

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Tesis Para optar al Grado Académico de

Doctor en Ciencias Agrarias

Estudio integral de la respuesta de *Medicago sativa* L. (alfalfa) a condiciones de estrés destinados a aumentar la persistencia de alfalfares

Licenciada Camila Jaime

Director: Dr. Ricardo German Dunger

Co-Director: Dr. Lucas Daurelio

Comité Académico

Dra. María Alejandra Favaro

Dr. Roberto P. Marano

Dr. Marcos Gabriel Derita

Dr. Eleodoro E. del Valle

Dr. Rubén Elz

2025

Publicaciones en revistas científicas

Jaime, C., Dezar, C., Pagán, I., & Dunger, G. 2024. Expression of the alfalfa gene MsMDHAR in *Arabidopsis thaliana* increases water stress tolerance. *Physiologia Plantarum*, 176(4), e14448.

Capítulo de Libros

Jaime Camila. Caracterización de plantas de *Arabidopsis thaliana* sobre-expresantes del gen MsMDHAR de alfalfa con posible resistencia a estrés abiótico. Voces femeninas en la investigación. Año: 2023; p. 339 - 348.

Presentación a Congresos

RAFV Conference 2023. Jaime CL.; Dezar C.; Pagán Muñoz I.; Dunger G. Expression of the alfalfa gene MsMDHAR increases root biomass and promotes tolerance to hydric stress in transgenic *Arabidopsis*.

Congreso SAIB 2022. Jaime CL.; Daurelio LD.; Dunger G. Evaluation of three alfalfa cultivars under waterlogging and drought based on agronomic and molecular approaches.

Congreso Conjunto SAIB-SAMIGE 2020. Jaime CL; Gioco JO; Daurelio LD; Dunger G. Understanding the transcriptomic response of alfalfa under waterlogging. 2020.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Litoral, por formarme tanto en mi carrera de grado como de posgrado. Ojalá pueda devolverle todo lo que me ha brindado en estos años.

A CONICET, por financiar la beca que me permitió dedicarme a mi formación doctoral durante 6 años.

A German y Carlos, por enseñarme, por aguantarme, por trabajar conmigo y escuchar mis dudas y sugerencias, por formar la profesional que soy.

A mi familia, porque aún sin entender muy bien lo que hacía un biotecnólogo, tuvieron que tratar de entender lo que era hacer un doctorado. Por siempre apoyar mis decisiones y acompañarme a lo lejos desde los 18 años.

A Juli, por volverme parte de su familia en Esperanza, por acompañarme al laboratorio los fines de semana o a la parcela en enero. Gracias por tu amor, por tu apoyo, por tu escucha.

A Loli, por ser mi sostén diario, mi hermana de la vida, por caminar conmigo toda la Universidad. Gracias por darme la energía que faltaba muchas veces.

A Jime y Camilo, mis amigos del laboratorio, cuánto los extraño y cuánto más fácil hicieron mi camino.

A mis amigos, esa inyección de energía cuando a veces todo parece oscuro y la familia está lejos. Gracias por las risas, por los bailes, por ser ustedes.

No quiero olvidarme de mí, quiero agradecerme por haber continuado aunque las cosas se pusieran difíciles. Gracias a la Cami que lloró bastante pero siguió adelante para llegar hasta hoy.

A todos los becarios e investigadores que aportaron su granito de arena en esta tesis, gracias.

“Si he visto más lejos, es porque estoy sentado sobre los hombros de gigantes”

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
Objetivo general	13
Esquema de la tesis	13
Capítulo I: Caracterización de la respuesta de alfalfa a sequía	15
1.1 Introducción	15
1.2) Materiales y Métodos	17
1.2.1) Material vegetal y condiciones de estrés	17
1.2.2) Determinación de variables agronómicas	17
1.2.3) Fenotipado de raíces	18
1.2.4) Cortes histológicos	18
1.2.6) Conteo de estomas	19
1.2.7) Estudio de expresión génica	20
1.2.8) Análisis estadístico	21
1.3) Resultados	22
1.3.1) Tasa de supervivencia al estrés e índice verde	22
1.3.2) Determinación de variables biométricas	24
1.3.3) Estudio morfológico de raíces	27
1.3.4) Producción de ceras epicuticulares y análisis estomático	29
1.3.5) Análisis molecular de la expresión de genes relacionados con vías hormonales	31
1.4) Discusión y conclusiones	36
Capítulo II: Análisis integral de la respuesta de cultivares de alfalfa al anegamiento	41
2.1) Introducción	41
2.2) Materiales y Métodos	44
2.2.1) Material vegetal y aplicación del estrés	44
2.2.2) Determinación de variables agronómicas	44
2.2.3) Fenotipado de raíces	45
2.2.4) Cortes histológicos	45
2.2.5) Cuantificación de ceras	46
2.2.6) Conteo de estomas	46
2.2.7) Estudio de expresión génica	47
2.2.8) Cuantificación de hormonas	48
2.2.9) Análisis estadístico	49
2.3) Resultados	50
2.3.1) Supervivencia y coloración de plantas sometidas a inundación	50
2.3.2) Determinación de variables biométricas	52
2.3.3) Estudio morfológico de las raíces	56

2.3.4) Cuantificación de ceras epicuticulares y análisis estomático	58
2.3.5) Análisis molecular de la expresión de genes relacionados con vías hormonales	60
2.3.6) Perfil hormonal de los cultivares	64
2.4) Discusión y conclusiones	69
Capítulo III: Caracterización de plantas de Arabidopsis thaliana expresantes del gen MsMDHAR.	77
3.1) Introducción	77
3.2) Materiales y métodos	79
3.2.1) Construcción genética	79
3.2.2) Transformación e identificación de plantas modificadas	79
3.2.3) Determinación de ascorbato y dehidroascorbato	80
3.2.4) Ensayos de estrés abiótico	81
3.2.5) Fenotipado de raíces	82
3.2.6) Determinación de ceras	83
3.2.7) Conteo de estomas	83
3.2.8) Contenido de clorofila a	83
3.2.9) Medición del contenido relativo de agua	84
3.2.10) Determinación de ROS	84
3.2.11) Cuantificación del nivel de expresión génica	85
3.2.12) Análisis estadístico	85
3.3) Resultados	86
3.3.1) Análisis molecular de eventos de Arabidopsis thaliana expresantes de MsMDHAR	86
3.3.2) Análisis metabólico	87
3.3.3) Evaluación de plantas transgénicas MsMDHAR sometidas a estrés hídrico	88
3.3.4) Estudio del desarrollo de raíces en condiciones normales y de sequía	90
3.3.5) Análisis fisiológicos de las plantas transgénicas MsMDHAR	93
3.3.6) Los niveles de H ₂ O ₂ se reducen en las plantas transgénicas MsMDHAR-9	96
3.4) Discusión	98
DISCUSIÓN GENERAL	103
BIBLIOGRAFÍA	106
MATERIAL SUPLEMENTARIO	126
I) Composición de las soluciones utilizadas	126
II) Oligonucleótidos utilizados en reacciones de PCR semi-cuantitativa y PCR en tiempo real (qPCR)	126
III) Figura Suplementaria 1: aplicación del anegamiento.	127
IV) Figura Suplementaria 2: ciclo del Ascorbato-Glutatión	128

ABREVIATURAS

ADN Ácido desoxirribonucleico

ADNc ADN copia

ARN Ácido ribonucleico

ARNm ARN mensajero

g Fuerza centrífuga relativa

gr Gramo

ha Hectárea

Kg Kilogramo

l Litro

m Metro

M Molar

mg Miligramo

ml Mililitro

mm Milímetro

mM Milimolar

Pb Pares de bases

PF Peso fresco

PS Peso seco

p/v Peso en volumen

ROS Especies reactivas del oxígeno

rpm Revoluciones por minuto

RT- PCR Retrotranscripción seguida de PCR

TAE Solución Tris-acético-EDTA

µg Microgramo

µl Microlitro

RESUMEN

La alfalfa es una leguminosa de gran importancia económica y cultivada en gran parte del mundo debido a varios factores que destacan su valor en la agricultura y la ganadería. Su forraje es de alta calidad gracias a su elevado contenido de nutrientes, vitaminas y minerales. Sumado a su alta palatabilidad, la convierten en un alimento ideal para el ganado.

Con alrededor de 3 millones de hectáreas cultivadas, Argentina es uno de los principales productores de alfalfa del mundo. No obstante, la creciente variabilidad climática de las últimas décadas, incluyendo períodos de sequía, altas temperaturas, inundaciones y otros eventos climáticos extremos, afecta directamente la producción y persistencia de esta pastura, ocasionando pérdidas económicas importantes para los agricultores.

