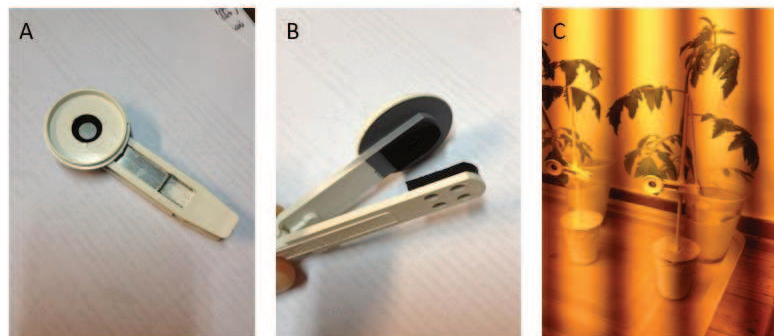


Figura 10. Adaptación de broches para medición de fluorescencia. A. broche para tratamiento de oscuridad localizado para determinación de F_v/F_m ; B. detalle de la adaptación (anillo de goma EVA) para evitar daños mecánicos en la hoja durante la medición; C. dispositivo de sujeción de broches durante el tratamiento de oscuridad.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos), mediante análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ para cada fecha, realizando el test de comparaciones múltiples por Tukey ($P < 0,05$; $n = 10$) para conocer las diferencias entre tratamientos (C vs. FL vs. FL+AVG). En el caso puntual del análisis de las lecturas con SPAD se aplicó la prueba t de Student para comparaciones entre tratamientos (C vs. FL) y entre genotipos (Nr vs. PRS) ($P < 0,05$; $n = 5$).

5. RESULTADOS

5.1. Análisis de pigmentos foliares

Las hojas de tomate de plantas del tratamiento con inundación (FL) presentaron a simple vista una coloración más pálida que las plantas del tratamiento control (C) al cabo de 6 días de inundación (Figura 11A), advirtiéndose además un nivel de clorosis diferente entre genotipos, siendo más notoria en PRS que en *Nr*. Además de esto, se observó cierta diferencia en la tonalidad del verde entre las plantas del tratamiento C entre ambos genotipos, siendo mayor en *Nr*. Los datos del análisis con SPAD-504 mostraron una pérdida significativa de pigmentos verdes, según se interpreta por sus menores valores de unidades SPAD, a medida que avanzó el período de inundación en plantas de PRS, mientras que en las plantas de *Nr* se mantuvieron sin variación respecto a C (Figura 11B). En el tratamiento FL, los valores SPAD de las plantas de *Nr* fueron 1,2, 1,3 y 1,4 veces mayores que en PRS a los 2, 4 y 6 días de estrés, respectivamente; mientras que en las plantas del tratamiento C de ambos genotipos difirieron únicamente al sexto día.

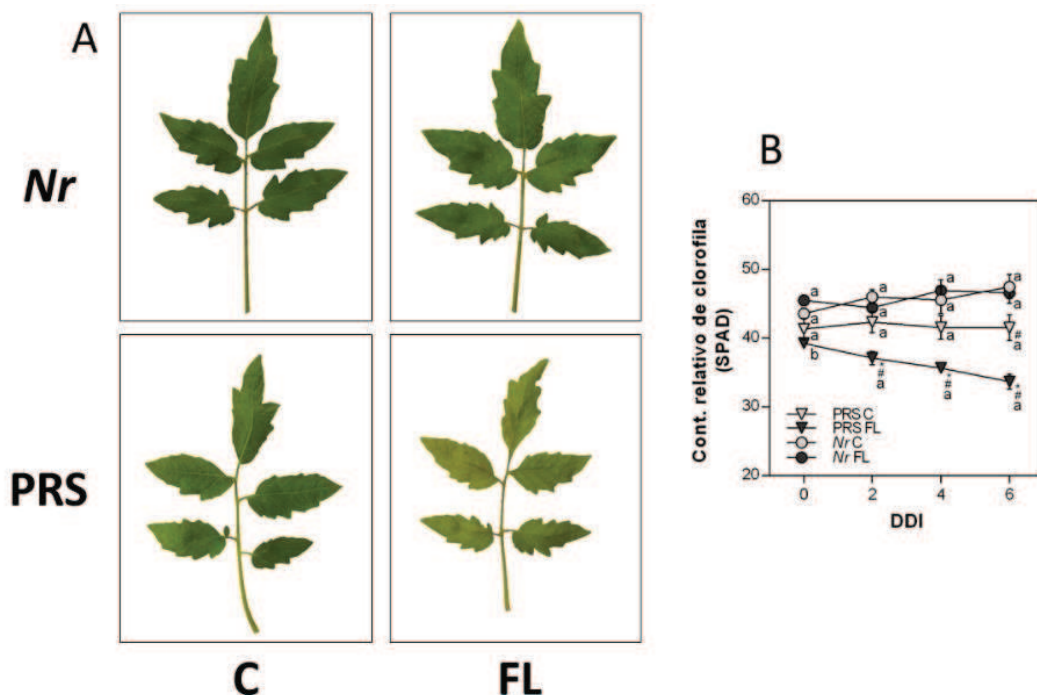


Figura 11. Clorosis foliar en tomate durante la inundación en terceras hojas de plantas de *Never ripe* (*Nr*) y Pearson (PRS) bien drenadas (C) e inundadas (FL). A. fotografías de terceras hojas a los 6 días desde inundación; B. datos del análisis con medidor de clorofila portátil SPAD-502 a los 0, 2, 4 y 6 días de inundación. Los valores mostrados son medias \pm SEM ($n = 5$). Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo genotipo (C vs. FL), numerales indican diferencias significativas entre iguales tratamientos de distintos genotipos (PRS vs. *Nr*) según t-test ($P < 0,05$). Letras distintas indican diferencias significativas entre fechas para un mismo tratamiento y genotipo (0 vs. 2 vs. 4 vs. 6) (ANOVA, TCM por Tukey; $P < 0,05$; $n = 5$).

El análisis del efecto del tratamiento sobre el contenido total de clorofilas (Chl ($a+b$)) expresado en función al peso fresco mostró diferencias significativas en PRS (Figura 12A) con una notable reducción en las plantas inundadas respecto a sus controles (de $1,73 \mu\text{g g PF}^{-1}$ a $1,99 \mu\text{g g PF}^{-1}$),

mientras que en el caso de *Nr*, las plantas inundadas no evidenciaron pérdida significativa de clorofila por efecto de la inundación.

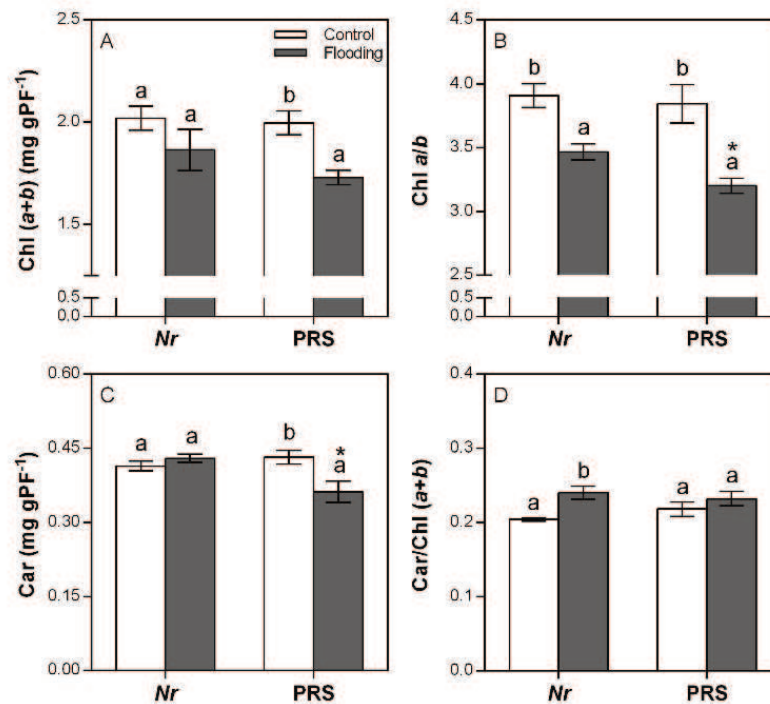


Figura 12. Contenido de clorofilas y carotenoides. A. contenido de clorofila total (Chl (a+b)); B. relación entre contenido de clorofila *a* y clorofila *b* (Chl *a/b*); C. contenido de carotenoides totales (Car); D. relación entre contenido de carotenoides totales y clorofila total (Car/Chl (a+b)), en terceras hojas de plantas controles (Control) e inundadas (Flooding) de Pearson (PRS) y *Never ripe* (*Nr*) al cabo de 6 días de inundación. Los valores mostrados son medias \pm SEM ($n = 5$). El análisis estadístico se realizó mediante t-test. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo genotipo (C vs. FL) y asteriscos indican diferencias entre iguales tratamientos de distintos genotipos (*Nr* vs. PRS) ($P < 0,05$).

En cuanto respecta a la relación entre los contenidos de clorofila *a* y clorofila *b* (Chl *a/b*) al sexto día de tratamiento (Figura 12B), las hojas de ambos genotipos mostraron una disminución significativa de dicho índice bajo condiciones de inundación (*Nr* FL fue 0,88 y PRS FL fue 0,83 veces lo que sus respectivos controles). Comparando genotipos, Chl *a/b* difirió en forma significativa entre los individuos inundados, siendo mayor en *Nr*.

El contenido de carotenoides totales (Car) al sexto día de inundación se mantuvo a niveles del control en las hojas de plantas inundadas de *Nr*, mientras que en PRS se vio una disminución, siendo 0,16 veces menor que su control (Figura 12C). La diferencia entre genotipos en situación de estrés, también alcanzó la significancia estadística, registrándose en PRS menor contenido de estos pigmentos respecto al mutante (0,36 $\mu\text{g g PF}^{-1}$ en PRS contra 0,43 $\mu\text{g g PF}^{-1}$ en *Nr*).

La relación entre carotenoides y clorofilas totales (Car/Chl(a+b)) (Figuras 12D) se manifestó en aumento en las hojas de plantas inundadas de *Nr* cuando se la comparó con las plantas control, mientras que para PRS no se observaron diferencias entre tratamientos.

5.2. Análisis de pigmentos en tratamientos con AVG

Los resultados de la aplicación de AVG al inicio de la inundación se muestran en la Figura 13. El decaimiento del índice SPAD en plantas inundadas recién fue evidente desde el cuarto día de inundación. En el día 6 las plantas inundadas de AC que recibieron la aplicación del inhibidor mostraron un valor de índice SPAD 1,3 veces mayor que las del tratamiento inundado sin AVG, sin presentar diferencias significativas respecto al control.

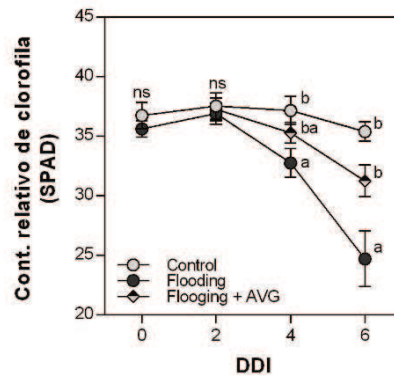


Figura 13. Contenido relativo de clorofila (índice SPAD) en plantas de Ailsa Craig bien drenadas (Control), inundadas (Flooding) e inundadas más la aplicación de AVG (Flooding+AVG) a los 0, 2, 4 y 6 días de inundación. Los valores mostrados son medias \pm SEM ($n = 10$). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (C vs. FL vs. FL+AVG) para cada fecha y ns indica diferencias no significativas (ANOVA, TCM por Tukey; $P < 0,05$; $n = 10$).

5.3. Análisis de la fluorescencia de la clorofila a

En la Figura 14 se representan los parámetros de fluorescencia de la clorofila en plantas control e inundadas de *Nr* y PRS. En particular se analizaron: la eficiencia fotoquímica o rendimiento cuántico actual del PSII (Φ_{PSII}), la eficiencia fotoquímica potencial del PSII o rendimiento cuántico máximo del PSII (F_v/F_m) y el *quenching* no fotoquímico (NPQ). El Φ_{PSII} experimentó una reducción en ambos genotipos durante la inundación (Figura 14A). Aunque esta diferencia entre la eficiencia fotoquímica actual de hojas de plantas control e inundadas fue de magnitud similar en ambos genotipos, en todas las fechas evaluadas el Φ_{PSII} de hojas de plantas inundadas fue significativamente mayor en *Nr* que PRS (Anexo I).

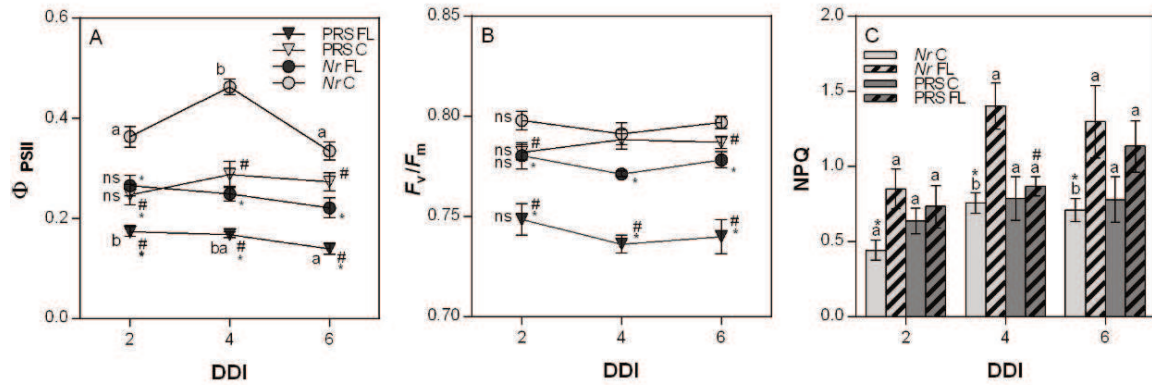


Figura 14. Parámetros de fluorescencia de la clorofila *a* en terceras hojas de plantas de *Never ripe* (*Nr*) y Pearson (PRS) en condiciones de control (C) e inundación (FL) durante 6 días de estrés (DDI). A. eficiencia fotoquímica actual de PSII (Φ_{PSII}); B. rendimiento cuántico potencial del PSII (F_v/F_m); C. *quenching* no fotoquímico (NPQ). En A y B, los símbolos representan la media, en C las columnas representan la media, en todos los casos las barras de error son SEM ($n = 8$). Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo genotipo (C vs. FL) y numerales indican diferencias significativas entre iguales tratamientos de distintos genotipos (*Nr* vs. PRS) en cada fecha según t-test ($P < 0.05$), mientras que letras minúsculas distintas indican diferencias significativas, y “ns” no significativas, entre fechas para un mismo tratamiento y genotipo (2 vs. 4 vs. 6) (ANOVA, TCM por Tukey; $P < 0,05$; $n = 8$).

El rendimiento cuántico máximo del PSII (F_v/F_m) también ha sido afectado a causa del estrés por inundación tanto en PRS como en *Nr* (Figura 14B). Si bien en ambos genotipos, F_v/F_m se mantuvo constantemente más bajo a partir de segundo día de inundación, su caída en las plantas inundadas con respecto a las plantas control fue de 1,8, 2,6 y 2,5 veces mayor en PRS con respecto a *Nr* a los 2, 4 y 6 días desde el inicio de la inundación (Figura 14B). Se observó además que, durante todo el periodo de inundación, dicho parámetro mostró valores significativamente más altos en *Nr* que en PRS (Anexo I).

Con respecto al *quenching* no fotoquímico (NPQ), en *Nr* se vio un aumento significativo, siendo casi 2 veces mayor el NPQ en las plantas inundadas que en los controles al cabo de 2 días, diferencia que se mantuvo prácticamente sin variaciones significativas hasta el día 6 de inundación (Figura 14C), mientras que en PRS no se evidenció ninguna respuesta importante del NPQ durante la prueba respecto al tratamiento C. En el día 4 del experimento, se apreció una diferencia estadística del NPQ de plantas inundadas de ambos genotipos, siendo mayor en *Nr* (Figura 14C). Durante los días 2 y 6 no existió diferencia entre el NPQ de las plantas estresadas de *Nr* y PRS.

5.4. Fluorescencia de la clorofila *a* en tratamientos con AVG

Desde el cuarto día de inundación se hizo evidente una reducción significativa de F_v/F_m en las plantas de AC inundadas respecto al control (Figura 15), tendencia que continuó hasta el sexto día de inundación. En las plantas inundadas que habían recibido la aplicación de AVG (FL+AVG) no se observaron diferencias significativas respecto al control durante toda la prueba. Sin

embargo, en el tratamiento por inundación (FL), se observaron diferencias estadísticas en el día 4 con FL+AVG, no resultando así en el día 6 al finalizar el experimento.

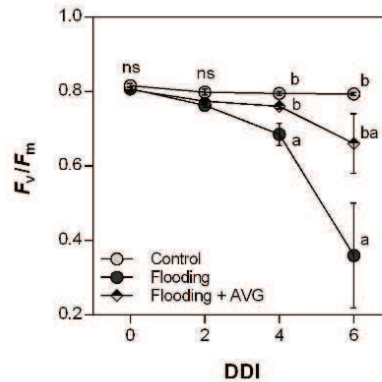


Figura 15. Eficiencia fotoquímica máxima del PSII (F_v/F_m) en plantas de Ailsa Craig bien drenadas (Control), inundadas (Flooding) e inundadas más la aplicación de AVG (Flooding+AVG) a los 0, 2, 4 y 6 días de inundación. Los valores mostrados son medias \pm SEM ($n = 10$). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada fecha (C vs. FL vs. FL+AVG) y ns indica diferencias no significativas (ANOVA, TCM por Tukey; $P < 0,05$; $n = 10$).

5.5. Análisis del estrés oxidativo

Las pruebas de tinción permitieron apreciar una notable acumulación de H_2O_2 en hojas de *Nr* y PRS al sexto día de inundación (Figura 16), observándose que la abundancia y distribución de las áreas teñidas con DAB fueron diferentes en los dos genotipos. En hojas de plantas inundadas de PRS la tinción fue homogénea e intensa en toda la lámina foliar, mientras que en los folíolos de *Nr* pudieron observarse áreas sin teñir y tonalidades más claras respecto a las observadas en PRS.

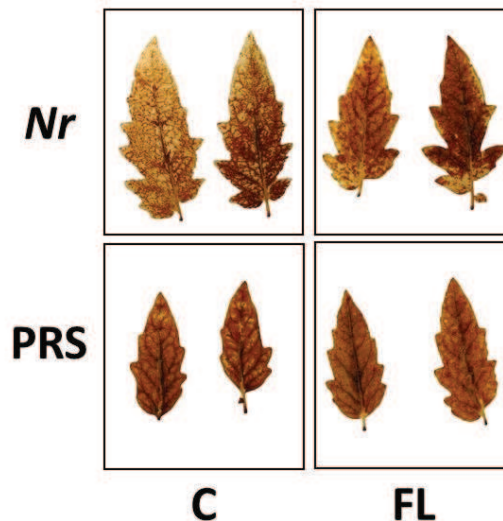


Figura 16. Tinción con DAB en terceras hojas de plantas de *Never ripe* (*Nr*) y Pearson (PRS) bien drenadas (C) e inundadas (FL). Fotografías tomadas a los 6 días de inundación. Tonalidades más intensas de marrón indican zonas con mayor acumulación de H_2O_2 .

5.6. Análisis del intercambio gaseoso

Al cabo de las primeras 48 h de inundación se produjo una importante reducción de la conductividad estomática (g_s) en los genotipos *Nr* y PRS en el tratamiento con inundación en

comparación al control (Figura 17A), no habiéndose detectado diferencias estadísticas entre los dos genotipos para el tratamiento con inundación durante todo el desarrollo del experimento (Anexo III). La g_s de los tratamientos C tampoco difirió entre los genotipos *Nr* y PRS.

La tasa de asimilación neta del carbono (A) también se redujo en el tratamiento FL en comparación con el tratamiento C en los dos genotipos estudiados (Figura 17B; Anexo III). En el tratamiento C, al comparar los genotipos *Nr* y PRS se observó diferencias estadísticas en todo el experimento (Figura 17B; Anexo III). Sin embargo, en el tratamiento FL solamente al día 2 se pudo determinar que los genotipos PRS y *Nr* presentaron diferencias estadísticas en A , siendo mayor en *Nr* (Anexo III). Luego de la reducción inicial (el día 2), la A se mantuvo constante en plantas inundadas de ambos genotipos al transcurrir los días de la prueba (Anexo III).

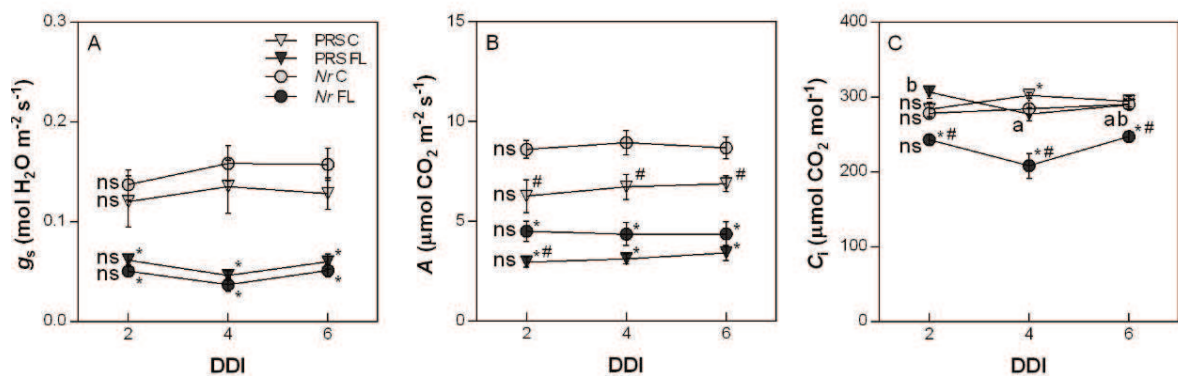


Figura 17. Parámetros de intercambio gaseoso en terceras hojas de plantas de *Never ripe* (*Nr*) y *Pearson* (PRS) durante 6 días de inundación en condiciones de control (C) e inundación (FL). A. conductividad estomática (g_s); B. tasa de asimilación neta del carbono (A); C. concentración intercelular de CO_2 (C_i). Los símbolos representan la media y las barras el SEM ($n = 8$). Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo genotipo (FL vs. C), numerales indican diferencias significativas entre iguales tratamientos de diferentes genotipos (*Nr* vs. PRS) (t-test; $P < 0,05$; $n = 8$). Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas, y “ns” no significativas, entre fechas para un mismo tratamiento y genotipo (2 vs. 4 vs. 6) (ANOVA, TCM por Tukey; $P < 0,05$; $n = 8$).

Las mediciones realizadas para determinar la concentración intercelular de CO_2 (C_i) permitieron determinar una disminución estadísticamente significativa de dicho parámetro en las plantas de *Nr* (Anexo III) (Figura 17C). Con la única excepción del día 2 en plantas de PRS (una leve reducción en el tratamiento inundado y un leve aumento en el control al día 4 que generaron diferencia), C_i se mantuvo sin diferencias significativas entre plantas inundadas y controles de PRS prácticamente durante toda la prueba (Anexo III).

El cociente entre A y g_s (A/g_s) o eficiencia del uso hídrico intrínseca (EUH o WUE en inglés) se ha representado en la Figura 18. En las plantas del mutante *Nr* se evidenció un importante incremento de A/g_s en respuesta a la inundación desde el día 2 de iniciado el estrés (en promedio 1,4 veces mayor que el control) que se mantuvo elevado hasta finalizada la prueba (Figura 17; Anexo III). Además, se observó un valor máximo significativo en el día 4 respecto a los días 2 y 6, que superó en poco más de dos veces al control (Figura 18). En cambio, no hubo efecto del tratamiento sobre dicho parámetro en plantas de PRS. Este hecho se reflejó además en

considerables diferencias entre la A/g_s de plantas inundadas de los dos genotipos durante el transcurso de la prueba (Anexo III) (1,8, 1,8 y 1,5 veces mayor en *Nr* a los 2, 4 y 6 DDI, respectivamente).

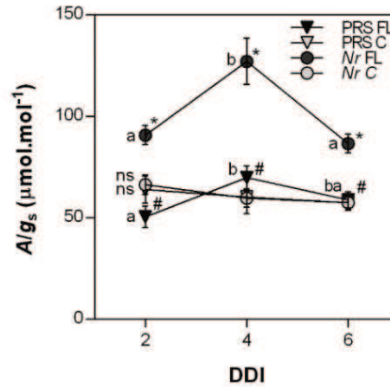


Figura 18. Eficiencia del uso hídrico intrínseco (A/g_s) en terceras hojas de plantas de *Never ripe* (*Nr*) y Pearson (PRS) durante 6 días de inundación en condiciones de control (C) e inundación (FL). Los símbolos representan la media y las barras el SEM ($n = 8$). Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo genotipo (FL vs. C), numerales indican diferencias significativas entre iguales tratamientos de diferentes genotipos (*Nr* vs. PRS) (t-test; $P < 0,05$; $n = 8$). Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas, y “ns” no significativas, entre fechas para un mismo tratamiento y genotipo (2 vs. 4 vs. 6) (ANOVA, TCM por Tukey; $P < 0,05$; $n = 8$).

La respuesta de A a diferentes concentraciones de CO_2 se presenta en la Figura 19. Claramente se observa que la pendiente de la curva, expresada como dA/dC_i , mostró una caída drástica en PRS, reduciéndose a la mitad en condiciones de inundación respecto al control. Esta diferencia fue aún más pronunciada cuando se comparó con la eficiencia en plantas inundadas de *Nr* (2,7 veces mayor en *Nr*). No se encontraron diferencias significativas entre las pendientes de las curvas correspondientes a las plantas control e inundadas del mutante. Bajo condiciones de control, las plantas de *Nr* presentaron valores de dA/dC_i superiores a las de PRS (Tabla 8).

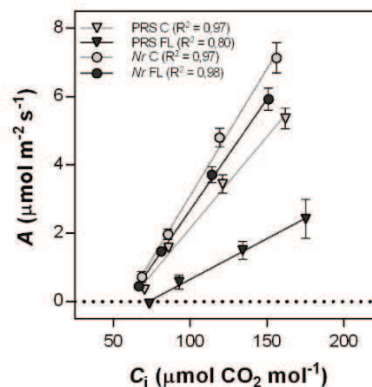


Figura 19. Eficiencia de carboxilación en terceras hojas de plantas de Pearson (PRS) y *Never ripe* (*Nr*) control (C) e inundadas (FL) al sexto día de inundación. Los símbolos representan la media y las barras el SEM ($n = 3$). Las líneas representan la regresión lineal.

Tabla 8. Eficiencia carboxilativa (dA/dC_i) a los 6 días de inundación en plantas de *Never ripe* (*Nr*) y Pearson (PRS) controles e inundadas. Los valores presentados son las medias de los respectivos tratamientos \pm SEM ($n = 3$).

	Control		Inundado	
	PRS	<i>Nr</i>	PRS	<i>Nr</i>
dA/dC_i	$0,054 \pm 0,003$ bA	$0,074 \pm 0,004$ aB	$0,024 \pm 0,004$ aA	$0,065 \pm 0,003$ aB

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo genotipo (C vs. FL), letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticas entre iguales tratamientos de diferentes genotipos (*Nr* vs. PRS) (t-test; $P < 0,05$; $n = 3$)

Los resultados del análisis de $V_{c_{max}}$ (Figura 20) revelaron que, en condiciones de inundación, en las plantas de PRS la tasa de carboxilación máxima de la enzima Rubisco se redujo a la mitad respecto a los controles (de $48,64 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $23,25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mientras que en *Nr* no hubo diferencias significativas con su control. En la comparación con PRS, *Nr* mantuvo niveles de $V_{c_{max}}$ más elevados, siendo 1,5 y 2,7 veces mayor cuando se compararon plantas de los tratamientos C y FL respectivamente, y estas diferencias fueron estadísticamente significativas.

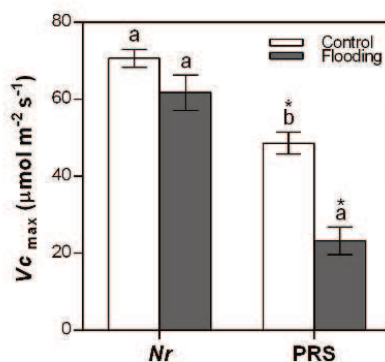


Figura 20. Eficiencia máxima de carboxilación de la enzima Rubisco ($V_{c_{max}}$) en terceras hojas de plantas de Pearson (PRS) y *Never ripe* (*Nr*) bien drenadas (Control) e inundadas (Flooding) al sexto día de inundación. Los valores mostrados son medias \pm SEM ($n = 3$). El análisis estadístico se realizó mediante t-test. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo genotipo (C vs. FL) y asteriscos indican diferencias estadísticas entre iguales tratamientos de distintos genotipos (*Nr* vs. PRS) ($P < 0,05$).

5.7. Análisis de carbohidratos en hojas

El análisis de contenido de azúcares solubles totales (AST) en hojas de PRS al día 6 no mostró diferencias estadísticas entre plantas de los tratamientos C y FL (Figura 21), mientras que en *Nr* la acumulación de azúcares en hojas de plantas provenientes del tratamiento FL duplicó el contenido de AST del tratamiento C (Figura 21), siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

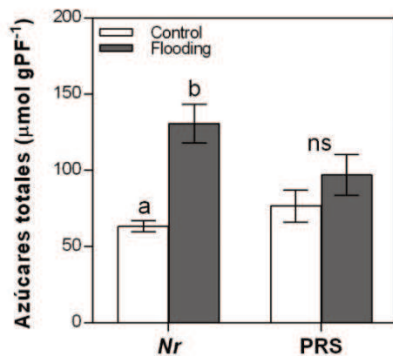


Figura 21. Contenido de azúcares solubles totales en terceras hojas de plantas de *Never ripe* (*Nr*) y Pearson (*PRS*) en condiciones de control (C) e inundación (Flooding) al cabo de 6 días de estrés. Los valores mostrados son medias \pm SEM ($n = 5$). El análisis estadístico se realizó mediante t-test. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo genotipo (C vs. FL) y asteriscos indican diferencias significativas entre iguales tratamientos de distintos genotipos (*Nr* vs. *PRS*) ($P < 0,05$).