En este aspecto, el estrés hídrico, tanto como por defecto como por exceso, tiene un impacto considerable en los cultivos, afectando directamente su rendimiento y supervivencia. Bajo estas condiciones se ven alterados procesos clave como la fotosíntesis, la transpiración y la absorción de nutrientes. Este estrés puede afectar la producción agrícola, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria, la economía y la sostenibilidad ambiental. Por ello, la investigación y las prácticas agrícolas adaptativas son fundamentales para mitigar el impacto del estrés hídrico sobre los cultivos.

En esta tesis se caracterizó la respuesta frente al estrés hídrico de tres cultivares de alfalfa utilizados en la región central de la provincia de Santa Fe. Las plantas fueron sometidas, por un lado, a 14 días de anegamiento y, por otro, a 14 días de sequía, tras los cuales se evaluaron parámetros agronómicos, morfológicos, bioquímicos y moleculares. De esta manera, se logró determinar el grado de tolerancia o sensibilidad de cada uno de los cultivares a dicho estrés. La selección de cultivares más tolerantes es esencial para abordar desafíos como la sostenibilidad agrícola y la adaptación al cambio climático, al tiempo que contribuye a una gestión más eficiente y responsable de los recursos forrajeros por parte de los productores.

Con este propósito, el presente estudio concluye también con una exhaustiva caracterización de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a condiciones de sequía y anegamiento. El objetivo fue determinar si el gen *MsMDHAR* de alfalfa puede estar involucrado en la tolerancia a este tipo de estrés, el cual ejerce una influencia significativa en el desarrollo de este cultivo. Este enfoque busca contribuir al mejoramiento genético de la alfalfa, ofreciendo nuevas perspectivas para su manejo y producción en condiciones adversas.

Palabras clave: Alfalfa, anegamiento, sequía, estrés

ABSTRACT

Alfalfa is a legume of great economic importance and is cultivated in many parts of the world due to several factors that highlight its value in agriculture and livestock. Its forage is of high quality, thanks to its elevated nutrient, vitamin, and mineral content. Coupled with its high palatability, it makes an ideal feed for livestock.

With around 3 million hectares under cultivation, Argentina is one of the world's leading producers of alfalfa. However, the increasing climate variability over the past few decades, including periods of drought, high temperatures, floods, and other extreme weather events, directly affects the production and persistence of this forage, causing significant economic losses for farmers.

In this regard, water stress, both from deficiency and excess, has a considerable impact on crops, directly affecting their yield and survival. Under these conditions, key processes such as photosynthesis, transpiration, and nutrient uptake are altered. This stress can affect agricultural production, food security, the economy, and environmental sustainability. Therefore, research and adaptive agricultural practices are essential to mitigate the impact on crops.

In this thesis, the response to water stress of three alfalfa cultivars used in the central region of the province of Santa Fe was characterised. The plants were subjected to 14 days of waterlogging and, separately, 14 days of drought, after which agronomic, morphological, biochemical, and molecular parameters were evaluated. In this way, it was possible to determine the degree of tolerance or sensitivity of each cultivar to this stress. The selection of more tolerant cultivars is essential to address challenges such as agricultural sustainability and climate change adaptation, while contributing to more efficient and responsible management of forage resources by producers.

For this purpose, the present study concludes with a thorough characterisation of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants subjected to drought and waterlogging conditions. The aim was to determine whether the alfalfa *MsMDHAR* gene may be involved in tolerance to this type of stress, which has a significant influence on the development of this crop. This approach seeks to contribute to the genetic improvement of alfalfa, offering new perspectives for its management and production under adverse conditions.

Keywords: Alfalfa, waterlogging, drought, stress

INTRODUCCIÓN

Medicago sativa L., difundida como alfalfa, es una leguminosa perenne de porte erecto y que debido a sus aptitudes es conocida como la reina de las forrajeras (Lin et al., 2021). Es fundamental en la dieta del ganado bovino, ovino y caprino (Blume et al., 2021). Este cultivo proporciona una fuente crucial de proteínas, vitaminas y minerales en la dieta animal (Kulkarni et al., 2018; Marković et al., 2009), contribuyendo directamente al aumento de la producción de leche y carne (Horner et al., 1985), y mejorando la salud y el rendimiento general del ganado (Blume et al., 2021; Vanzant et al., 1994). Una característica a destacar de este cultivo es la persistencia del mismo, la cual en óptimas condiciones de manejo, de suelo y climatológicas puede alcanzar una vida productiva de entre 3 y 5 años (Veronesi et al., 2010).

En cuanto a su morfología (Figura 1), la alfalfa posee semillas generalmente arriñonadas y de color amarillento, aunque pueden encontrarse algunas con formas angulares y de distintas tonalidades del marrón (Figura 1a; Del Pozo Ibáñez, 1977). Sus hojas son compuestas (Figura 1b), formadas normalmente por tres folíolos (trifolioladas); no obstante, pueden encontrarse hojas de cuatro o más folíolos (multifolioladas; Barsukov et al., 2024). En la parte superior de la raíz se desarrolla una estructura que se denomina corona (Figura 1c). En la misma se encuentran las yemas que formarán el rebrote basal, emitiendo tallos principales que son responsables, junto a los secundarios, del rebrote de la planta (Marquez-Ortiz et al., 1996). Su sistema radicular es robusto y profundo, con una longitud que alcanza normalmente los 4 metros, pudiéndose extender de 5 a 7 metros en suelos bien drenados (Herbert et al., 2000). Sus raíces se pueden clasificar en cuatro categorías: pivotantes, ramificadas, rizomatosas y rastreras (Goplen et al., 1980). En cultivares sin reposo invernal (GRI 8-11), como los que se utilizan normalmente en la región pampeana de nuestro país, generalmente se observa una raíz pivotante con pocas ramificaciones.

En cuanto a sus flores, estas se agrupan en inflorescencias en forma de racimo simple, conteniendo entre 10 y 30 flores cada una (Figura 1d), siendo estas de distintos tonos de violetas y azules. Es una especie que presenta fecundación preponderantemente alógama, favorecida por mecanismos naturales de autoincompatibilidad y autoesterilidad (Viands et al., 1988).

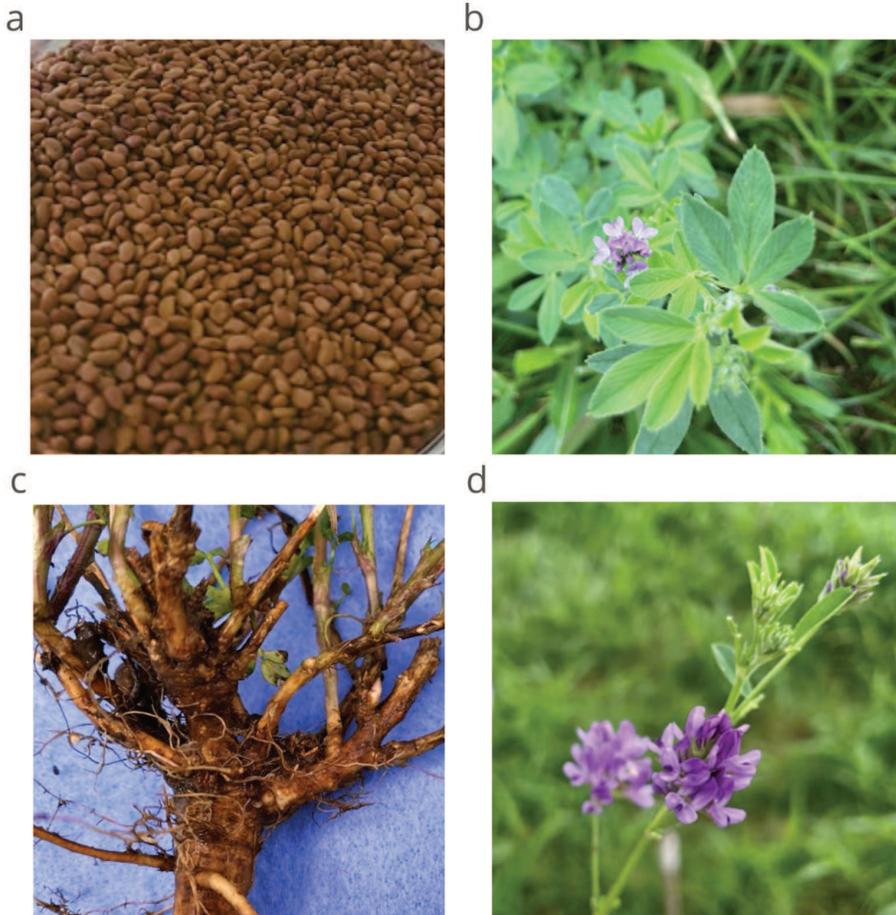


Figura 1. Morfología de *Medicago sativa* L. a. Semillas de alfalfa con forma arriñonada y colores que varían del amarillo pálido al marrón. b. Hojas trifolioladas, la forma más abundante de hojas de este cultivo. c. Corona de una planta de aproximadamente 1 año de edad. d. Inflorescencia en forma de racimo simple.