Entre los carbohidratos solubles, el contenido de glucosa no se modificó entre hojas de plantas de los tratamientos FL y C en el genotipo PRS. Al contrario, en el genotipo *Nr*, las hojas de plantas provenientes del tratamiento FL acumularon niveles de glucosa significativamente mayores que las plantas del tratamiento C (Figuras 22A). Además, la diferencia entre *Nr* y PRS sometidas a estrés por inundación (FL) también fue estadísticamente significativa, siendo mayor en el genotipo mutante (Figura 22A).

La acumulación de fructosa se observó tanto en plantas inundadas de PRS como de *Nr* (Figura 22B). En el caso de *Nr*, el contenido de fructosa en plantas inundadas ha sido 4,6 veces mayor que en plantas del tratamiento C. En el genotipo PRS el tratamiento mediante el estrés por inundación también indujo la acumulación de fructosa, pero en una menor magnitud que en el caso del genotipo mutante. Mientras que el contenido de fructosa en plantas control fue menor en *Nr* respecto a PRS, la concentración medida en hojas de plantas inundadas fue significativamente mayor en el mutante (Figura 22B).

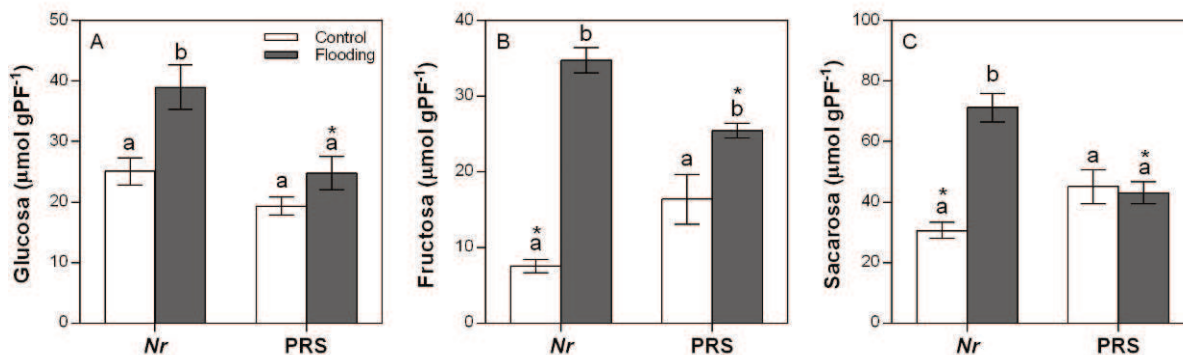


Figura 22. Análisis particionado del contenido de los azúcares glucosa (A), fructosa (B) y sacarosa (C) en terceras hojas de plantas de *Never ripe* (*Nr*) y Pearson (*PRS*) en condiciones de control (C) e inundación (Flooding) al cabo de 6 días de estrés. Los valores mostrados son medias \pm SEM ($n = 5$). El análisis estadístico se realizó mediante t-test. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo genotipo (C vs. FL), asteriscos indican diferencias entre iguales tratamientos de distintos genotipos (*Nr* vs. *PRS*) ($P < 0,05$).

El contenido de sacarosa en *Nr* también fue modificado en respuesta a la inundación (FL), habiéndose medido fuertes incrementos en comparación con el tratamiento C (Figuras 22C). En el genotipo PRS, en cambio, no hubo diferencias en el contenido de sacarosa en hojas. Cuando se compararon estadísticamente los genotipos, se halló que el contenido de sacarosa en hojas de los controles de PRS superaba significativamente a *Nr*, pero en condiciones de inundación fue el mutante quién tuvo un mayor contenido de sacarosa.

5.8. Análisis del contenido de proteínas y actividad proteásica total

A los 6 días de iniciado el experimento, los contenidos de proteínas solubles totales en hojas de los genotipos PRS y *Nr* tuvieron una significativa reducción en el tratamiento FL (Figura 23). A pesar de esto, el contenido proteico en las hojas de las plantas *Nr* provenientes del tratamiento FL fue 1,6 veces mayor a las hojas del genotipo PRS. La comparación de las plantas de los tratamientos C de ambos genotipos también indicó diferencias estadísticas, siendo mayor en el mutante.

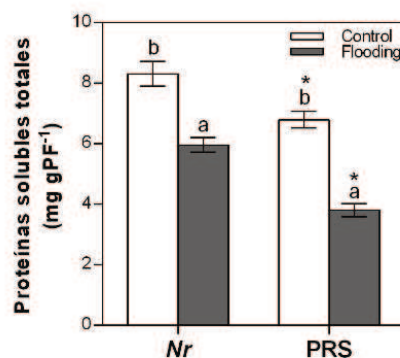


Figura 23. Contenido de proteínas solubles totales en terceras hojas de plantas bien drenadas (Control) e inundadas (Flooding) de Pearson (PRS) y *Never ripe* (*Nr*) al cabo de 6 días de inundación. Los valores mostrados son medias \pm SEM ($n = 5$). El análisis estadístico se realizó mediante t-test. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo genotipo (C vs. FL) y asteriscos indican diferencias significativas entre iguales tratamientos de distintos genotipos (*Nr* vs. PRS) ($P < 0,05$).

Los resultados de la prueba para la determinación de la actividad proteolítica total en los tejidos foliares al cabo de 6 días de inundación, se presentan en la Figura 24. El estrés por inundación (FL) produjo un aumento significativo de la actividad de las enzimas vinculadas a la degradación de las proteínas en *Nr* y PRS, respecto a las plantas del tratamiento control (C). Sin embargo, el aumento de la actividad proteásica en hojas de plantas inundadas en el genotipo PRS resultó 1,3 veces mayor que en *Nr*.

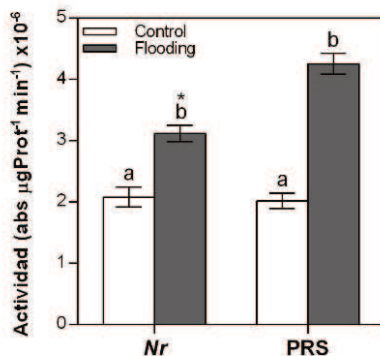


Figura 24. Actividad proteásica total en terceras hojas de plantas bien drenadas (Control) e inundadas (Flooding) de Pearson (PRS) y *Never ripe* (Nr) al cabo de 6 días de inundación. Los valores mostrados son medias \pm SD ($n = 5$). El análisis estadístico se realizó mediante t-test. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo genotipo (C vs. FL) y asteriscos indican diferencias entre iguales tratamientos de distintos genotipos (Nr vs. PRS) ($P < 0,05$).

5.9. Análisis del contenido de la enzima Rubisco

A los 6 días de iniciado el experimento, se observó una reducción del contenido de Rubisco (ambas subunidades) en los dos genotipos estudiados de las plantas del tratamiento FL en comparación a C (Figura 25). El contenido de RbcL en hojas de Nr fue 1,6 y 1,42 veces mayor que el de PRS cuando se compararon tratamientos inundados (FL) y controles (C), respectivamente. Para ninguno de los tratamientos evaluados se observaron diferencias significativas para el contenido de RbcS de Nr y PRS.

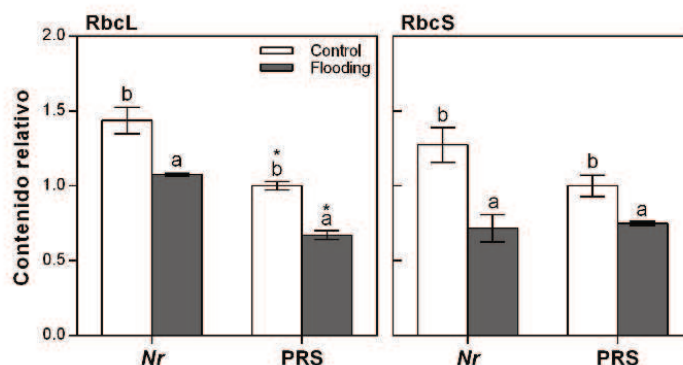


Figura 25. Contenido relativo de subunidad grande (RbcL, banda de 56kD) y pequeña (RbcS, banda de 14kD) en terceras hojas de plantas bien drenadas (Control) e inundadas (Flooding) de Pearson (PRS) y *Never ripe* (Nr) al cabo de 6 días de inundación. Los valores son relativos al contenido en plantas control de PRS. Los valores mostrados son medias \pm SD ($n = 3$) obtenidos del análisis del SDS-PAGE con Gel Analyzer. El análisis estadístico se realizó mediante t-test. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo genotipo (C vs. FL) y asteriscos indican diferencias significativas entre iguales tratamientos de distintos genotipos (Nr vs. PRS) ($P < 0,05$).

5.10. Análisis de la expresión de CYP1, CYP2, CYP3, RbcL y RbcS

El resultado del análisis de las PCR en tiempo real para los genes estudiados en esta oportunidad se representó en la Figura 26. Luego de 6 días de iniciado el experimento, se observó un importante aumento de la transcripción de los genes que codifican para la síntesis de las proteasas

CYP1, *CYP2* y *CYP3* en las plantas inundadas (FL) del genotipo PRS respecto a las plantas del tratamiento control (C) (8,9, 5,5 y 3,5 veces mayores para *CYP1*, *CYP2* y *CYP3* respectivamente). En *Nr*, si bien hubo un aumento en los niveles de transcripción de *CYP1* y *CYP2*, estos fueron de tan solo 2 y 1,3 veces respecto al control, mientras que *CYP3* no se modificó. Los niveles de expresión en las plantas inundadas de PRS fueron 3,5 (*CYP1*), 3,12 (*CYP2*) y 3,7 (*CYP3*) veces mayores que en *Nr* (Figura 26).

En el caso del gen que codifica la sub-unidad más grande de la enzima Rubisco (*RbcL*), la inundación produjo la disminución de los niveles de expresión en ambos genotipos, siendo 0,7 (PRS) y 0,5 (*Nr*) veces menores respecto a los controles (Figura 26). El gen que codifica la sub-unidad más pequeña de la enzima (*RbcS*) también manifestó una reducción semejante en las plantas de PRS (0,7) aunque en *Nr* no hubo diferencias entre las plantas de los tratamientos C y FL. Entre los genotipos, tanto *RbcL* como *RbcS* mostraron menores niveles de expresión en plantas control de *Nr* con respecto a PRS, mientras que en aquellas que fueron inundadas la expresión de los dos genes fue siempre mayor en *Nr* que en PRS (*RbcL* 1,2 y *RbcS* 2,3).

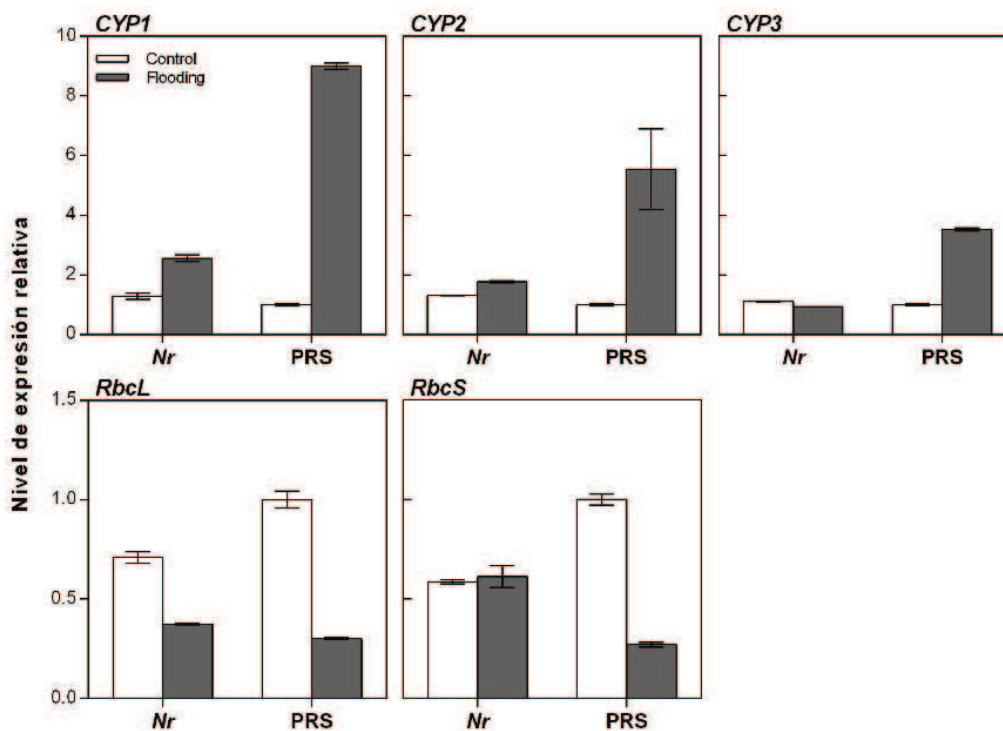


Figura 26. Niveles de transcripción de *CYP1*, *CYP2*, *CYP3*, *RbcL* y *RbcS* en la tercera hoja de plantas de Pearson (PRS) y *Never ripe* (*Nr*) en condiciones de control (Control) e inundadas (Flooding) al cabo de 6 días de inundación. Por cada gen los valores son relativos al nivel de expresión en plantas control de PRS. Los valores mostrados son medias \pm SD.

6. DISCUSIÓN

La inundación del suelo representa uno de los efectos de las precipitaciones extremas que más afectan las áreas agrícolas en muchas regiones del mundo (141). En Argentina la ocurrencia de importantes episodios de inundación tiene un gran impacto sobre la economía de las principales zonas agrícolas durante los últimos años. En horticultura, y particularmente en el cultivo de tomate, es frecuente el anegamiento anual en áreas productivas del Litoral y Noreste del país, principalmente durante el período primavera-estival. Una de las respuestas más tempranas en plantas de tomate sometidas a inundación es la producción de etileno (184). A partir de la síntesis de esta hormona se desencadenan una serie de mecanismos que tienen efectos contrapuestos. En una primera instancia, se inician respuestas de aclimatación que permiten a la planta superar transitoriamente el estrés por exceso hídrico, mientras que posteriormente, un nuevo incremento en la síntesis endógena de etileno, induce cambios que pueden perjudicar procesos vitales para el vegetal (63). Coincidentemente con esto, los resultados aquí expuestos indican que una menor sensibilidad al etileno otorgaría a la planta de tomate la posibilidad de mantener la funcionalidad del fotosistema y la capacidad fotosintética durante más tiempo ante dicho estrés, demostrando su rol central como inductor de la senescencia foliar prematura debida a la inundación.

6.1. Una menor sensibilidad al etileno aumenta la retención de los pigmentos en hojas durante la inundación

La pérdida de clorofila en hojas de plantas inundadas es una de las evidencias más claras y fáciles de apreciar del proceso de senescencia anticipada. Existen antecedentes documentados de este fenómeno en muchas especies de plantas, como por ejemplo en arroz (50); *Eugenia uniflora* (122); alfalfa (168) incluyendo también a tomate (55; 76 en hipoxia radical). En este trabajo se observó que las hojas de las plantas inundadas del mutante *Never ripe* (*Nr*) tuvieron un color verde más intenso que las del genotipo PRS (Fig. 11). Esto a su vez, se correspondió además con un contenido de clorofila similar al de sus respectivos controles (Fig. 12A). En el genotipo salvaje PRS, la pérdida de pigmentos fue evidente durante el período de estrés por inundación evaluado. La conservación de los pigmentos fotosintéticos en condiciones de estrés, es considerada como un parámetro que encuentra estrecha relación con la tolerancia de muchas especies vegetales a la inundación. Esta correlación fue encontrada en especies de cítricos (5); *Taxodium sp.* (78); soja (135) y arroz (60; 170). Ezin *et al.*, (55) han encontrado que las variedades de tomate más tolerantes a la inundación fueron aquellas que mantuvieron sus niveles de clorofila en valores similares a los que poseían plantas bien drenadas.

En base a los resultados obtenidos se podría suponer que la menor sensibilidad al etileno hizo posible que las plantas de *Nr* mantengan el contenido foliar de clorofila prácticamente sin alteración durante la inundación (Fig. 11B). Esta situación constituiría una ventaja adaptativa frente a condiciones desfavorables respecto a plantas con una respuesta normal a la hormona. Esta

idea encuentra además soporte en otros trabajos de investigación. Por ejemplo, Grichko y Glick (66) han realizado un interesante estudio de tolerancia a la inundación en plantas de tomate mediante el uso de plantas transgénicas que expresan el gen bacteriano de la ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa, enzima que desactiva el precursor del etileno. Estos autores no lograron evitar la degradación de clorofilas durante la inundación de las plantas transgénicas con menores niveles de ACC endógeno, sin embargo, encontraron concentraciones de clorofila mayores en las plantas con genes foráneos que en las no transformadas.

Una alternativa al empleo de mutantes en estudios hormonales en plantas, es el uso de inhibidores específicos de la síntesis o percepción del etileno, los cuales interfieren en las rutas de señalización de la hormona. En este trabajo, al utilizar AVG, se observó que luego de suministrar este inhibidor de la síntesis de etileno al momento de iniciar la inundación, provocó una atenuación en la reducción del índice SPAD en las plantas del genotipo Ailsa Craig (AC) en el tratamiento con inundación (Fig. 13). Ella *et al.*, (50) también han logrado reducir la degradación de clorofila en condiciones de inundación, pero utilizando en este caso el bloqueo de los receptores del etileno en plántulas de arroz tratadas con 1-Metilciclopropeno (1-MCP).

Por lo tanto, en base a las pruebas realizadas en este trabajo y a estudios precedentes con plantas transgénicas con menores niveles endógenos del gas (66), se puede considerar que cuando las plantas de tomate se encuentran sumergidas parcialmente en agua, el etileno desempeña una función clave en la disminución del contenido de clorofila. En los genotipos con síntesis normal de etileno y sin la utilización de inhibidores como lo es por ejemplo el uso del genotipo PRS, es posible que la mayor pérdida de clorofila en plantas sometidas a condiciones de estrés por inundación, tenga relación con una mayor actividad de enzimas clorofilasas, inducidas por el etileno (50). De todos modos, el hecho de que hasta el momento (este trabajo y reportes citados anteriormente) no haya sido posible bloquear completamente la pérdida de clorofila durante la inundación, podría indicar también que existen otros factores, no necesariamente vinculados a la señalización mediada por la hormona, que participarían en la pérdida de clorofila, por ejemplo altas concentraciones de ABA (102) o sobreproducción de ROS (Fig. 16) (115).

La relación Chl *a/b* puede considerarse como un índice de la cantidad relativa entre los centros de reacción (RC) de los fotosistemas y los complejos clorofila-proteínas cosechadores de luz (LHC) (128). Las condiciones de inundación llevaron a una reducción de Chl *a/b*, pero dicho parámetro se mantuvo superior en *Nr* respecto a PRS (Fig. 12B), lo que podría estar indicando mayor proporción de Chl *a* en el mutante y, por ende, mejor capacidad de transporte electrónico y eficiencia fotosintética en el uso de la energía incidente durante la inundación (120; 164). Este hecho podría relacionarse directamente con una mayor tolerancia al estrés (168).

En algunas situaciones desfavorables para la planta resulta imposible utilizar toda la energía absorbida por las clorofilas en los procesos fotoquímicos (81). En estas situaciones, el excedente

energético puede ser potencialmente muy peligroso, pudiendo ocasionar foto-inhibición y estrés oxidativo severo en las plantas (133). Se observó que la energía contenida en los electrones excitados por los fotones de luz, puede ser absorbida por los pigmentos carotenoides, los que además de su función como pigmentos accesorios, actúan como fotoprotectores (40). De esta manera, la función que desempeñan estos pigmentos, contribuye a disipar el exceso de energía no utilizada en la fotosíntesis, en forma de calor (175). La disminución en el contenido de carotenoides en las plantas del genotipo PRS durante la inundación (Fig. 12C) se condice con los resultados presentados por Kläring y Zude (97) en plantas de tomate sensibles (AC) en condiciones similares. La menor sensibilidad al etileno, aparentemente ha permitido que las hojas de *Nr* mantengan los niveles de carotenoides al sexto día de iniciado el estrés por inundación, a niveles comparables a los de las plantas del tratamiento control (Fig. 12C). La relación del etileno con la degradación de carotenoides ya fue demostrada por Alexieva *et al.*, (4). Estos resultados, además del aumento de la relación Car/Chl (*a+b*) medido en *Nr* (Fig. 12D), son indicios de una menor actividad degradativa de los pigmentos accesorios de los complejos antenas del fotosistema II fotosintético, como así también de una mayor capacidad para la disipación de la energía excedente de los mismos. Así como fuera propuesto Moles *et al.*, (130), los cambios observados en las relaciones Car/Chl (*a+b*) y Chl *a/b* indican reordenamientos en la estequiometría del núcleo de PSII y sus complejos asociados LHCI que podrían estar vinculados a procesos que promuevan una mejor disipación de la energía excedente.

6.2. Una menor sensibilidad al etileno aumenta la tolerancia a la foto-inhibición en plantas inundadas

Los resultados presentados en este trabajo evidenciaron un fuerte impacto del estrés por inundación sobre los principales parámetros de la fluorescencia analizados (Figs. 14 y 15). Esto, en primera instancia, reafirma los antecedentes que indican la alta sensibilidad de las plantas de tomate a la inundación (22; 53).

La caída temprana de Φ_{PSII} observada en los dos genotipos estudiados en esta oportunidad (Fig. 14A) podría originarse a partir del cierre estomático (Fig. 17A; Anexo III), en concordancia con lo reportado por Else *et al.*, (53). Estos autores encontraron que aquellos parámetros de fluorescencia vinculados a la eficiencia fotoquímica del PSII, han demostrado tener correlación con la reducción de la conductividad estomática ($R^2 = 0,62$). De ser así, la menor eficiencia en la utilización de la fracción de luz absorbida por el PSII para los procesos fotoquímicos de las hojas adaptadas a la luz, podría estar relacionada con una disponibilidad limitada de CO_2 y consecuente disminución del transporte electrónico fotosintético (134).

La reducción de F_v/F_m en las plantas inundadas ha sido significativa (Fig. 14B), siendo éste un comportamiento ya observado por otros autores (22; 53; 55). En esta oportunidad, los valores registrados de F_v/F_m en las plantas estresadas de *Nr* y PRS fueron siempre inferiores a 0,830

(Anexo I y Fig. 15), límite considerado como indicador del buen estado de salud del PSII en plantas con metabolismo fotosintético C3 (89; 121; 134). Claramente la inundación ha inducido la foto-inhibición, o directamente un daño foto-oxidativo, de los centros de reacción de las clorofilas, pudiendo haber afectado además las membranas de los tilacoides y el sistema transportador de electrones, lo que contribuiría también al decaimiento de Φ_{PSII} . Un comportamiento similar fue reportado por Kläring y Zude (97) tanto en plantas de tomate sensibles a la hipoxia radical, como en aquellas que mejor se adaptaron a dicho estrés; y por Bhatt *et al.*, (22) en plantas de tomate no injertadas (sensibles) e injertadas sobre berenjena (tolerantes) durante la inundación. Esto explicaría que a pesar de que la caída de F_v/F_m haya ocurrido en *Nr* y en PRS, no necesariamente haya representado una igual afectación de la hoja y el fotosistema en ambos genotipos. Los valores de F_v/F_m y Φ_{PSII} durante la inundación han demostrado ser significativamente mayores en *Nr* que en PRS (Anexo I), indicando un mejor estado de los centros de reacción del PSII y mayor eficiencia en la utilización de la luz en los procesos fotoquímicos en el mutante (134; 201). Como ya se mencionó anteriormente, la mayor relación Chl *a/b* observada en las terceras hojas de *Nr* (Fig. 12B), podría ser uno de los motivos que conllevan al mayor Φ_{PSII} en el mutante durante la inundación (120), revelando una mayor capacidad de transporte electrónico asociada con el mayor contenido de Chl *a* relativo a la Chl *b* (164). Para analizar el F_v/F_m podría utilizarse como referencia el valor límite de 0,781 de dicho parámetro propuesto por Ezin *et al.*, (55) para clasificar diferentes variedades de tomate como más tolerantes a la inundación, observando que las hojas de plantas de *Nr* inundadas permanecieron durante toda la prueba con un F_v/F_m superior a éste (Anexo I). Algo similar resulta cuando se compara con el F_v/F_m de 0,760 que mostró la mejor combinación pie-injerto (berenjena-tomate) respecto a la plasticidad fisiológica para sobreponerse a la inundación (22). Es posible que estas diferencias entre el mutante y las plantas sensibles al etileno se generen a partir de la pérdida de clorofila (Fig. 12) y reducción del contenido de proteínas (Fig. 23), con un marcado efecto sobre la estabilidad de los complejos cosechadores de luz y la posterior transferencia de energía de los electrones al retornar a su orbital normal. De esta manera, se asume también un posible efecto indirecto de la hormona sobre los parámetros de la fluorescencia. Esto se sostiene además con los resultados obtenidos al bloquear la producción de etileno mediante el uso de AVG lo cual permitió mantener mayor F_v/F_m durante la inundación (Fig. 15). Se debe mencionar que, pese a que las plantas de AC inundadas que no fueron tratadas con AVG no mostraron diferencia estadística significativa respecto a las tratadas con el inhibidor, su F_v/F_m de 0,359 indicó que estas hojas habían alcanzado un grado muy avanzado de senescencia y, probablemente, hayan estado muertas al 6 DDI (Scartazza 2017, comunicación personal).

Al no contar las plantas estresadas de PRS con mecanismos eficientes de protección frente al exceso energético, podría incrementarse en este genotipo la sensibilidad a daños importantes en el aparato fotosintético, como ya fue observado en otras especies sensibles a la inundación (197).

En ese sentido se debe destacar otra diferencia importante entre genotipos, y la misma se encuentra a nivel de los mecanismos disipadores de la energía en forma de calor, principalmente el NPQ. La respuesta al estrés con un aumento del NPQ fue casi inmediata en las plantas inundadas de *Nr* (Fig. 14C), al mismo momento en que se detectó la reducción de F_v/F_m (2DDI) (Fig. 14B). No fue así en PRS, donde el NPQ no mostró una respuesta clara durante toda la prueba (Fig. 14C). Un comportamiento similar fue observado en *Physocarpus* por Zhang *et al.*, (201), donde la tolerancia a la inundación se vinculó a una mayor actividad fotoquímica del PSII, y una menor caída de F_v/F_m acompañada por el aumento del NPQ. La eficiencia de la disipación de la energía y los mecanismos de foto-protección, son esenciales para la optimización del uso de la radiación, como así también para evitar la foto-inhibición y foto-degradación (164), repercusiones comunes de muchos tipos de estrés. La energía que no encuentra salida por vías fotoquímicas (evidenciado por la reducción de Φ_{PSII}) pareciera no poder canalizarse desde un primer momento a través del NPQ en las plantas de PRS, lo que conduciría a la foto-inhibición de los centros de reacción (89). Esto también podría ser uno de los motivos causales de la alta producción de ROS (Fig. 16), las cuales afectarían la estabilidad y funcionalidad de las membranas y componentes celulares (3; 53). La mayor operatividad del mecanismo NPQ en *Nr* podría relacionarse con los cambios observados en los pigmentos (Fig. 12). La no variación de Chl ($a+b$) en *Nr* supondría un mejor estado de los complejos de clorofilas que conforman las antenas cosechadoras de luz, a través de las cuales también es operativo el *quenching* no fotoquímico (158). Sumado a esto, debido a la menor degradación de Car en *Nr* (Fig. 12C) se presumiría que la planta cuenta con vías potencialmente más eficientes para la foto-protección en base a la propiedad de los carotenoides como disipadores térmicos de la energía (43; 45; 175). Existe una interacción entre clorofilas y carotenoides durante el proceso del *quenching* no fotoquímico (75) que podría vincular el mayor contenido de ambos pigmentos en el mutante con la actividad del NPQ. Además, el incremento de la relación Car/Chl ($a+b$) en hojas de *Nr* al sexto día de inundación (Fig. 12D), podría sugerir que los cambios ocurridos a nivel de las clorofilas constituyen en ese caso una respuesta adaptativa que, junto a un elevado NPQ y en base a la relación existente entre ambos parámetros, darían evidencias claras de un activo sistema de disipación de energía no radiativa (164).

6.3. El etileno aumenta las limitaciones no estomáticas de la fotosíntesis en inundación

La fuerte reducción de la conductividad estomática (g_s) a causa de la inundación que se observó en los dos genotipos (Fig. 17A; Anexo III) constituyó una evidencia directa de la ocurrencia del cierre estomático. Esta respuesta temprana al estrés observada en tomate podría constituir un mecanismo inicial de una respuesta plástica que posibilita a la planta mantener el estado hídrico y turgencia de los tejidos cuando la funcionalidad de las raíces se reduce (22; 25; 53; 76). Este fuerte cierre estomático pudo haber limitado el intercambio de gases provocando, al menos

inicialmente, la disminución de la tasa de asimilación neta del carbono (A) tanto en Nr como en PRS (Fig. 17B; Anexo III) (53; 70; 135; 198). La caída temprana de A al inicio del período de estrés es otro indicador de la alta sensibilidad de la especie a la inundación (22). Por lo tanto, y aunque inicialmente la menor conductancia medida permite mantener un adecuado estado hídrico de la planta, posteriormente el mantenimiento de los estomas abiertos durante el estrés podría constituir un factor clave para la supervivencia del vegetal (5; 22; 78; 201).