La importancia de la alfalfa en la industria ganadera es innegable, especialmente en países con sistemas ganaderos altamente desarrollados, donde la demanda de forraje de alta calidad es constante. En este contexto, las exportaciones argentinas de alfalfa han experimentado un crecimiento significativo en respuesta a la demanda internacional de forraje nutritivo y confiable (Consejo Agroindustrial Argentino, 2023).

Con cerca de 3 millones de hectáreas (ha) actualmente cultivadas y, a pesar de que el área de siembra del cultivo ha experimentado una disminución durante la última década, Argentina es uno de los principales productores de alfalfa en el mundo. Es por lejos el principal productor de

América del Sur, donde Uruguay (140.000 ha), Perú (120.000 ha), Chile (120.000 ha), Bolivia (65.000 ha) y Brasil (35.000 ha) distan considerablemente de la producción argentina (Basigalup et al., 2022). Aunque la mayor parte de la superficie cultivada se encuentra predominantemente en las regiones sur y centro de las provincias de Santa Fe y Córdoba, así como en el norte de Buenos Aires y La Pampa, la producción bajo riego está creciendo en otras áreas del país (Odorizzi, 2015). Por ejemplo, la producción de semillas se lleva a cabo principalmente en zonas áridas con riego y sin precipitaciones estivales (Echeverría et al., 1995). Provincias como Mendoza y San Juan, entre otras, destacan por sus altas tasas de producción de alfalfa, tanto de semilla como de heno. Aproximadamente el 60% se cultiva en forma pura y el 40% en mezclas con diferentes pasturas forrajeras (Basigalup et al., 2018). Las áreas puras se usan principalmente para producir leche y heno, mientras que las mezclas se destinan generalmente a la producción de carne. La amplia distribución de la alfalfa en Argentina (Figura 2) indica una notable capacidad de adaptación del cultivo a las diversas condiciones de precipitaciones, suelos, temperatura, plagas, enfermedades y prácticas de manejo específicas de cada región.



Figura 2. Regiones del cultivo en Argentina. En verde oscuro se destacan todas las zonas productoras de alfalfa. En verde claro se indica la región de mayor concentración de cultivo. Modificado de Davies, 2018.

La reducción gradual pero constante en la extensión de cultivo de alfalfa se debe a diversos factores, incluyendo el cambio en el uso del suelo, que prioriza el empleo de los de mejor calidad para la agricultura exclusiva (Jáuregui et al., 2022). El traslado de recursos forrajeros hacia suelos poco adecuados o “marginales” planteó desafíos para el cultivo de alfalfa, que requiere niveles óptimos de fertilidad química y características físicas apropiadas para su producción y persistencia (Summers & Putnam, 2008). Estos suelos, en general, manifiestan una menor disponibilidad de nutrientes esenciales (Lal, 2009), condiciones de suelo compactadas que dificultan el crecimiento de las raíces del cultivo (Glab, 2011), una menor capacidad de retención de humedad del suelo (Vanwalleghem et al., 2017), y mayores fluctuaciones de temperatura debido a la menor capacidad de los suelos pobres para regular la temperatura del mismo.

A pesar de su relevancia, todas estas situaciones derivadas del traslado del cultivo a suelos de menor calidad crean desafíos que pueden limitar su rendimiento, calidad y persistencia. Entre ellos, el estrés abiótico se destaca como uno de los factores más prominentes. Dicho estrés, consecuencia de condiciones ambientales adversas como la sequía y el anegamiento, puede afectar negativamente el crecimiento, desarrollo y productividad de la alfalfa.

En esta tesis, nos enfocaremos en explorar los efectos del estrés hídrico en la alfalfa, tanto por exceso como por defecto. La sequía y el anegamiento representan dos extremos del espectro hídrico que pueden comprometer seriamente la supervivencia y el rendimiento de los cultivos. Comprender cómo la alfalfa responde y se adapta a estas condiciones es esencial para desarrollar estrategias de manejo agronómico que mejoren la tolerancia, la productividad y la persistencia del cultivo en un contexto cambiante de clima y demanda global de forraje.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar y analizar los efectos del estrés hídrico en la alfalfa desde diversas perspectivas agronómicas. Se abordarán aspectos relacionados con las respuestas fisiológicas, morfológicas y moleculares de la planta frente a condiciones adversas, con el propósito de identificar estrategias y prácticas que puedan mejorar la tolerancia de la alfalfa a estos factores de estrés. A través de este estudio, no solo se busca avanzar en el conocimiento científico sobre la fisiología y bioquímica de la alfalfa frente al estrés hídrico, sino también proporcionar información práctica y aplicable para mejorar la resiliencia y sostenibilidad de los sistemas de producción forrajera, contribuyendo así al fortalecimiento de la seguridad alimentaria y la viabilidad económica de la industria ganadera a nivel local e internacional.

Objetivo general

Evaluar los mecanismos morfológicos, bioquímicos, moleculares y fisiológicos implicados en la respuesta de plantas de alfalfa a estrés hídrico, con la finalidad de encontrar nuevas alternativas que apunten a mejorar la productividad y persistencia de alfalfares. Además, se propone analizar datos transcriptómicos y proteómicos que permitan detectar genes de interés para el desarrollo de estrategias biotecnológicas destinadas a disminuir las pérdidas ocasionadas por anegamiento.

Se contemplan los siguientes objetivos específicos:

- Identificación de los grados de daño en alfalfa sometida a condiciones de sequía y anegamiento.
- Estudio de la respuesta de alfalfa en diferentes condiciones de estrés abiótico.
- Análisis molecular de plantas de alfalfa sometidas a sequía y anegamiento.
- Estudio funcional de genes involucrados en procesos de estrés hídrico mediante la generación de líneas transgénicas de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Esquema de la tesis

Con el fin de responder a los objetivos mencionados, el presente trabajo se organizó de la siguiente manera:

En el capítulo I se analizó la situación actual del efecto de la sequía sobre plantas de alfalfa. Particularmente se evaluó la influencia de dicho estrés en el desarrollo, morfología y fisiología de tres cultivares utilizados en nuestra región. Para ello, se sometieron a las variedades NK-Vaquera 9, NK-Matrera 8 y Monarca SP INTA 8 a sequía siguiendo de una evaluación de parámetros agronómicos, bioquímicos y moleculares para determinar su grado de tolerancia a dicho estrés.

En el mismo sentido, en el capítulo II se analizó el estrés hídrico por exceso, es decir que se sometieron a los cultivares antes mencionados a 14 días de anegamiento, luego de los cuales, se determinaron los parámetros agronómicos, bioquímicos y moleculares previamente

mencionados. De esta manera se clasificaron a los cultivares dependiendo de la tolerancia o sensibilidad a este estrés.

Finalmente, en el último capítulo de esta tesis, capítulo III, se analizó la participación de una enzima clave del ciclo del Ascorbato-Glutatión en los mecanismos de protección celular frente al estrés hídrico. Para ello se desarrollaron y caracterizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* expresantes del gen *MsMDHAR*, codificante para la enzima monodehidroascorbato reductasa de alfalfa. La selección de este gen se basó en diversos análisis transcriptómicos y proteómicos previamente publicados, los cuales indicaron su posible papel relevante en la respuesta al estrés abiótico.

Capítulo I: Caracterización de la respuesta de alfalfa a sequía

1.1 Introducción

La sequía es una de las principales limitaciones productivas y afecta la producción de una amplia variedad cultivos a nivel mundial (Lesk et al., 2016). No solo limita el crecimiento normal de las plantas, sino que también reduce la eficiencia en el uso del agua. Afecta negativamente la tasa fotosintética al reducir la conductancia estomática y limitar el suministro de CO₂ al sitio de fijación (Flexas et al., 2004). Se ha observado también, que la sequía durante el período de floración puede disminuir significativamente el número de flores y, en última instancia, el rendimiento del cultivo (Farooq et al., 2009). Aún más, el estrés hídrico por déficit puede provocar la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células vegetales, lo que resulta en daño oxidativo y en la alteración de procesos metabólicos claves (Chaves et al., 2003).

Las plantas, a su vez, muestran una variedad de mecanismos para resistir la sequía, como por ejemplo, la reducción de la pérdida de agua mediante el aumento de la resistencia difusiva, mayor absorción de agua debido al desarrollo de sistemas radiculares profundos, y disminución del tamaño de las hojas para reducir la pérdida transpiratoria (Farooq et al., 2012).

La alfalfa es un cultivo forrajero perenne nativo de ambientes áridos y semiáridos. Se estima que desde hace unos 4.000 años AC ya era cultivada en Oriente Medio. Luego del año 1.200 AC el cultivo llegó a Grecia y fue desde allí donde se difundió hacia el resto del mundo (Rodríguez et al., 2022). Su sistema radicular profundo la ayuda a prevenir la pérdida de suelo y agua en tierras semiáridas (Moran et al., 1994). Debido a esto, es una especie considerada resistente y con un nivel relativamente más alto de tolerancia a la sequía en comparación con otros cultivos (Tang et al., 2013).