Las diferencias observadas en los valores de la eficiencia del uso hídrico intrínseca (A/g_s) entre Nr y PRS podrían ser comparables con el comportamiento reportado en algunas especies tolerantes y sensibles a la inundación respectivamente (122). La mayor relación de A/g_s en plantas estresadas de Nr respecto a PRS (Fig. 18; Anexo III) junto a la mayor eficiencia de la asimilación de carbono (dA/dC_i) observada en tales condiciones (Fig. 19 y Tabla 8), demostraría una mayor plasticidad fisiológica del aparato fotosintético para aclimatarse a la inundación del suelo (111), capacidad que estaría relacionada a la menor sensibilidad al etileno.

La reducción de A y C_i (Fig. 17B y C; Anexo III), así como el fuerte aumento de A/g_s en Nr durante la inundación, constituyen una señal muy clara de que las limitaciones estomáticas podrían tener un papel predominante sobre la restricción de la fotosíntesis (130) ante una menor sensibilidad al etileno. De todos modos, se debe aclarar que esto no excluye totalmente la posibilidad de que coexistan también ciertas limitantes no estomáticas en el mutante, así como se ha reportado en el caso de algunas especies tolerantes (72). En las plantas de PRS no se observó el mismo comportamiento, pudiendo en parte ser debido a otros aspectos que no serían exclusivamente vinculados con la funcionalidad estomática.

Los altos niveles de C_i en plantas inundadas de PRS observados a partir de las mediciones instantáneas obtenidas mediante el Sistema de Intercambio Gaseoso de la hoja (del inglés IRGA) (Fig. 17C; Anexo III), indican la existencia de algún tipo de limitación no estomática que afecta la actividad fotosintética durante el estrés (197). Resultados similares fueron encontrados en variedades de tomate sensibles a la inundación (22; 25; 53). Estos autores indicaron que la reducción de g_s , producto del cierre estomático, acarrea consigo el incremento de C_i , la alteración del normal funcionamiento del PSII y una menor fijación del CO_2 atmosférico. Además, y en relación a este tema, se sugirió que la inhibición de A no explicada por la caída de g_s en plantas inundadas, podría deberse a los cambios a nivel enzimático y eficiencia de la carboxilación, clorosis, senescencia foliar, conductancia del mesófilo y abscisión (8; 70; 104; 122). El conjunto de estos factores representa limitaciones no estomáticas de la fotosíntesis. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se observó que dicho comportamiento no fue encontrado en el genotipo Nr , donde la C_i de plantas inundadas se redujo sustancialmente desde el segundo día de la prueba respecto al tratamiento control, manteniéndose así hasta el último día (Anexo III).

A partir del análisis de la curva de respuesta $A-C_i$ (Fig. 19) se concluyó que la reducción de A en plantas inundadas de PRS obedeció a una menor eficiencia de carboxilación (dA/dC_i) de la enzima

Rubisco, comportamiento que no se reflejó en Nr , al menos hasta los niveles de C_i estudiados (Tabla 8). Esto sugiere la posibilidad de vincular al etileno con la pérdida de funcionalidad de la ruta de carboxilación, afectando la capacidad fotosintética potencial de la hoja ($V_{c_{max}}$; Figura 20). En Nr , en cambio, la disminuida capacidad de percepción del etileno hizo que dA/dC_i y $V_{c_{max}}$ no se afectaran durante la inundación. Podrían proponerse entonces algunas alternativas para comprender las respuestas observadas: 1. durante la inundación el etileno induce la degradación de Rubisco mediante un incremento en la actividad proteolítica; 2. a través de la señalización mediada por la hormona se interrumpe la vía de síntesis de Rubisco; 3. se afecta su grado de activación a través de una menor actividad de la Rubisco activasa; 4. existen otras limitaciones que también inhiben la actividad de la Rubisco.

6.4. El etileno producido durante la inundación induce la expresión de genes de cisteín-proteasas y promueve la degradación de la enzima Rubisco

Durante la inundación es común la degradación de proteínas foliares (70; 196; 197), lo que constituye un indicador importante del grado de senescencia de la hoja. En el trabajo realizado aquí, se pudo observar que ambos genotipos de tomate presentaron una reducción del contenido de proteínas solubles totales, aunque el contenido proteico en hojas de plantas inundadas de PRS fue menor que el de Nr (Fig. 23). Esta disminución tuvo relación con un fuerte incremento de la actividad proteolítica durante el estrés, superior en PRS en comparación a Nr (Fig. 24). Podría inferirse entonces que la disminución en el contenido total de proteínas foliares de plantas inundadas de PRS fue debido, al menos en parte, a una importante actividad enzimática degradativa. Al parecer, el etileno no sería el único iniciador de la actividad proteolítica durante la inundación, pero posiblemente tenga un efecto como acelerador o potenciador sobre dicho proceso y, por tanto, sobre la senescencia foliar prematura durante este estrés (3). Todos estos resultados han mostrado a su vez correspondencia con aquellos obtenidos a partir del estudio de expresión génica (Fig. 26). Los genes *CYP1*, *CYP2* y *CYP3* son responsables de la codificación de algunas cisteín-proteasas y estarían vinculados a la senescencia en hojas de tomate (47). En este trabajo se pudo determinar que las expresiones de dichos genes fueron fuertemente incrementadas a causa del estrés por inundación en el genotipo PRS pero no en Nr , lo que sugeriría una relación casi directa con la percepción del etileno en el primer caso. Sumado a estos resultados, se tienen referencias de que el etileno tiene efecto sobre la inducción de proteasas durante la senescencia foliar (36; 47; 88). Respecto a la variación individual de cada una de las tres proteasas, es muy difícil realizar conjeturas válidas sobre los factores que la determinan, ya que su expresión es controlada mediante diferentes mecanismos reguladores (47). Considerando que la proteína más abundante en las plantas es la enzima Rubisco, y teniendo en cuenta los resultados comentados anteriormente, en combinación con aquellos que indicaron una disminución importante de dA/dC_i y $V_{c_{max}}$, podría inferirse que la pérdida de funcionalidad del

sistema fotosintético inducido por el etileno en plantas de tomate inundadas, pueda deberse a la combinación de la degradación de clorofilas y de la enzima Rubisco, en concordancia con la primera de las alternativas propuestas en el apartado anterior. El análisis del contenido de las subunidades grande (RbcL) y pequeña (RbcS) de la Rubisco (por SDS-PAGE) mostró una reducción de las mismas a causa de la inundación (Fig. 26). El menor contenido de RbcL en PRS inundado respecto a *Nr* contribuiría a la idea de que la degradación enzimática de Rubisco sea uno de los motivos que condicionaron la menor eficiencia de carboxilación en PRS observada en las pruebas de intercambio gaseoso (Tabla 8 y Figura 20). La mayor $V_{c_{max}}$ en las plantas inundadas de *Nr* (similares al control) podrían tener relación con el mayor contenido de Rubisco observado y/o a un nivel superior de activación de la enzima durante la inundación, tal como se ha demostrado en otras oportunidades (113). En este punto también se debe considerar la posibilidad de que el fuerte estrés oxidativo derivado de la alta producción de ROS en PRS (Fig. 16) afecte negativamente la estabilidad de la enzima Rubisco (3; 197).

Durante el estrés por inundación se ha demostrado que ocurre una disminución de la expresión de los genes relacionados a la síntesis de las dos sub-unidades de la Rubisco (3; 113; 142). Sin embargo, según nuestros resultados, la reducción de los transcritos de los genes *RbcL* y *RbcS* en tomate durante la inundación, ocurrirían en manera independiente de la percepción de etileno ya que no se observaron diferencias claras entre los niveles de expresión en PRS y en *Nr* (Fig. 26). Esto anularía la segunda hipótesis planteada anteriormente. También es posible que no exista una relación directa entre el contenido de la enzima y los niveles de expresión de los genes *RbcL* y *RbcS* durante la senescencia inducida por la inundación (Guiamet, 2018 comunicación personal). Los azúcares acumulados durante la inundación (Fig 21) podrían estar desempeñando un papel clave como reguladores metabólicos (135). Siendo así, la presencia de altos niveles de azúcares solubles en las hojas durante la inundación constituiría un mecanismo de retoalimentación o “feed-back” negativo (113; 171) ya que reprimen los genes asociados a la fotosíntesis (en inglés, genes PAG) a través del “sugar sensing”, un mecanismo de regulación mediado por la hexoquinasa (156). Como ejemplo de esto, se encontró que la acumulación de azúcares en hojas de *Chenopodium sp.*, papa y maíz reprimió la expresión del gen *RbcS* (161). De esta manera se podría suponer que durante la inundación la acumulación de azúcares en las hojas también ejerce algún efecto sobre represión de los genes observada en esta oportunidad. Tampoco puede desestimarse la posibilidad de que estos azúcares desempeñen un papel interesante en el sistema de detoxificación de las ROS (62; 130; 161).

El menor grado de activación de la enzima Rubisco en PRS se relacionaría también con los altos valores de C_i registrados en las plantas inundadas (Fig. 17C), ya que se existen mecanismos reguladores (para evitar el consumo excesivo de RuBP por ejemplo) o alteraciones metabólicas (cambio de pH y alto consumo de ATP por ejemplo) (3; 113; 160) que en estas condiciones podrían reducirlo. La regeneración de RuBP constituye otra limitante de A durante la inundación

en tomate (25), pero hasta ahora se desconoce la relación que pueda llegar a tener estos con el etileno. Por este motivo, se consideran también viables la tercera y cuarta hipótesis sobre la reducción de eficiencia de carboxilación, pudiendo ser objeto de investigaciones futuras.

Los resultados expuestos hasta aquí indican que el aumento de la producción de etileno durante la inundación (184) sería responsable de la disminución del contenido de proteínas en hojas de tomate, especialmente Rubisco, debido a la inducción de genes codificantes de algunas cisteín proteasas y consiguiente aumento de la actividad enzimática degradativa, lo cual afectaría negativamente a la fotosíntesis. Muy probablemente sea a través de la señalización mediada por el etileno la manera en la que se inicia el proceso de senescencia anticipada durante la inundación, la cual está vinculada a la removilización de las reservas, donde posiblemente el nitrógeno proteico sea el que ocupe el lugar más importante (35; 47; 192).

6.5. El etileno podría contribuir a la restitución de las relaciones fuente-destino entre la parte aérea y la sumergida durante la inundación

A pesar de la caída de A durante la inundación, se observó un aumento importante en el contenido de azúcares solubles totales (AST) en las hojas de *Nr* respecto al control, que se correspondió con incrementos igualmente importantes de las fracciones glucosa, fructosa y sacarosa, mientras que en PRS solamente aumentó la fracción fructosa (Fig. 21 y Fig. 22A-C). El alto contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en las terceras hojas de *Nr* durante la inundación no se ha correspondido con mayores tasas fotosintéticas respecto a PRS, por lo que la producción de fotoasimilados no podría dar explicaciones a éste fenómeno. Por ello se considera que la gran cantidad de azúcares en las hojas de *Nr* respecto a PRS al sexto día de inundación podría tener correspondencia con los cambios producidos en las relaciones fuentes:destinos durante el estrés. Posiblemente, la inhibición del flujo floemático desde el tallo hacia las raíces provoque la acumulación de azúcares en las hojas de *Nr*, tal como se reportó en varias oportunidades (70), mientras que la normal percepción del etileno en PRS posibilita la producción de un nuevo sistema radical adventicio (184) que reactiva el metabolismo aeróbico, reestableciendo las relaciones fuente-destino entre el tallo y las raíces luego de algunos días de inundación, por lo que los azúcares ya no se acumulan en las hojas, sino que inician un proceso de transporte hacia los órganos sumergidos donde serán metabolizados.

Las reservas de carbohidratos en los órganos de las plantas se correlacionan positivamente con el nivel de tolerancia a diferentes niveles de sumersión (84; 150) y pareciera vincularse con el retraso de la senescencia foliar en tomate (22), por lo que se considera importante profundizar en el estudio sobre la partición de las reservas en la planta y su metabolismo durante el estrés.

7. CONCLUSIONES

- Este trabajo constituye una primera aproximación en el estudio del efecto del etileno en la senescencia foliar de tomate durante la inundación, mediante el uso de plantas mutantes insensibles a la hormona y plantas normales tratadas con un inhibidor de su síntesis.
- El etileno aceleró los procesos degradativos relacionados a la senescencia foliar.
- Se determinó que la menor percepción y síntesis de etileno resultaron claves para la tolerancia al estrés por inundación en tomate.
- Una menor percepción del etileno, significó que la principal limitación de la fotosíntesis fue el cierre estomático, mientras que una normal sensibilidad a la hormona representó la ocurrencia de otras limitaciones del tipo no estomáticas.
- Una menor sensibilidad al etileno, representó a su vez una menor degradación de las clorofilas y carotenoides lo que posibilitó el mantenimiento activo de los principales mecanismos disipadores de la energía (fotoquímicos y no fotoquímicos).
- La normal percepción del etileno promovió la degradación proteica en hojas de plantas de tomate inundadas a través de un aumento de la expresión génica de algunas cisteín-proteasas y de la actividad proteolítica, lo que afectó la concentración de la enzima Rubisco, y en consecuencia la capacidad fotosintética de la hoja.
- El etileno fue clave en una mayor precocidad de la senescencia en condiciones de estrés por inundación de las plantas, ya que promovió cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares que aumentaron la vulnerabilidad de las plantas en estas condiciones.
- El uso de un genotipo con sensibilidad reducida al etileno permitió demostrar que el mismo posee una mayor capacidad de tolerar el estrés por inundación.

CONSIDERACIONES FINALES: Aspectos para investigaciones futuras.

- En futuros estudios se podría investigar más detalladamente el rol de etileno sobre la inducción de las enzimas implicadas en la degradación de los pigmentos y de qué manera se

modifican las relación fuente:destino durante la inundación, factores que podrían contribuir para una comprensión más detallada del proceso.

- Sería interesante estudiar el comportamiento de estos genotipos durante una etapa de recuperación post estrés, a fin de determinar el impacto de estos procesos inducidos por el etileno sobre la capacidad de supervivencia del vegetal y su productividad.
- El uso de inhibidores del etileno es una herramienta válida para este tipo de estudios, pero se debería dedicar mayor empeño en determinar las dosis, modo y momento de aplicación más adecuados para aumentar su efectividad.
- Los resultados aquí presentados, podrían servir al mejoramiento de la especie respecto a su capacidad de tolerar el estrés por inundación. Un mecanismo válido para ello sería realizar una selección de mutantes para los receptores del etileno, evaluando si alguno de ellos expresa la menor sensibilidad a la hormona solamente en hojas, y no en toda la planta, como ocurre en *Nr*. En una instancia posterior, mediante introgresión genética, se podría introducir el gen en el cultivar de interés. Otra alternativa podría ser utilizar técnicas genéticas de última generación (como el CRISPR, en inglés clustered regularly interspaced short palindromic repeats, en español repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas), que permitan editar los genes de una variedad de interés comercial, en búsqueda de frenar la senescencia con un promotor inducido por la hipoxia en estas condiciones.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abeles, F., Morgan, P. y Saltveit, M.Jr. (2012).** Ethylene in plant biology. Segunda edición. Academic Press, Inc., San Diego. 414p.
2. **AGENFOR (2019).** Tomates: el gobierno provincial ratifica fuerte respaldo a las cuencas productivas. Recuperado de: <https://agenfor.com.ar/tomates-el-gobierno-provincial-ratifica-fuerte-respaldo-a-las-cuencas-productivas/>. Consultado el 20/10/2019.
3. **Ahsan, N., Lee, D.G., Lee, S.H., Kang, K.Y., Bahk, J.D., Choi, M.S., Lee, I.J., Renaut, J. y Lee, B.H. (2007).** A comparative proteomic analysis of tomato leaves in response to waterlogging stress. *Physiologia Plantarum*, 131 (4), 555–570.
4. **Alexieva, V.S., Sergiev, I.G., Todorova, D.A., Karanov, E.N. y Smith, A. R. (2004).** Effect of ethylene and its antagonist 1-MCP on the senescence of detached leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum*, 48 (4), 593–595.
5. **Arbona, V., López-Climent, M.F., Pérez-Clemente, R.M. y Gómez-Cadenas, A. (2009).** Maintenance of a high photosynthetic performance is linked to flooding tolerance in citrus. *Environmental and Experimental Botany*, 66, 135–142.
6. **Aroca, R., Porcel, R. y Ruiz-Lozano, J.M. (2012).** Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 63 (1), 43–57.
7. **Ashraf, M.A. (2012).** Waterlogging stress in plants: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 7 (13), 1976–1981.
8. **Ashraf, M. y Rehman, H. (1999).** Interactive effects of nitrate and long-term waterlogging on growth, water relations, and gaseous exchange properties of maize (*Zea mays* L.). *Plant Science*, 144, 35–43.
9. **Atherton, J.G. y Harris, G.P. (1986).** Flowering. In *The tomato crop: A scientific basis for improvement* (eds. J.G. Atherton and J. Rudich), pp. 167–200. Chapman and Hall, New York.
10. **Azcón-Bieto y Talón (2013).** Fundamentos de fisiología vegetal. Segunda edición. Interamericana McGraw-Hill, Madrid. 669p.
11. **Bailey-Serres, J. y Voeselek, L.A. (2008).** Flooding Stress: Acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 313–39.
12. **Bailey-Serres, J., Lee, S.C. y Brinton, E. (2012).** Waterproofing crops: Effective flooding survival strategies. *Plant Physiology*, 160, 1698–1709.
13. **Balaguera, H.E., Salamanca, F.A., García, J.C. y Herrera, A. (2014).** Etileno y retardantes de la maduración en la poscosecha de productos agrícolas. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8 (2), 302–313.
14. **Barry, C.S. y Giovannoni, J.J. (2006).** Ripening in the tomato Green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signalling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (20), 7923–7928.

15. **Barry, C.S. y Giovannoni, J.J. (2007).** Ethylene and fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26, 143-159.
16. **Barry, C.S., Llop-Tous, M.I. y Grierson, D. (2000).** The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiology*, 123 (3), 979–986.
17. **Barry, C.S., McQuinn, R.P., Thompson, A.J., Seymour, G.B., Grierson, D. y Giovannoni, J.J. (2005).** Ethylene insensitivity conferred by the *Green-ripe* and *Never-ripe* 2 ripening mutants of tomato. *Plant Physiology*, 138 (1), 267–275.
18. **Battelli, R., Lombardi, L., Rogers, H.J., Picciarelli, P., Lorenzi, R. y Ceccarelli, N. (2011).** Changes in ultrastructure, protease and caspase-like activities during flower senescence in *Lilium longiflorum*. *Plant Science*, 180 (5), 716–725.
19. **Bergougnoux, V. (2014).** The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32 (1), 170–189.
20. **Berlanga, D.I., Guerrero, V.M. y Ornelas, J.J. (2011).** Productos alternativos a la aminoetoxivinilglicina para el control de la producción de etileno en manzana “Golden Delicious.” *Tecnociencia Chihuahua*, 5 (2), 83–89.
21. **Bertello, F. (2017).** Las inundaciones ya afectan 10 millones de hectáreas del área productiva. *La Nación*. Recuperado de: <https://www.lanacion.com.ar/2062027-las-inundaciones-ya-afectan-10-millones-de-hectareas-del-area-productiva>. Consultado el 8/11/2018.
22. **Bhatt, R.M., Upreti, K.K., Divya, M.H., Bhat, S., Pavithra, C.B. y Sadashiva, A.T. (2015).** Interspecific grafting to enhance physiological resilience to flooding stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Scientia Horticulturae*, 182, 8–17.
23. **Blankenship, M. y Dole, J.M. (2003).** 1-Methylcyclopropane: a review. *Postharvest Biology and Technology*, 28, 1–25.
24. **Bouzayen, M., Felix, G., Latché, A., Pech, J.C. y Boller, T. (1991).** Iron: An essential cofactor for the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Planta*, 184, 244-247.
25. **Bradford, K.J. (1983).** Effects of soil flooding on leaf gas exchange of tomato plants. *Plant Physiology*, 73 (2), 475–479.
26. **Bradford, K.J. y Hsiao, T.C. (1982).** Stomatal behavior and water relations of waterlogged tomato plants. *Plant Physiology*, 70, 1508–1513.
27. **Bradford, K.J., Hsiao, T.C. y Yang, S.F. (1982).** Inhibition of ethylene synthesis in tomato plants subjected to anaerobic root stress. *Plant Physiology*, 70, 1503–1507.
28. **Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

29. **Breeze E., Harrison E., McHattie S., Hughes L., Hickman R., Hill C., Kiddle S., Kim Y.S., Penfold C.A., Jenkins D., Zhang C., Morris K., Jenner C., Jackson S., Thomas B., Tabrett A., Legaie R., Moore J.D., Wild D.L, Ott S., Rand D., Beynon J., Demby K., Mead A. y Buchanan-Wollaston V. (2011).** High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of process and regulation. *Plant Cell*, 23, 873-894.
30. **Bresson, J., Bieker, S., Riester, L., Doll, J. y Zentgraf, U. (2017).** A guideline for leaf senescence analyses: from quantification to physiological and molecular investigations. *Journal of Experimental Botany*. 18p.
31. **Broun, R. y Mayak, S. (1981).** Aminooxyacetic acid as an inhibitor of ethylenesynthesis and senescence in carnation flowers. *Scientia Horticulturae*, 15 (3), 277–282.
32. **Caser, M., Angiolillo, F.D., Chitarra, W., Lovisolo, C., Ruffoni, B., Pistelli, L., Pistelli L. y Scariot, V. (2016).** Water deficit regimes trigger changes in valuable physiological and phytochemical parameters in *Helichrysum petiolare* Hilliard & B.L. Burt. *Industrial Crops & Products*, 83, 680–692.
33. **Castagnino, A.M. (2008).** Manual de cultivos hortícola innovadores. Primera edición. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 260p.
34. **Chen, G.H., Qualls, R.G. y Blank, R.R. (2005).** Effect of soil flooding on photosynthesis, carbohydrate partitioning and nutrient uptake in the invasive exotic *Lepidium latifolium*. *Aquatic Botany*, 82, 250–268.
35. **Chen, G.H., Huang, L.T., Yap, M.N., Lee, R.H., Huang, Y.J., Cheng, M.C. y Chen, S.C. (2002).** Molecular characterization of a senescence-associated gene encoding cysteine proteinase and its gene expression during leaf senescence in sweet potato. *Plant & Cell Physiology*, 43 (9), 984–991.
36. **Chen, H.J., Huang, D.J., Hou, W.C., Liu, J.S., Lin, Y.H. (2006).** Molecular cloning and characterization of a granulin-containing cysteine protease *SPCP3* from sweet potato (*Ipomoea batatas*) senescent leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 163, 863-876.
37. **Chen, Y.F., Etheridge, N. y Schaller, G. E. (2005).** Ethylene signal transduction. *Annals of Botany*, 95 (6), 901–915.
38. **Cheng, Y., Dong, Y., Yan, H., Ge, W., Shen, C. y Guan, J. (2012).** Effects of 1-MCP on chlorophyll degradation pathway-associated genes expression and chloroplast ultrastructure during the peel yellowing of Chinese pear fruits in storage. *Food Chemistry*, 135 (2), 415–422.
39. **Ciardi, J. y Klee, H. (2001).** Regulation of ethylene-mediated responses at the level of the receptor. *Annals of Botany*, 88 (5), 813–822.
40. **Clark, D.G., Gubrium, E.K., Barrett, J.E., Nell, T.A. y Klee, H.J. (1999).** Root Formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiology*, 121 (1), 53–60.

41. **Colmer, T.D. y Voeselek, L.A. (2009).** Flooding tolerance: Suites of plant traits in variable environments. *Functional Plant Biology*, 36 (8), 665–681.
42. **Cui, M., Lin, Y., Zu, Y, Efferth, T., Li, D. y Tang, Z. (2015).** Ethylene increases accumulation of compatible solutes and decreases oxidative stress to improve plant tolerance to water stress in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology*, 58 (3): 193–201.
43. **Dall’Osto, L., Caffarri, S. y Bassi, R. (2005).** A mechanism of nonphotochemical energy dissipation, independent from PsbS, revealed by a conformational change in the antenna protein CP26. *The Plant Cell*, 17, 1217–1232.
44. **Demmig-adams, B. (1990).** Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochemical and Biophysical Acta*, 1020, 1–24.
45. **Demmig-adams, B. y Adams, W.W. (2006).** Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytologist*, 172, 11–21.
46. **Djanaguiraman, M., Prasad, P.V. y Al-Khatib, K. (2011).** Ethylene perception inhibitor 1-MCP decreases oxidative damage of leaves through enhanced antioxidant defense mechanisms in soybean plants grown under high temperature stress. *Environmental and Experimental Botany*, 71 (2), 215–223.
47. **Drake, R., John, I., Farrell, A., Cooper, W., Schuch, W. y Grierson, D. (1996).** Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Molecular Biology*, 30 (4), 755–767.
48. **Drew, M.C., Jackson, M.B. y Giffard, S. (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 (1), 83–88.
49. **Drew, M.C., He, Ch.J. y Morgan, P.W. (2000)** Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in Plant Science*, 5 (3), 123-127.
50. **Ella, E.S., Kawano, N., Yamauchi, Y., Tanaka, K. y Ismail, A. (2003).** Blocking ethylene perception enhances flooding tolerance in rice seedlings. *Functional Plant Biology*, 30 (7), 813-819.
51. **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, 1017–1024.
52. **Else, M.A., Coupland, D., Dutton, L. y Jackson, M.B. (2001).** Decreased root hydraulic conductivity reduces leaf water potential, initiates stomatal closure and slows leaf expansion in flooded plants of castor oil (*Ricinus communis*) despite diminished delivery of ABA from the roots to shoots in xylem sap. *Physiologia Plantarum*, 111 (1), 46–54.
53. **Else, M.A., Janowiak, F., Atkinson, C.J. y Jackson, M.B. (2009).** Root signals and stomatal closure in relation to photosynthesis, chlorophyll a fluorescence and adventitious rooting of flooded tomato plants. *Annals of Botany*, 103 (2), 313–323.

54. **Emmanuel, E. y Levy, A.A. (2002).** Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5 (2), 112–117.
55. **Ezin, V., De La Pena, R. y Ahanchede, A. (2010).** Flooding tolerance of tomato genotypes during vegetative and reproductive stages. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22 (1), 131–142.
56. **Fagerstedt, K.V. (2010).** Programmed cell death and aerenchyma formation under hypoxia. En: Mancuso, S. y Shabala, S. *Waterlogging signalling and tolerance in plants.* (pp 99-118). Springer, Berlin.
57. **FAOSTAT (2016).** Production of Tomatoes: top 10 producers. Recuperado de: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Consultado el 7/8/2018.
58. **Farquhar, G.D., Von Caemmerer, S. y Berry, J.A. (1980).** A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C3 species. *Planta*, 149, 78–90.
59. **Foolad, M.R. (2007).** Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, 52p.
60. **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 (8), 2021–34.
61. **Gan, S. y Amasino, R.M. (1997).** Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). *Plant Physiology*, 113, 313-319.
62. **Gangola, M.P. y Ramadoss, B.R. (2018).** Sugars play a critical role in abiotic stress tolerance in plants. En: Wani, S.H. (Ed.). *Biochemical, Physiological and Molecular Avenues for Combating Abiotic Stress Tolerance in Plants.* (pp 17-38). Academic Press, Saskatoon.
63. **Gepstein, S. y Glick, B.R. (2013).** Strategies to ameliorate abiotic stress-induced plant senescence. *Plant Molecular Biology*, 82, 623-633.
64. **Gregersen, P.L., Holm, P.B. y Krupinska, K. (2008).** Leaf senescence and nutrient remobilization in barley and wheat. *Plant Biology*, 10, 37–49.
65. **Grichko, V.P. y Glick, B.R. (2001).** Ethylene and flooding stress in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39 (1), 1–9.
66. **Grichko, V.P. y Glick, B.R. (2001).** Flooding tolerance of transgenic tomato plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase controlled by the 35S, rolD or PRB-1b promoter. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39 (1), 19–25.
67. **Guo, H., Sun, Y., Yan, H., Li, C. y Ge, F. (2018).** O₃-induced leaf senescence in tomato plants is ethylene signalling-dependent and enhances the population abundance of *Bemisia tabaci*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–14.
68. **Guzmán, P. y Ecker, J.R. (1990).** Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, 2, 513-523

69. **Herner, R.C. y Sink, K.C. (1973).** Ethylene production and respiratory behavior of the *rin* tomato mutant. *Plant Physiology*, 52 (1), 38–42.
70. **Herrera, A. (2013).** Responses to flooding of plant water relations and leaf gas exchange in tropical tolerant trees of a black-water wetland. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1–13.
71. **Herrera, A., Rengifo, E. y Tezara, W. (2010).** Respuestas ecofisiológicas a la inundación en árboles tropicales tolerantes de un igapó. *Ecosistemas*, 19 (1), 37–51.
72. **Herrera, A., Tezara, W., Marín, O. y Rengifo, E. (2008).** Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis in trees of a tropical seasonally flooded forest. *Physiologia Plantarum*, 134 (1), 41–48.
73. **Heuvelink, E. (2005).** Developmental processes. En: Heuvelink, E. (Ed.). *Tomatoes*. Segunda Edición. (pp 53-83). CABI Publishing, Wallingford.
74. **Hoagland, D.R. y Arnon, D.I. (1938).** The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circulation*, 347, 32.
75. **Holt, N.E., Zigmantas, D., Valkunas, L., Li, X.P., Niyogi, K.K. y Fleming, G. R. (2005).** Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science*, 307, 433–436.
76. **Horchani, F., Aloui, A., Brouquisse, R. y Aschi-Smiti, S. (2008).** Physiological responses of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) as affected by root hypoxia. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194 (4), 297–303.
77. **Horie, Y., Ito, H., Kusaba, M., Tanaka, R. y Tanaka, A. (2009).** Participation of chlorophyll *b* reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complexes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (26), 17449–17456.
78. **Hua, J., Han, L., Wang, Z., Gu, C. y Yin, Y. (2017).** Morpho-anatomical and photosynthetic responses of *Taxodium* hybrid “Zhongshanshan” 406 to prolonged flooding. *Flora*, 231, 29–37.
79. **Hüther, C.M., Martinazzo, E.G., Rombaldic, C.V. y Bacarina, M.A. (2017).** Effects of flooding stress in ‘Micro-Tom’ tomato plants transformed with different levels of mitochondrial sHSP23.6. *Brazilian Journal of Biology*, 77 (1), 43-51.
80. **INTA (2015).** El exceso hídrico en la region, en la agenda del INTA. Recuperado de: <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=28555>. Consultado el 16/8/2016.
81. **Ivanov, A., Hurry, V., Sane, V.P., Öquist, G., Huner, N. (2008).** Reaction centre quenching of excess light energy and photoprotection of photosystem II. *Journal of Plant Biology*, 51, 85-96.
82. **Jackson, M.B. (2002).** Long-distance signalling from roots to shoots assessed: the flooding story. *Journal of Experimental Botany*, 53 (367), 175–181.