Este cultivo muestra una alta tolerancia a sequía siempre y cuando pueda desarrollar un sistema de raíces amplio y el suelo tenga capacidad para retener agua (Annicchiarico, 2007; Ma et al., 2021). A pesar de su reputación de ser tolerante al déficit hídrico, la variabilidad en la respuesta a la falta de agua entre diferentes cultivares puede ser significativa (Kang et al., 2011). Al entender cómo distintas variedades de alfalfa responden al estrés hídrico, los agricultores pueden seleccionar los cultivares más adecuados para sus condiciones específicas, optimizando

así el uso del agua y asegurando una producción sostenible y consistente. En los últimos años se han logrado desarrollar algunas variedades transgénicas de alfalfa con el fin de aumentar su tolerancia al estrés por sequía (Li et al., 2014; Ferradini et al., 2015). Sin embargo, los efectos perjudiciales del estrés abiótico siguen siendo un límite importante para la producción de alfalfa (Wang et al., 2015). Identificar los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que permiten a la alfalfa tolerar la sequía puede, a su vez, ayudar a determinar genes específicos involucrados en la resistencia al estrés hídrico. La identificación y caracterización de estos genes, así como las vías metabólicas que modulan son cruciales para el desarrollo de nuevas variedades de alfalfa con mayor resistencia.

En Argentina, los estudios sobre variabilidad genotípica de la respuesta de la alfalfa al déficit hídrico son aún escasos. Es por eso que en esta tesis se evaluó la respuesta bajo condiciones de sequía de tres cultivares utilizados en la región centro-norte del país. En este capítulo se presentarán los resultados de la caracterización de la respuesta de los cultivares NK-Vaquera 9 (Vaquera), NK-Matrera 8 (Matrera) y Monarca SP INTA 8 (Monarca).

Tras el estrés, los cultivares mostraron niveles similares de supervivencia e índice de verdor, pero una marcada reducción del peso fresco (PF) y seco (PS) en la parte aérea. Monarca, fue el más afectado en el desarrollo radicular, con mayor disminución del diámetro de raíces y depósitos de suberina en todos los cultivares. A nivel molecular, Monarca no mostró un aumento en la expresión del gen de aldehído oxidasa 2 (AO), clave en la síntesis de ácido abscísico (Seo & Koshiba, 2002), a diferencia de Matrera y Vaquera, lo que podría explicar su respuesta diferencial a la sequía.

En síntesis, en un contexto de cambio climático, donde se prevé un aumento en la frecuencia y severidad de los eventos de sequía (Goodess, 2013), es de suma importancia contar con cultivos que puedan mantener su productividad en condiciones adversas. Este trabajo busca dar herramientas para la elección o mejoramiento de cultivares naturalmente mejor adaptados al estrés, además de intentar comprender las vías involucradas en la tolerancia a estas situaciones críticas. Esto no solo ayudaría a mejorar la estabilidad económica de las comunidades rurales, sino que también promovería prácticas agrícolas más sostenibles al reducir la necesidad de riego y el uso de recursos hídricos limitados.

1.2) Materiales y Métodos

1.2.1) Material vegetal y condiciones de estrés

Un total de 24 plantas de cada cultivar (NK-Vaquera 9, NK-Matrera 8 y Monarca SP INTA 8) fueron cultivadas en cámara de cultivo con temperatura promedio de 25 °C, ciclo de 16 horas de luz y riego normal con agua desmineralizada. Las plantas fueron cultivadas en macetas plásticas conteniendo sustrato comercial GrowMix® Multipro (Terrafertil). El riego se prolongó durante 4 semanas hasta el estadio vegetativo 1 (vegetativo temprano; Rodríguez & Spada, 2007). Luego de ello, se suspendió el riego durante 14 días a 12 plantas de cada cultivar, mientras que las 12 restantes continuaron con riego normal y fueron utilizadas como control.

La capacidad exploratoria de las raíces de los genotipos no fue considerada en nuestros ensayos dadas las limitaciones de las condiciones en las cuales el estrés fue evaluado, llevándose a cabo en macetas de 0,2 litros. Sin embargo, se midieron parámetros biométricos, tales como biomasa aérea, biomasa radicular, contenido de ceras, apertura estomática y morfología interna. Para los estudios se consideró que todas las macetas contaban con la misma cantidad de agua (25-30% de capacidad de campo), por lo que juzgamos apropiado para determinar el grado de tolerancia/sensibilidad de un genotipo. Este ensayo fue repetido 3 veces y los resultados muestran el promedio obtenido de ellos.

1.2.2) Determinación de variables agronómicas

Luego de 14 días de estrés, se determinó el porcentaje de sobrevivencia de los diferentes cultivares. Además, se midió el índice de verdor de todas las plantas vivas utilizando el medidor de clorofilas SPAD-502 (Konica Minolta).

Luego, las plantas fueron retiradas de su maceta y lavadas cuidadosamente para no romper el sistema radicular. Las plantas fueron colocadas en una batea con agua, fotografiadas y digitalizadas para posteriores análisis estructurales. Posteriormente, se separaron las partes radiculares de las aéreas de cada planta de alfalfa y se pesaron para determinar el peso fresco (PF). Cada muestra se introdujo luego en sobres de papel individuales para su secado completo en estufa a 60 °C hasta peso constante. Al llegar a este punto, se procedió a realizar las mediciones para la obtención del peso seco (PS).

1.2.3) Fenotipado de raíces

Las fotografías de las raíces de todas las plantas sobrevivientes obtenidas en el punto anterior, fueron analizadas con el programa de procesamiento y análisis de imágenes ImageJ Fiji (<https://fiji.sc/>) para la determinación del área total de las raíces y longitud de la raíz principal.

1.2.4) Cortes histológicos

Fragmentos de raíces de los tres cultivares crecidos tanto en condiciones de riego normal como en sequía, fueron fijadas en FAA (ver material suplementario) por 48 horas, y preservados en etanol 70% (v/v) hasta su procesamiento. Luego fueron seleccionadas las zonas a cortar y escindidas con un bisturí. Se seleccionó la zona de la raíz 3 cm por debajo de la interfase tallo-raíz. Se utilizaron 5 réplicas biológicas de cada variedad y tratamiento.

Los fragmentos de raíces de alrededor de 1 cm de largo fueron colocados en distintos casetes de procesamiento. A continuación, se realizaron los siguientes pasos sucesivos a fin de preparar las muestras para el entacado: fueron deshidratadas en una serie creciente de etanol 80% (v/v), 90% (v/v), 95% (v/v), 30 minutos en cada solución; 2 pasajes por etanol 100% (v/v), de 30 minutos cada uno; solución etanol-xilol 3:1, etanol-xilol 1:1 y etanol-xilol 1:3 por 60 minutos cada una, 2 pasajes por xilol puro, de 1 hora cada uno; mezcla xilol-parafina 3:1, xilol-parafina 1:1, xilol-parafina 1:3, de 2 horas cada una y a 60 °C; 2 pasajes por parafina pura de al menos 2 horas cada uno.

Luego se procedió al armado del taco. Los bloques de parafina con las muestras en su interior fueron cortados transversalmente a 10 µm de espesor, mediante la utilización de un micrótopo de rotación (Leica RM2125 RTS). Las secciones obtenidas fueron teñidas utilizando una doble coloración con Safranina (Sigma-Aldrich) y Astra Blue (Biopack) y finalmente fueron montadas con Bálsamo de Canadá (Johansen, 1940; Luque et al., 1996). Todos los preparados fueron observados bajo un microscopio Leica DM1000, y fotografiados con una cámara digital Canon EOS-REBEL T2i adaptada al equipo. Para la preparación de las figuras se utilizaron los softwares ImageJ (<https://fiji.sc/>) e Inkscape (<https://inkscape.org>).

1.2.5) Determinación de ceras

Las ceras epicuticulares se extrajeron utilizando cloroformo, siguiendo el protocolo descrito en Jaime et al. (2020) con modificaciones. Brevemente, se tomaron folíolos de cinco plantas control y cinco estresadas de cada cultivar, los cuales fueron introducidos separadamente por 20 segundos en un recipiente de peso conocido, conteniendo 10 ml de cloroformo (Cicarelli). La solución obtenida (cera + cloroformo) se colocó en una campana de extracción de gases hasta evaporación total del cloroformo y determinación por peso constante del recipiente. El peso de ceras se estimó como la diferencia entre el peso del recipiente después de la evaporación del cloroformo y el mismo vacío antes de realizar el experimento. Las hojas recolectadas fueron digitalizadas, y las imágenes, usadas para la obtención del área foliar total utilizando el software Fiji (ImageJ). La cuantificación de cera fue expresada como cantidad de cera por unidad de área foliar (mg cm^{-2}).