83. **Jackson, M.B. (2008).** Ethylene-promoted elongation: An adaptation to submergence stress. *Annals of Botany*, 101 (2), 229–248.
84. **Jackson, M.B. y Ram, P.C. (2003).** Physiological and molecular basis of susceptibility and tolerance of rice plants to complete submergence. *Annals of Botany*, 91, 227–241.
85. **Jackson, M.B. y Colmer, T.D. (2005).** Response and adaptation by plants to flooding stress. *Annals of Botany*, 96 (4), 501–505.
86. **Jackson, M.B., Saker, L.R., Crisp, C.M., Else, M.A. y Janowiak, F. (2003).** Ionic and pH signalling from roots to shoots of flooded tomato plants in relation to stomatal closure. *Plant and Soil*, 253, 103-113.
87. **John, I., Drake, R., Farrell, A., Cooper, W., Lee, P., Horton, P. y Grierson, D. (1995).** Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. *The Plant Journal*, 7 (3), 483-490.
88. **Jones, M.L., Larsen, P.B. y Woodson, W.R. (1995).** Ethylene-regulated expression of a carnation cysteine proteinase during flower petal senescence. *Plant Molecular Biology*, 28, 505–512.
89. **Kalaji, H.M., Schansker, G., Ladle, R.J., Goltsev, V., Bosa, K., Allakhverdiev, S.I., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Da browski, P., Elsheery, N.I., Ferroni, L., Guidi, L., Hogewoning, S.W. Jajoo, A., Misra, A.N., Nebauer, S.G., Pancaldi, S., Penella, C., Poli, D.B., Pollastrini, M., Romanowska-Duda, Z.B., Rutkowska, B., Sero, J., Suresh, K., Szulc, W., Tambussi, E., Yannicari, M., Zivcak, M. (2014).** Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: Practical issues. *Photosynthesis Research*, 122 (2), 121–158.
90. **Kawase, M. (1974).** Role of ethylene in induction of flooding damage in sunflower. *Physiologia Plantarum*, 31, 29–38.
91. **Kawase, M. (1981).** Effect of ethylene on aerenchyma development. *American Journal of Botany*, 68 (5), 651–658.
92. **Kawase, M. y Whitmoyer, R.E. (1980).** Aerenchyma development in waterlogged plants. *American Journal of Botany*, 67 (1), 18–22.
93. **Kieber, J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldman, K., Ecker, J. (1993).** CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*, 72, 427-441
94. **Kimura, S. y Sinha, N. (2008).** How to grow tomatoes. *Cold Spring Harbor Protocols*, 19 pp.
95. **Kitagawa, M., Nakamura, N., Usuda, H., Shiina, T., Ito, H., Yasuda, J., Inakuma, T., Ishiguro, Y., Kasumi, T. y Ito, Y. (2006).** Ethylene biosynthesis regulation in tomato fruit from the F₁ hybrid of the *ripening inhibitor (rin)* mutant. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70 (7), 1769–1772.

96. **Kitajima, K. y Hogan, K.P. (2003).** Increases of chlorophyll *a/b* ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant, Cell and Environment*, 26, 857–865.
97. **Kläring, H.P. y Zude, M. (2009).** Sensing of tomato plant response to hypoxia in the root environment. *Scientia Horticulturae*, 122 (1), 17–25.
98. **Klee, H.J. (2004).** Ethylene signal transduction. Moving beyond Arabidopsis. *Plant Physiology*, 135 (2), 660–667.
99. **Klee, H.J. y Giovannoni, J.J. (2011).** Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual Review of Genetics*, 45, 41–59.
100. **Kofranek, A.M. y Paul J.L. (1975).** The value of impregnating cut stems with high concentrations of silver nitrate. *Acta Horticulturae*, 41, 199–206.
101. **Kosová, K., Vítámvás, P., Tom, I. y Renaut, J. (2011).** Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, 74, 1031–1322.
102. **Koyama, T. (2014).** The roles of ethylene and transcription factors in the regulation of onset of leaf senescence. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1-7.
103. **Koyama, T. (2018).** A hidden link between leaf development and senescence. *Plant Science*. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.08.006>. Consultado el 5/11/2018.
104. **Kozlowski, T.T. (1984).** Plant responses to flooding of soil. *BioScience*, 34 (3), 162–167.
105. **Kramer, P.J. (1951).** Causes of injury to plants resulting from flooding of the soil. *Plant Physiology*, 26 (4), 722–736.
106. **Kreuzwieser, J. y Rennenberg, H. (2014).** Molecular and physiological responses of trees to waterlogging stress. *Plant, Cell and Environment*, 37 (10), 2245–2259.
107. **Kumar, P., Pal, M., Joshi, R. y Sairam, R.K. (2013).** Yield, growth and physiological responses of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] genotypes to waterlogging at vegetative stage. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19 (2), 209–220.
108. **Kundzewicz, Z.W., Mata, L.J., Arnell, N.W., Doll, P., Kabat, P., Jimenez, B., Miller, K.A., Oki, T., Sen, Z. y Shiklomanov, I.A. (2007).** Freshwater resources and their management. *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability*. En: Parry, M.L., Canziani, O.F., Palutikof, J.P., van der Linden, P.J. y Hanson, C.E. (Eds.). Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. (pp 173-210). Cambridge University Press, Cambridge.
109. **Lambers, H., Stuart-Chapin III, F. y Pons, T.L. (1998).** *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag, New York.
110. **Lanahan, M.B., Yen, H.C., Giovannoni, J.J. y Klee, H.J. (1994).** The *Never ripe* mutation blocks ethylene perception in tomato. *American Society of Plant Physiologists*, 6 (4), 521–530.

111. **Lavinsky, A.O., De Souza Sant'Ana, C., Mielke, M.S., Furtado De Almeida, A.A., Pinto Gomes, F., Franca, S. y Da Costa Silva, D. (2007).** Effects of light availability and soil flooding on growth and photosynthetic characteristics of *Genipa americana*. *New Forests*, 34, 41–50.
112. **Li, H. y Guo, H. (2007).** Molecular basis of the ethylene signalling and response pathway in arabidopsis. *Journal of Plant Growth Regulators*, 26 (2), 106–117.
113. **Liao, C.T. y Lin, C.H. (2001).** Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. *Proceedings of the National Science Council*, 25 (3), 148–157.
114. **Lichtenthaler, H.K. (1987).** Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350–382.
115. **Lim, P.O.; Kim, H.J. y Gil Nam, H. (2007).** Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 115–36.
116. **Lincoln, J.E. y Fischer, R.L. (1988).** Regulation of gene expression by ethylene in wild-type and *rin* tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *Plant Physiology*, 88 (2), 370–374.
117. **Ljung, K., Nemhauser, J.L. y Perata, P. (2015).** New mechanistic links between sugar and hormone signalling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 130–137.
118. **Loreti, E., Veen, H. Van y Perata, P. (2016).** Plant responses to flooding stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 64–71.
119. **Marco, F., Bitrián, M., Carrasco, P., Alcázar, R. y Tiburcio, A.F. (2015).** Polyamine biosynthesis engineering as a tool to improve plant resistance to abiotic stress. *Genetic Manipulation in Plants for Mitigation of Climate Change*, 103–116.
120. **Mariotti, L., Fambrini, M., Scartazza, A., Picciarelli, P. y Pugliesi, C. (2018).** Characterization of lingering hope, a new brachytic mutant in sunflower (*Helianthus annuus* L.) with altered salicylic acid metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 231, 402–414.
121. **Maxwell, K. y Johnson, G.N. (2000).** Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51 (345), 659–668.
122. **Mielke, M.S. y Schaffer, B. (2010).** Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and pigment indexes of *Eugenia uniflora* L. in response to changes in light intensity and soil flooding. *Tree Physiology*, 30 (1), 45–55.
123. **Mielke, M.S., y Schaffer, B. (2010).** Photosynthetic and growth responses of *Eugenia uniflora* L. seedlings to soil flooding and light intensity. *Environmental and Experimental Botany*, 68 (2), 113–121.
124. **Mignolli, F., Mariotti, L., Lombardi, L., Vidoz, M.L., Ceccarelli, N. y Picciarelli, P. (2012).** Tomato fruit development in the auxin-resistant *dgt* mutant is induced by pollination but not by auxin treatment. *Journal of Plant Physiology*, 169 (12), 1165–1172.
125. **Ministerio de Agroindustria (2016).** Perfil del tomate. Recuperado de: https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/areas/hortalizas/

- [archivos/000030 Informes/000997 Perfil%20de%20tomate%202016.pdf](#). Consultado el 18/10/2019.
126. **Ministerio de Agroindustria (2017)**. Mercado externo del tomate. Recuperado de: https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/areas/hortalizas/archivos/000030 Informes/000994 Informe%20del%20Mercado%20Externo%20del%20Tomate%20-%202017.pdf. Consultado el 5/7/2018.
127. **Ministerio de Producción y Trabajo (2019)**. Resolución 309/2019: Emergencia agropecuaria. Recuperado de: <https://www.boletinoficial.gov.ar/detalleAviso/primera/210446/20190703?busqueda=2>. Consultado el 17/10/2019.
128. **Mishra, S.K., Patro, L., Mohapatra, P.K. y Biswal, B. (2008)**. Response of senescing rice leaves to flooding stress. *Photosynthetica*, 46 (2), 315-371.
129. **Mittler, R. (2006)**. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11 (1), 1360–1385.
130. **Moles, M.T., Pompeiano, A., Huaranca, T., Scartazza, A., y Guglielminetti, L. (2016)**. The efficient physiological strategy of a tomato landrace in response to short-term salinity stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 262–272.
131. **Morin, F. y C. Hartmann. 1986**. Changes in free and conjugated 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and in 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity in the senescent Golden Delicious apple. *Journal of Plant Physiology*, 125, 173-178.
132. **Munné-Bosch S. y Alegre L. (2004)**. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*, 31, 203-216.
133. **Murata, N.; Takahashi, S.; Nishiyama, Y. y Allakhverdiev, S.I. (2008)**. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767 (6), 414–421.
134. **Murchie, E.H. y Lawson, T. (2013)**. Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64 (13), 3983–3998.
135. **Mutava, R.N., Prince, S.J., Syed, N.H., Song, L., Valliyodan, B., Chen, W. y Nguyen, H.T. (2015)**. Understanding abiotic stress tolerance mechanisms in soybean: A comparative evaluation of soybean response to drought and flooding stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 86, 109–120.
136. **Nagai, K., Kondo, Y., Kitaoka, T., Noda, T., Kuroha, T., Angeles-Shim, R. B., Yasui, H., Yoshimura, A. y Ashikari, M. (2014)**. QTL analysis of internode elongation in response to gibberellin in deepwater rice. *AoB Plants*, 6, 1–12.
137. **Najeeb, U., Bange, M.P., Tan, D.K. y Atwell, B.J. (2015)**. Consequences of waterlogging in cotton and opportunities for mitigation of yield losses. *AoB Plants*, 7, 1–17.

138. **Negi, S., Sukumar, P., Liu, X., Cohen, J.D. y Muday, G. K. (2010).** Genetic dissection of the role of ethylene in regulating auxin-dependent lateral and adventitious root formation in tomato. *Plant Journal*, 61 (1), 3–15.
139. **Niu, S., Luo, Y., Li, D., Cao, S., Xia, J., Li, J. y Smith, M.D. (2014).** Plant growth and mortality under climatic extremes: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 98, 13–19.
140. **Oosterhuis, D., Scott, H., Hampton, R. y Wullschleger, S. (1990).** Physiological responses of two soybean [*Glycine max* (L.) Merr] cultivars to short-term flooding. *Environmental and Experimental Botany*, 30 (1), 85–92.
141. **Pedersen, O., Perata, P. y Voesenek, L.A. (2017).** Flooding and low oxygen responses in plants. *Functional Plant Biology*, 44, 3–6.
142. **Pezeshki, S.R. (2001).** Wetland plant responses to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, 46 (3), 299–312.
143. **Pilatti, R. A. (1997).** Cultivos bajo Invernaderos. Primera Edición. Hemisferio Sur, Santa Fe. 175p.
144. **Poorter, H., Fiorani, F., Pieruschka, R., Wojciechowski, T., van der Putten, W.H., Kleyer, M., Schurr, U. y Postma, J. (2016).** Pampered inside, pestered outside? Differences and similarities between plants growing in controlled conditions and in the field. *New Phytologist*, 212, 838–855.
145. **Pucciariello, Ch., Voesenek, A.C., Perata, P. y Sasidharan, R. (2014).** Plant responses to flooding. *Frontiers in plant science*, 5, 4-5.
146. **Qiu, K., Li, Z., Yang, Z., Chen, J., Wu, S., Zhu, X., Gao, S., Gao, J., Ren, G., Kuai, B. y Zhou, X. (2015).** EIN3 and ORE1 accelerate degreening during ethylene-mediated leaf senescence by directly activating chlorophyll catabolic genes in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 11 (7), 1–20.
147. **Ramos, L. (2014).** Desbrotado químico en el cultivo de Tomate. Tesis de Maestría. Universidad Nacional del Litoral. Esperanza, Santa Fe. 93p.
148. **Rao, R. y Li, Y. (2003).** Management of flooding effects on growth of vegetable and selected field crops. *HortTechnology*, 13 (4), 610-616.
149. **Reid, J.B. (1993).** Plant hormone mutants. *Plant Growth Regulators*, 12, 207–226.
150. **Rengifo, E., Tezara, W. y Herrera, A. (2005).** Water relations, chlorophyll *a* fluorescence, and contents of saccharides in tree species of a tropical forest in response to flood. *Photosynthetica*, 43 (2), 203–210.
151. **Rick, C.M. y Butler, L. (1956).** Phylogenetics of the tomato. *Advances in Genetics*, 8, 267-382.
152. **Robinson, R.W. y Tomes, M.L. (1993).** *Ripening inhibitor*: A gene with multiple effects on ripening. Report of the Tomato Genetics Cooperative, 18, 36.