1.2.6) Conteo de estomas

El conteo de estomas se realizó siguiendo el método descrito por Gudesblat et al. (2007) con modificaciones. Las plantas se cultivaron bajo condiciones de sequía y riego normal como se especificó anteriormente. Se eligieron al azar cinco folíolos de cinco plantas de cada cultivar, resultando en un total de 25 folíolos por cultivar, por condición de riego. Los mismos se fijaron en un portaobjetos de vidrio utilizando cinta adhesiva de doble cara transparente (3M). El mesófilo se eliminó raspándolo con una hoja de bisturí y una solución 1:1 de hipoclorito de sodio, asegurando que la epidermis abaxial permaneciera adherida a la cinta. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua y se examinaron bajo un microscopio Leica M205 FAC con un aumento total de 400X. Al localizar los estomas y células epidérmicas, se tomaron fotografías con una cámara digital Canon EOS REBEL T2i. Se seleccionaron cuatro zonas al azar para cada impresión y se realizaron conteos de estomas totales, cerrados y abiertos.

1.2.7) Estudio de expresión génica

Se realizó la extracción de ARN total, por separado, de hojas y raíces de los cultivares bajo distintas condiciones de riego (normal y sequía). Entre 50 y 100 mg de tejido fueron colocados en un tubo de 1,5 ml y se agregó 1 ml de trizol (TRIZOL, Thermo Scientific). El tejido se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C y el homogenado se transfirió a un nuevo tubo. Se agregaron 500 µl de cloroformo (Cicarelli) por cada ml de TRIZOL usado, se invirtió vigorosamente y se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos a 4 °C. La fase superior, conteniendo el ARN, fue transferida a un tubo nuevo para luego adicionar un volumen de isopropanol (Cicarelli). Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C, se removió el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 75% (v/v) frío. Se mezcló y centrifugó a 7.500 g durante 5 minutos a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante y se repitió el lavado con etanol y centrifugación. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 5-10 minutos. Se procedió a resuspender el pellet de ARN total en 50 µl de agua libre de DNAsa/RNAsa. El ARN total fue tratado con DNAsa (DNase I, NEB) según las indicaciones del fabricante. El ARN resultante se retrotranscribió a ADNc utilizando la enzima transcriptasa reversa [Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV), Trans], siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para la cuantificación relativa de los niveles de expresión de los genes analizados se utilizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). El análisis de qPCR se llevó a cabo utilizando un termociclador AriaMx Real Time PCR System (Agilent Technologies). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl, utilizando una Master Mix Maxima SYBR Green/ROX qPCR (Thermo Fisher Scientific), 200 ng de ADNc como molde y oligonucleótidos específicos para los genes a evaluar. En este caso se seleccionaron los genes codificantes para las enzimas aldehído oxidasa (AO), ACC oxidasa (ACCO), fosfolipasa A2 γ (FA2) e isocorismato sintasa (ICS). Estas enzimas cumplen roles claves en la síntesis de ácido abscísico (ABA, *abscisic acid*), etileno (ET, *ethylene*), ácido jasmónico (JA, *jasmonic acid*) y ácido salicílico (SA, *salicylic acid*), respectivamente. Para los controles basales de expresión se utilizó el gen que codifica para la ubiquitina ligasa (UBL-2a, *ubiquitin protein ligase 2a*; Castonguay et al., 2015). Para las secuencias de los oligonucleótidos, véase la tabla del material suplementario. Para determinar cuantitativamente los niveles de transcripción de los genes, se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

1.2.8) Análisis estadístico

Para probar el supuesto de normalidad se utilizó la prueba de Shapiro–Wilks (Field, 2013). La prueba de Levene se utilizó para probar el supuesto de homogeneidad de varianza (Field, 2013). Después de verificar que los datos cumplieran con los supuestos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías (según el caso) seguido de una prueba de Tukey para identificar diferencias entre los tratamientos. Todo el análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico Rstudio (R Core Team, 2021).

1.3) Resultados

1.3.1) Tasa de supervivencia al estrés e índice verde

Tres cultivares de alfalfa fueron sometidos a estrés por sequía durante 14 días. El estrés no mostró ser letal para ninguno de los cultivares evaluados (Figura 3), ya que mostraron niveles altos de sobrevivencia luego del mismo. Los cultivares Matrera y Monarca, presentaron un 92% de supervivencia mientras que Vaquera mostró un 83% de supervivencia luego de 14 días con bajo contenido de humedad en el suelo (25-30% CC; Figura 4a).

Sin embargo, la coloración de las hojas de las plantas se vio afectada significativamente. El contenido de clorofila de las hojas se utiliza como un indicador del estado fisiológico y la actividad fotosintética de las plantas (Ouyang et al., 2011). Al medir su contenido utilizando el medidor de clorofila SPAD, los 3 cultivares mostraron una disminución significativa ($p < 0,05$) de alrededor del 50% en el índice de verdor luego del estrés (Figura 4b), con valores de alrededor de 25 unidades arbitrarias, mientras que los cultivares crecidos bajo riego normal evidenciaron valores promedio de entre 50 y 55 unidades arbitrarias. Los 3 cultivares mostraron una variación en el fenotipo de sus hojas, que iban desde hojas verdes normales hasta hojas pequeñas de color amarillento y marchitas (Figura 3).

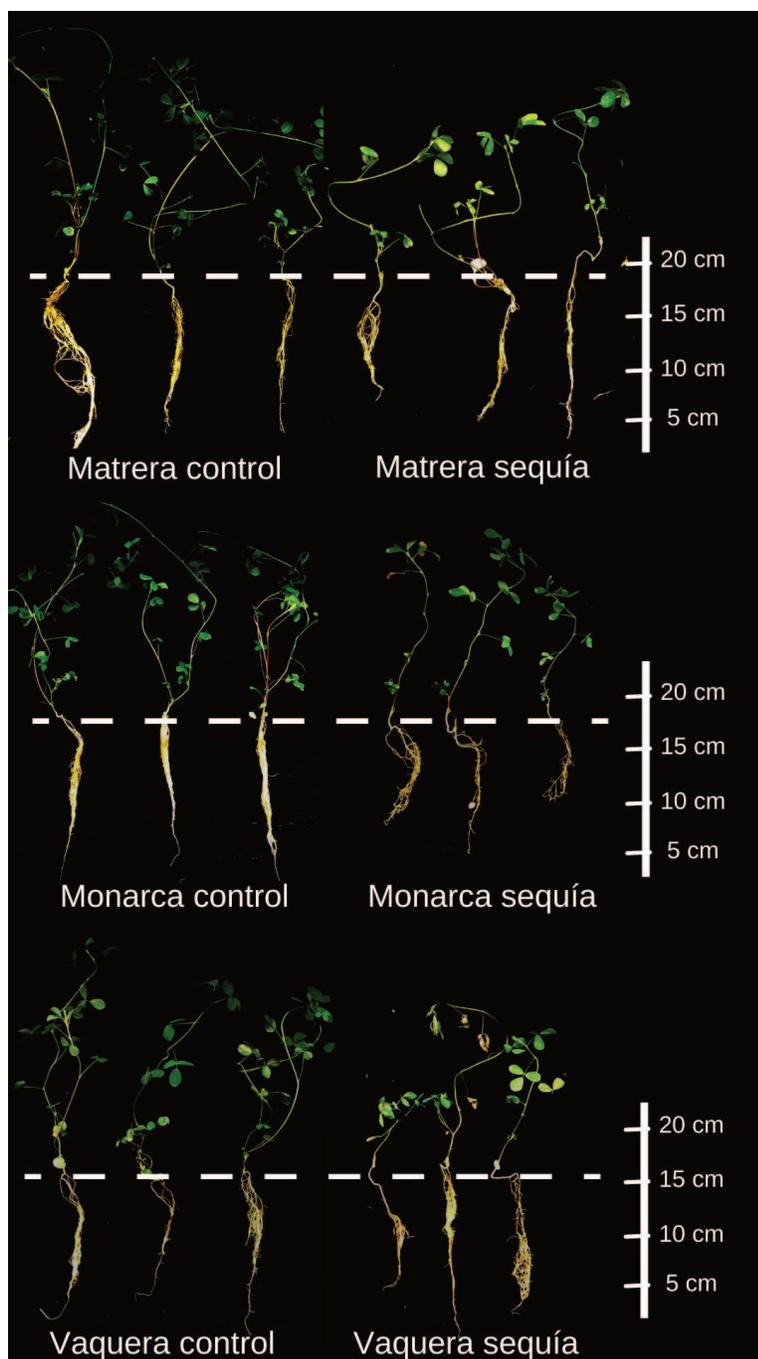


Figura 3. Fotografía de plantas de alfalfa crecidas bajo riego normal (izquierda) y sequía (derecha). Veinticuatro plantas de cada cultivar fueron crecidas en cámara de cultivo durante 4 semanas luego de las cuales, doce de ellas fueron sometidas a 14 días de sequía. Las doce restantes fueron regadas de forma normal y utilizadas como control. El ensayo fue repetido por triplicado y las fotografías son una muestra representativa de ellos.