153. **Robison, M.M., Griffith, M., Pauls, K.P. y Glick, B.R. (2001).** Dual role for ethylene in susceptibility of tomato to *Verticillium* wilt. *Journal of Phytopathology*, 149, 385–388.
154. **Rodiyati, A., Arisoelaningsih, E., Isagi, Y. y Nakagoshi, N. (2005).** Response of *Cyperus brevifolius* (Rottb.). Hassk and *Cyperus kyllingia* Endl. to varying soil water availability. *Environmental and Experimental Botany*, 52, 259–269.
155. **Rodríguez-Gamir, J., Ancillo, G., González-Mas, M.C., Primo-Millo, E., Iglesias, D. J. y Forner-Giner, M.A. (2011).** Root signalling and modulation of stomatal closure in flooded citrus seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49 (6), 636–645.
156. **Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J.A., Hilal, M. y Prado, F.E. (2009).** Soluble sugars - Metabolism, sensing and abiotic stress. A complex network in the life of plants. *Plant Signaling & Behavior*, 4 (5), 388–393.
157. **Ruban, A.V. (2015).** Evolution under the sun: Optimizing light harvesting in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 66, 7–23.
158. **Ruban, A.V, Berera, R., Iliaia, C., van Stokkum, I.H., Kennis, J.T., Pascal, A.A., van Amerongen, H., Robert, B., Horton, P. y van Grondelle, R. (2007).** Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature*, 450, 575–779.
159. **Sakagami, J.I., Joho, Y. y Sone, C. (2013).** Complete submergence escape with shoot elongation ability by underwater photosynthesis in African rice, *Oryza glaberrima* Steud. *Field Crops Research*, 152, 17–26.
160. **Salvucci, M.E. y Crafts-Brandner, S.J. (2004).** Inhibition of photosynthesis by heat stress: The activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 2, 179-186.
161. **Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A. y Hayat, S. (2016).** Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 54-61.
162. **San Celedonio, R.P., Abeledo, L.G., Brihet, J.M y Miralles, D. J. (2016).** Waterlogging Affects Leaf and Tillering Dynamics in Wheat and Barley. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 202, 409-420.
163. **Sauter, M. (2013).** Root responses to flooding. *Current Opinion in Plant Biology*, 16 (3), 282–286.
164. **Scartazza, A., Di Baccio, D., Pierangelo, B., Gavrichkova, O. y Matteucci, G. (2016).** Investigating the European beech (*Fagus sylvatica* L.) leaf characteristics along the vertical canopy profile: leaf structure, photosynthetic capacity, light energy dissipation and photoprotection mechanisms. *Tree Physiology*, 36, 1060–1076.
165. **Serek, M., Woltering, E.J., Sisler, E.C., Frello, S. y Sriskandarajah, S. (2006).** Controlling ethylene responses in flowers at the receptor level. *Biotechnology Advances*, 24, 368–381.

166. **Shiu, O.Y., Oetiker, J.H., Yip, W.K. y Yang, S.F. (1998).** The promoter of *LE-ACS7*, an early flooding-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of the tomato, is tagged by a *Sol3* transposon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (17), 10334–10339.
167. **Sisler, E.C. y Pian, A. (1973).** Effect of ethylene and cyclic olefins on tobacco leaves. *Tobacco Science*, 17, 68–72.
168. **Smethurst, C.F. y Shabala, S. (2003).** Screening methods for waterlogging tolerance in lucerne: comparative analysis of waterlogging effects on chlorophyll fluorescence, photosynthesis, biomass and chlorophyll content. *Functional Plant Biology*, 30, 335–343.
169. **Smethurst, C.F., Garnet T. y Shabala S. (2005).** Nutrition and chlorophyll fluorescence responses of lucerne (*Medicago sativa*) to waterlogging subsequent recovery. *Plant Soil*, 270, 31-45.
170. **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 (2), 152–160.
171. **Striker, G.G. (2012).** Flooding Stress on Plants: Anatomical, morphological and physiological responses. *Botany*, 3–28.
172. **Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E. y Mittler, R. (2014).** Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203 (1), 32-42.
173. **Szabó, I., Bergantino, E. y Giacometti, G.M. (2005).** Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *EMBO Reports*, 6, 629-634.
174. **Tadeo, F., Gómez-Cadenas, A., Ben-Cheikh, W., Primo-Millo, E. y Talón M. (1997).** Gibberellin-ethylene interaction controls radial expansion in citrus roots. *Planta*, 202, 370–378.
175. **Taiz, L. y Zeiger, E. (2010).** *Plant Physiology*. Tercera edición. Sinauer Associates. 690p.
176. **Tarekegne, A., Benniem A.T. y Labuschagne, M.T. (2000).** Effects of soil waterlogging on the concentration and uptake of selected nutrients in wheat genotypes differing in tolerance. In the eleventh regional wheat workshop for eastern, central and southern Africa, Ethiopia, Addis Ababa, 2000, 253-263.
177. **Theologis, A. (1992).** One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. *Cell*, 70, 181-194.
178. **Tigchelaar, E.C., McGlasson, W.B., y Buescher, R.W. (1978).** Genetic regulation of tomato fruit ripening. *Hortscience*, 13, 508-513.
179. **Trobacher, C.P. (2009).** Ethylene and programmed cell death in plants. *Botany*, 87 (8), 757–769.

180. **Trought M.C. y Drew M.C. (1980).** The development of waterlogging damage in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). Accumulation and redistribution of nutrients by the shoot. *Plant Soil*, 56, 187-199.
181. **Van de Poel, B. y Van Der Straeten, D. (2014).** 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–11.
182. **Van Dongen, J.T. y Licausi, F. (2014).** Low-oxygen stress in plants. *Oxygen Sensing and Adaptative Responses to Hypoxia*. Springer-Verlag Wien. 426p.
183. **Veen, H. (1983).** Silver thiosulphate: an experimental tool in plant science. *Scientia Horticulturae*, 20, 211–24.
184. **Vidoz, M.L., Loreti, E., Mensuali, A., Alpi, A. y Perata, P. (2010).** Hormonal interplay during adventitious root formation in flooded tomato plants. *Plant Journal*, 63 (4), 551–562.
185. **Vidoz, M.L., De Pedro, L.F., y Mignolli, F. (2016).** Ethylene-induced aerenchyma and stem hypertrophy in flooded tomato plants. *Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Corrientes*.
186. **Vidoz, M.L., Mignolli, F., Aispuru, H.T. y 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. *Scientia Horticulturae*, 201, 130–139.
187. **Visser, E.J. y Voeselek, L.A. (2004).** Acclimation to soil flooding-sensing and signal-transduction. *Plant and Soil*, 274 (1–2), 197–214.
188. **Voeselek L.A. y Sasidharan R. (2013).** Ethylene--and oxygen signalling--drive plant survival during flooding. *Plant Biology*, 15 (3), 426-435.
189. **Voeselek, L. A., Colmer, T.D., Pierik, R., Millenaar, F.F. y Peeters, A.J. (2006).** How plants cope with complete submergence. *New Phytologist*, 170 (2), 213–226.
190. **Wample, R. L. y Thornton, R. K. (1984).** Differences in the response of sunflower (*Helianthus annuus*) subjected to flooding and drought stress. *Physiologia Plantarum*, 61, 611–616.
191. **Wills, R. y M. Warton. (2004).** Efficacy of potassium per-manganate impregnated into alumina beads to reduce atmospheric ethylene. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129 (3), 433-438.
192. **Wittenbach, V.A. (1978).** Breakdown of ribulose biphosphate carboxylase and change in proteolytic activity during dark-induced senescence of wheat seedlings. *Plant Physiology*, 62, 604–608.
193. **Yang, S. y Hoffman, N. (1984).** Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiology*, 84, 520-525
194. **Yen, H.C., Lee, S., Tanksley, S.D., Lanahan, M.B., Klee, H.J. y Giovannoni, J.J. (1995).** The tomato *Never-ripe* locus regulates ethylene-inducible gene expression and is linked to a homolog of the Arabidopsis *ETR1* gene. *Plant Physiology*, 107 (4), 1343–1353.

195. **Yetisir, H., Çaliskan, M.E., Soylu, S. y Sakar, M. (2006).** Some physiological and growth responses of watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai] grafted onto *Lagenaria siceraria* to flooding. *Environmental and Experimental Botany*, 58 (1–3), 1–8.
196. **Yin, D., Chen, S., Chen, F., Guan, Z. y Fang, W. (2010).** Morpho-anatomical and physiological responses of two *Dendranthema* species to waterlogging. *Environmental and Experimental Botany*, 68 (2), 122–130.
197. **Yordanova, R.Y. y Popova, L.P. (2007).** Flooding-induced changes in photosynthesis and oxidative status in maize plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29 (6), 535–541.
198. **Yordanova, R.Y., Uzunova, A.N. y Popova, L.P. (2005).** Effects of short-term soil flooding on stomata behaviour and leaf gas exchange in barley plants. *Biologia Plantarum*, 49 (2), 317–319.
199. **Young, T.E., Meeley, R.B. y Gallie, D.R. (2004).** ACC synthase expression regulates leaf performance and drought tolerance in maize. *Plant Journal*, 40 (5), 813–825.
200. **Zeng, F., Shabala, L., Zhou, M., Zhang, G. y Shabala, S. (2013).** Barley responses to combined waterlogging and salinity stress: separating effects of oxygen deprivation and elemental toxicity. *Frontiers of Plant Science*, 4, 313.
201. **Zhang, H., Feng, P., Yang, W., Sui, X., Li, X. y Li, W. (2018).** Effects of flooding stress on the photosynthetic apparatus of leaves of two *Physocarpus* cultivars. *Journal of Forestry Research*, 29, 1049–1059.
202. **Zhou, Y., Lam, H.M. y Zhang, J. (2007).** Inhibition of photosynthesis and energy dissipation induced by water and high light stresses in rice. *Journal of Experimental Botany*, 58 (5), 1207-1217.
203. **Zhu, J. (2016).** Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167 (2), 313-324.
204. **Zuliana, R., Boyce, A.N., Nair, H.; Chandran, S. (2008).** Effects of aminooxyacetic acid and sugar on the longevity of pollinated *Dendrobium pompadour*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 7 (7), 654–65.

9. ANEXOS

I. Eficiencia fotoquímica actual (Φ_{PSII}) y rendimiento cuántico potencial (F_v/F_m) del fotosistema II en terceras hojas de plantas del tratamiento inundado de Pearson (PRS) y *Never ripe* (Nr).

DDI	Φ_{PSII}		F_v/F_m	
	PRS	Nr	PRS	Nr
2	0,173 ± 0,009*b	0,265 ± 0,021 a	0,749 ± 0,007*a	0,780 ± 0,006 a
4	0,167 ± 0,005*ba	0,249 ± 0,014 a	0,736 ± 0,004*a	0,771 ± 0,001 a
6	0,139 ± 0,010*a	0,221 ± 0,019 a	0,740 ± 0,008*a	0,778 ± 0,003 a

Para cada parámetro asteriscos indican diferencias significativas entre genotipos en una misma fecha (Nr vs. PRS) según t-test ($P < 0,05$; $n = 8$), letras distintas indican diferencias significativas entre fechas para un mismo genotipo (2 vs. 4 vs. 6) según ANOVA (TCM por Tukey; $P < 0,05$; $n = 8$)

II. Eficiencia fotoquímica actual (Φ_{PSII}) y rendimiento cuántico potencial (F_v/F_m) del fotosistema II en terceras hojas de plantas del tratamiento control de Pearson (PRS) y *Never ripe* (Nr).

DDI	Φ_{PSII}		F_v/F_m	
	PRS	Nr	PRS	Nr
2	0,247 ± 0,021*a	0,363 ± 0,021 a	0,782 ± 0,004*a	0,798 ± 0,005 a
4	0,287 ± 0,026*a	0,463 ± 0,015 b	0,788 ± 0,005 a	0,791 ± 0,006 a
6	0,273 ± 0,018*a	0,334 ± 0,018 a	0,787 ± 0,003*a	0,797 ± 0,003 a

Para cada parámetro asteriscos indican diferencias significativas entre genotipos en una misma fecha (Nr vs. PRS) según t-test ($P < 0,05$; $n = 8$), letras distintas indican diferencias significativas entre fechas para un mismo genotipo (2 vs. 4 vs. 6) según ANOVA (TCM por Tukey; $P < 0,05$; $n = 8$)

III. Parámetros de intercambio gaseoso durante 2, 4 y 6 días de inundación en terceras hojas de plantas de *Never ripe* (Nr) y Pearson (PRS) controles (C) e inundadas (FL). Tasa de asimilación neta del carbono (A), concentración intercelular de CO₂ (C_i), conductividad estomática (g_s) y eficiencia del uso hídrico intrínseca (A/g_s). Los valores presentados son las medias de los respectivos tratamientos ± SEM ($n = 8$).

DDI	Gen	Trat	A (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	g _s (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	C _i (μmol CO ₂ mol ⁻¹)	A/g _s (μmol mol ⁻¹)
2	Nr	C	8,61 ± 0,44 a	0,137 ± 0,015 a	278,1 ± 7,4 a	66,3 ± 4,8 * a
		FL	4,51 ± 0,50 * a	0,050 ± 0,006 * a	242,8 ± 7,4 * # a	90,7 ± 4,6 a
	PRS	C	6,27 ± 0,82 # a	0,120 ± 0,026 a	283,4 ± 9,7 a	63,9 ± 6,7 a
		FL	2,96 ± 0,25 * # a	0,061 ± 0,006 * a	306,6 ± 8,0 b	50,5 ± 5,3 # a
4	Nr	C	8,94 ± 0,60 a	0,159 ± 0,018 a	284,1 ± 8,0 a	59,6 ± 4,4 * a
		FL	4,36 ± 0,58 * a	0,037 ± 0,007 * a	208,0 ± 16,5 * # a	127,1 ± 11,3 b
	PRS	C	6,73 ± 0,63 # a	0,135 ± 0,027 a	302,0 ± 3,9 a	60,2 ± 8,2 a
		FL	3,12 ± 0,25 * a	0,046 ± 0,004 * a	277,3 ± 8,9 * a	69,8 ± 5,7 # b
6	Nr	C	8,70 ± 0,54 a	0,157 ± 0,016 a	290,3 ± 5,6 a	57,4 ± 3,6 * a
		FL	4,37 ± 0,59 * a	0,051 ± 0,007 * a	247,2 ± 7,3 * # a	86,5 ± 4,6 a
	PRS	C	6,87 ± 0,40 # a	0,128 ± 0,016 a	294,1 ± 7,2 a	57,0 ± 4,5 a
		FL	3,42 ± 0,37 * a	0,060 ± 0,007 * a	289,5 ± 6,5 ba	58,8 ± 4,0 # ba

Asteriscos indican dif. significativas entre tratamientos de un mismo genotipo (FL vs. C), numerales indican dif. significativas entre iguales tratamientos de diferentes genotipos (Nr vs. PRS) (T-test; $P < 0,05$; $n = 8$). Letras minúsculas distintas indican dif. significativas entre fechas para un mismo tratamiento y genotipo (2 vs. 4 vs. 6) (ANOVA, TCM por Tukey; $P < 0,05$; $n = 8$).