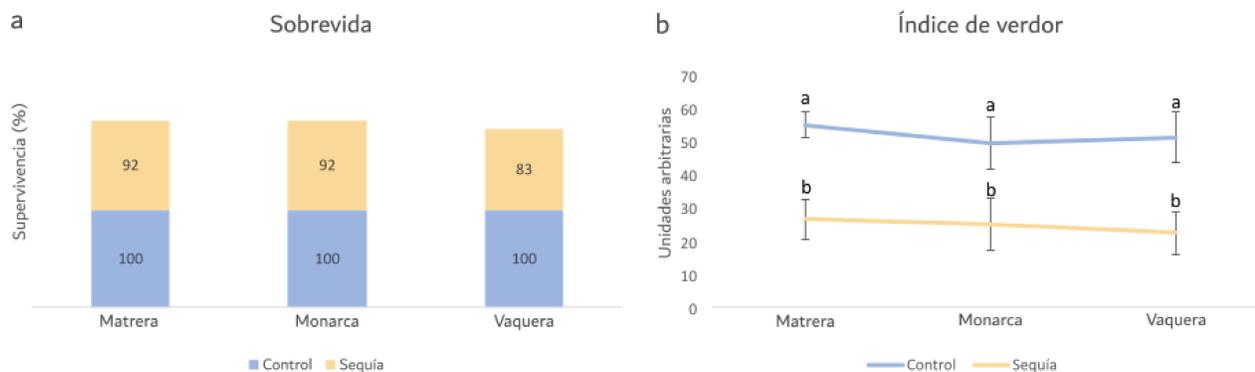


Figura 4. Caracterización de cultivares de alfalfa sometidos a sequía. a. Porcentaje de supervivencia alcanzado por cada uno de los cultivares crecidos bajo condiciones de riego normal (azul) y bajo déficit hídrico (amarillo). b. Índice de verdor obtenido utilizando el medidor de clorofila SPAD. Las plantas fueron cultivadas en cámara de cultivo con temperatura promedio de 25 °C, 16 horas de luz y riego normal durante 4 semanas. Luego se aplicó el estrés hídrico manteniendo un 25-30% CC durante 14 días. Se utilizaron 12 réplicas biológicas para cada condición y cultivar. El ensayo fue repetido por triplicado, obteniéndose resultados similares entre ellos. Las barras de error indican la desviación estándar (DE). Letras diferentes sobre las gráficas (a, b) indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey).

1.3.2) Determinación de variables biométricas

Tanto las plantas crecidas bajo riego normal como aquellas sin riego por 14 días, fueron retiradas de sus macetas, lavadas y analizadas para determinar parámetros biométricos. Se procedió a separar la parte aérea de las raíces luego de lo cual fueron pesadas para determinar el peso fresco (PF) y el peso seco (PS) tanto de parte aérea (PFA-PSA) como de raíz (PFR-PSR). Los resultados se observan en la Figura 5. En condiciones control, las plantas del cultivar Matrera mostraron un promedio de 1,42 g de PFA, las del cultivar Monarca un promedio de 1,29 g y las correspondientes a Vaquera 0,92 g (Figura 5a), no mostrando diferencia estadística entre ellas ($p > 0,05$). Sin embargo, los tres cultivares mostraron una disminución significativa en su

PFA luego de la sequía y comparados con los tratamientos control ($p < 0,05$). Matrera evidenció 0,3 g PFA, Monarca 0,32 g y Vaquera 0,31 g (Figura 5a). En cuanto a las raíces, las plantas en condición de riego normal (controles) mostraron un promedio de 0,23 g (Matrera), 0,43 g (Monarca) y 0,23 g (Vaquera) de PFR (Figura 5b). Al analizarlas luego del estrés, Monarca mostró una disminución significativa ($p < 0,05$) de su PFR al compararla con su control, con un peso promedio de 0,13 g. Sin embargo, las plantas de los cultivares Matera y Vaquera no mostraron diferencia significativa en su PFR luego del estrés, con valores de 0,14 g y 0,17 g, respectivamente (Figura 5b).

Luego del secado en estufa hasta peso constante, se procedió a evaluar el PSA y PSR. En condiciones controles, los cultivares Matrera, Monarca y Vaquera mostraron valores de PSA de 0,25 g, 0,20 g y 0,17 g, respectivamente. Se encontraron valores significativamente menores ($p < 0,05$) al evaluarlas en condiciones de estrés, con un promedio de 0,05 g, 0,07 g y 0,08 g para cada cultivar (Figura 5c). En relación al PSR, Matrera no mostró diferencias en los valores obtenidos en riego normal y sequía (0,020 g y 0,017 g, respectivamente). El mismo comportamiento se observó en Vaquera con valores de 0,028 g para condiciones control y 0,026 g para sequía. Sin embargo, Monarca sí mostró diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos en condiciones control (0,04 g) y durante el déficit hídrico (0,025 g; Figura 5d).

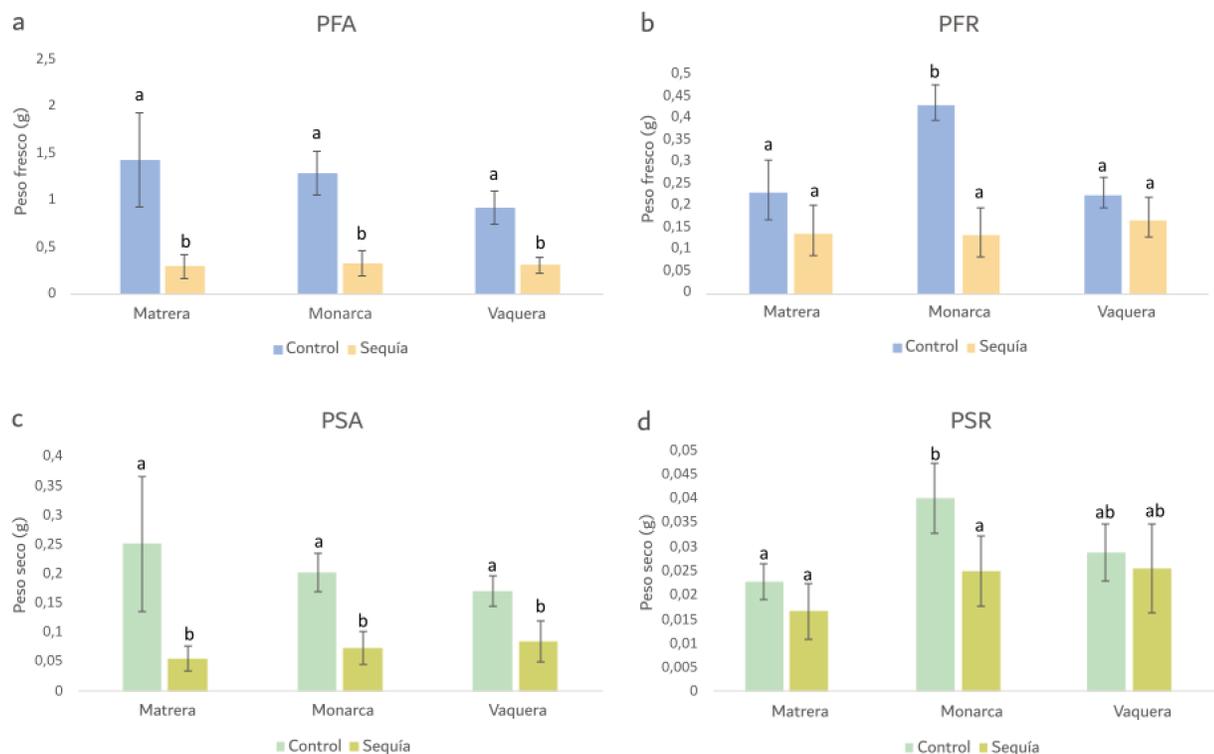


Figura 5. Análisis de peso de parte radicular y aérea de plantas bajo sequía. a. Peso fresco de hojas y tallos (PFA). b. Peso fresco de la raíz (PFR). c. Peso seco de hojas y tallos (PSA). d. Peso seco de raíz (PSR). Las plantas fueron cultivadas en cámara de cultivo con condiciones controladas durante 4 semanas, luego de las cuales la mitad de ellas se sometieron a sequía durante 14 días. La mitad restante se mantuvo bajo riego normal y fue utilizada como control. Se utilizaron 12 réplicas biológicas para cada condición y cultivar. El ensayo fue repetido por triplicado, obteniéndose resultados similares. Las barras de error indican la DE. Diferentes letras sobre los histogramas (a, b) indican valores significativamente diferentes entre tratamientos ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey).

Previo a la determinación de peso fresco, la raíz de cada planta sobreviviente fue fotografiada individualmente en una batea con agua para analizar su estructura. Las imágenes fueron luego digitalizadas y analizadas utilizando el software ImageJ. De esta manera se determinó la longitud y el área total de las raíces de cada cultivar (Figura 6).

Respecto a la longitud, los cultivares Matrera y Vaquera no mostraron diferencias entre aquellas plantas crecidas en condiciones control y aquellas sometidas a sequía ($p > 0,05$; Figura 6a). Sin embargo, Monarca mostró nuevamente una disminución significativa ($p < 0,05$) en sus

valores comparando aquellas crecidas bajo riego normal (15,9 cm) con las sometidas a estrés (10,5 cm; Figura 6a).

Un comportamiento similar fue encontrado al analizar el área de las raíces donde solo el cultivar Monarca se vio afectado significativamente ($p < 0,05$), con un área promedio de 11 cm² para aquellas plantas crecidas en condiciones control y un área de 4,2 cm² para las estresadas (Figura 6b).

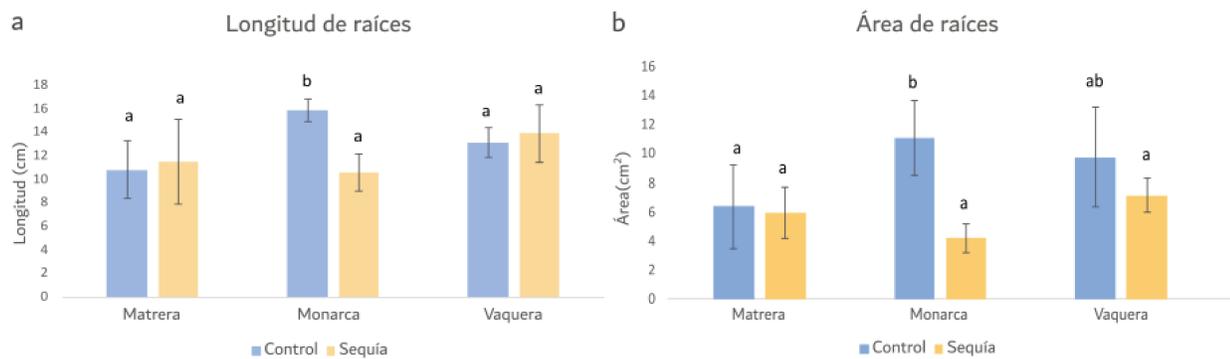


Figura 6. Fenotipado de raíces de plantas crecidas en condiciones normales (barras azules) y en sequía (barras amarillas). a. Longitud de raíces. b. Área radicular. El estrés fue aplicado luego de 4 semanas de crecimiento normal y cortando el riego durante 14 días. Para el análisis se utilizó ImageJ Fiji (<https://fiji.sc/>). Se utilizaron 12 réplicas biológicas para cada condición y cultivar. El ensayo fue repetido por triplicado, con resultados similares entre ellos. Las barras de error indican la DE. Diferentes letras (a, b) corresponden a diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey).

1.3.3) Estudio morfológico de raíces

La histología estudia la composición, la estructura y las características de los tejidos de los seres vivos. Para evaluar la influencia del estrés hídrico sobre la morfología interna de las raíces, se decidió realizar cortes transversales de 10 μm de espesor a las raíces de plantas correspondientes a los 3 cultivares sometidos a dos condiciones de riego diferentes (riego normal y sequía).

Como se observa en la Figura 7, los tres cultivares muestran una fortificación de la capa más externa de la peridermis en sequía, dada por depósitos de suberina (Figura 7, flechas negras). Esto es coherente con la necesidad de una resistencia superior que les permitiría una mayor capacidad exploratoria en búsqueda de agua en suelos compactados o endurecidos.

Interesantemente, también se observa una disminución en el diámetro de las raíces al comparar aquellas plantas crecidas en condiciones control y aquellas que sufrieron el estrés (Figura 7). En este sentido, Vaquera fue el cultivar menos afectado, mostrando en promedio una relación de 1,1 entre el diámetro de las plantas control y el diámetro de las estresadas. El cultivar Matrera tuvo un comportamiento intermedio, observándose una relación promedio de 1,6 (control/sequía), mientras que el cultivar Monarca fue el más afectado, mostrando en promedio 2,7 veces mayor diámetro en los cortes de raíces control en comparación a aquellos sometidos a déficit hídrico.

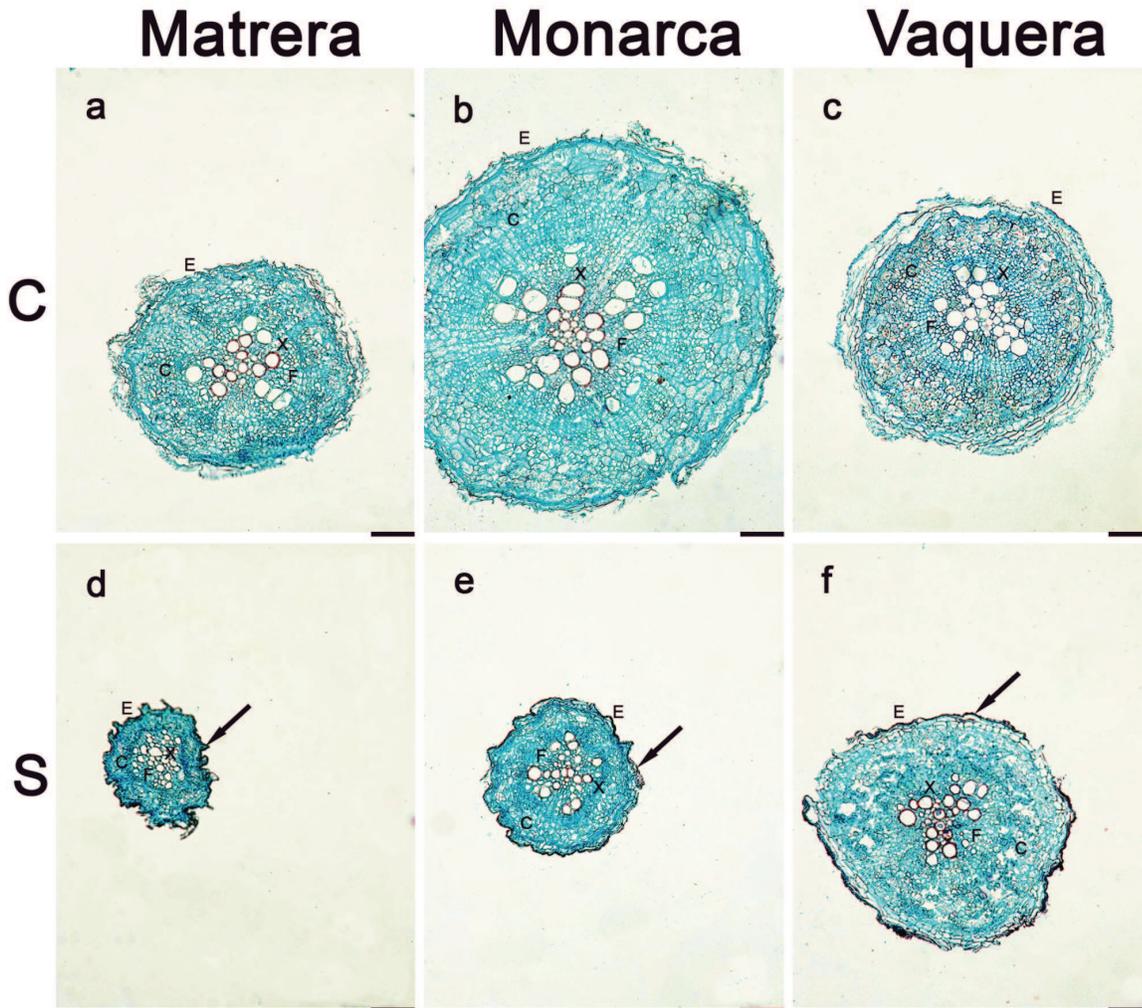


Figura 7. Análisis histológico de raíces de alfalfa crecidas con riego normal (C) y con déficit hídrico (S), y teñidos con Safranina y Astra Blue. Se seleccionó la zona de la raíz 3 cm por debajo de la interfase tallo-raíz. Se utilizaron 5 réplicas biológicas de cada cultivar y tratamiento. La figura es representativa de los resultados de todas las réplicas analizadas. Las flechas negras indican los depósitos de suberina. La letra X corresponde al xilema, la F al floema, la C indica el córtex y la E, la epidermis. Las barras negras indican la escala y corresponden a 100 μm .

1.3.4) Producción de ceras epicuticulares y análisis estomático

Para evaluar el comportamiento fisiológico de las plantas sometidas a déficit hídrico, se determinó el contenido de ceras epicuticulares totales utilizando extracción con cloroformo. Se seleccionaron cinco hojas de cinco plantas al azar de cada cultivar y por cada condición de riego.

Como puede observarse en la Figura 8a, los tres cultivares aumentaron la producción de ceras durante el período de sequía. En condiciones control, Matrera mostró en promedio 1,60 mg/cm², Monarca 1,48 mg/cm² y Vaquera 1,73 mg/cm² de ceras epicuticulares por área foliar. Respecto a la condición de déficit hídrico, se encontraron valores de 3,80 mg/cm², 2,41 mg/cm² y 3,10 mg/cm² de ceras para Matrera, Monarca y Vaquera, respectivamente.

A su vez, utilizando el sistema de negativo previamente reportado y descrito anteriormente en el punto 1.2.6, se cuantificó el número de estomas totales por mm² en hojas de plantas bajo las dos condiciones previamente mencionadas. Como muestra la Figura 8b, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el número de estomas totales ni entre cultivares, ni entre condiciones de riego.

Sin embargo, al determinar el porcentaje de apertura estomática, una drástica disminución fue evidenciada en plantas de los 3 cultivares crecidas en sequía (Figura 8c). Las plantas control tenían 69,1% (Matrera), 72,1% (Monarca) y 69,7% (Vaquera) de estomas abiertos. Sin embargo, al analizar las plantas sometidas a sequía, estas mostraron un 35,4% (Matrera), 30,6% (Monarca) y 33,8 % (Vaquera) de apertura estomática (Figura 8c).

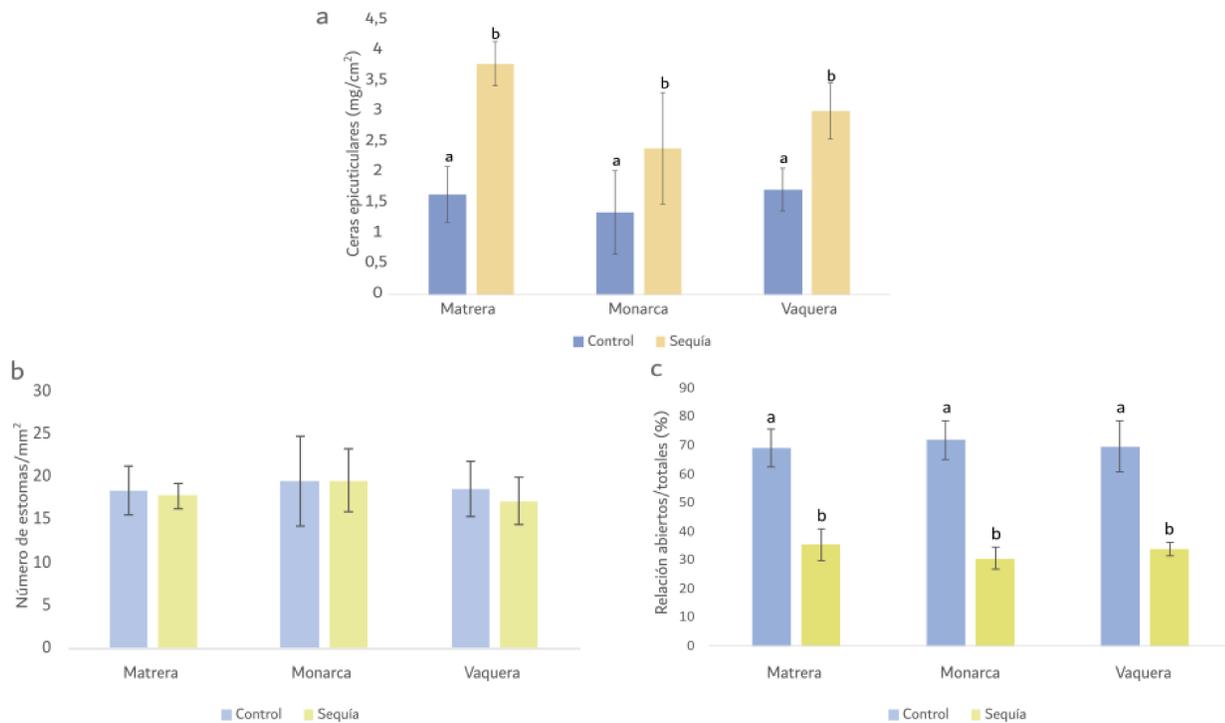


Figura 8. Estudios de respuestas fisiológicas de cultivares de alfalfa bajo déficit hídrico. a. Contenido de ceras epicuticulares de plantas crecidas bajo riego normal (azul) y sequía (beige). El número de estomas totales se observa en b. En c se muestran los resultados del porcentaje de apertura estomática. En ambos casos, en tonalidades de azul se observan las barras correspondientes a plantas crecidas bajo riesgo normal y en tonalidades de verde aquellas sometidas a estrés. Se utilizaron 5 réplicas biológicas para cada cultivar en cada condición de riego. Las barras de error indican la DE. Distintas letras por encima de las barras (a, b) indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey). Los gráficos sin letras por encima de las barras indican que los tratamientos no son estadísticamente diferentes.

1.3.5) Análisis molecular de la expresión de genes relacionados con vías hormonales

Con el objetivo de obtener una comprensión más detallada de los mecanismos involucrados en la respuesta al estrés hídrico, se determinó la expresión de genes involucrados en vías hormonales, ya que la regulación hormonal juega un papel crucial en la adaptación y supervivencia frente al estrés.

Primeramente, se midió la expresión del gen codificante para la aldehído oxidasa (AO) tanto en muestras de parte aérea (Figura 9a) como de raíz (Figura 9b). La AO es una enzima

clave en la biosíntesis del ABA (Seo & Koshiha, 2002), hormona esencial para la respuesta al estrés hídrico y la regulación del cierre estomático. En condiciones de estrés, en plantas del cultivar Matrera se observó un aumento del doble en la expresión del gen en parte aérea, mientras que para Vaquera aumentó un 70% su expresión (Figura 9a). Interesantemente, en plantas del cultivar Monarca no se encontró diferencia ($p > 0,05$) en la expresión del gen de la AO en condiciones de sequía (Figura 9a), lo que podría indicar que el nivel de la hormona es menor en este cultivar. En cuanto a la expresión en tejido radicular, los tres cultivares mostraron una drástica disminución de la expresión del gen de la AO, con un 98% de disminución de la expresión para Matrera, 85% para Monarca y 97% para Vaquera (Figura 9b).

También se evaluó la expresión del gen codificante para la ACC oxidasa (ACCO), enzima clave en la biosíntesis del etileno (ET), hormona vegetal que también juega un papel significativo en la respuesta al estrés hídrico. En las condiciones ensayadas, no se encontró diferencia en la expresión de este gen ni entre cultivares ni entre variaciones de riego al evaluar la parte aérea (Figura 9c). En relación a la expresión en raíces, el gen de la ACCO disminuyó en promedio un 68% de su expresión durante el estrés en el cultivar Matrera, y un 90% en Vaquera (Figura 9d). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la expresión del gen en el cultivar Monarca entre diferentes condiciones de riego (Figura 9d).

La fosfolipasa A2 (FA2) es una enzima que hidroliza los fosfolípidos de las membranas celulares, liberando ácidos grasos libres y lisofosfolípidos (Mariani & Fidelio, 2019). Entre los productos liberados, el ácido linolénico es particularmente importante debido a que es un precursor directo en la biosíntesis del ácido jasmónico (Wasternack & Hause, 2013). Al evaluar la expresión de su gen codificante en plantas de alfalfa, hemos encontrado que las plantas de los cultivares Matrera y Vaquera no modificaron su expresión ante condiciones de sequía (Figura 9e). Sin embargo, aquellas correspondientes al cultivar Monarca mostraron un comportamiento diferente, disminuyendo la expresión del gen de manera significativa ($p < 0,05$) en un 53% durante el estrés (Figura 9e). Al evaluar su expresión en raíz, los tres cultivares mostraron disminuciones significativas ($p < 0,05$). Se encontró una disminución promedio del 63% para plantas del cultivar Matrera, 75% para Monarca y 80% para Vaquera (Figura 9f).

La isocorismato sintasa (ICS) es una enzima clave en la biosíntesis del ácido salicílico (SA), una hormona vegetal esencial para la defensa contra patógenos y en la respuesta al estrés abiótico (Chen, 2024). Cataliza la conversión del corismato en isocorismato, un precursor directo

del ácido salicílico en las plantas (Dempsey et al., 2011). Este proceso es fundamental para la producción de SA en respuesta a diversas señales de estrés, especialmente durante la interacción con patógenos. El SA también interactúa con otras vías hormonales, como las del ácido jasmónico y el etileno, en la modulación de las respuestas de defensa y adaptación (Aziz & Kapoor, 2018). Al evaluar la expresión del gen codificante para la ICS en muestras de parte aérea, no se encontraron diferencias ni entre cultivares ni entre condiciones de riego (Figura 9g). En muestras de raíz, Monarca y Vaquera tampoco mostraron diferencias en su expresión ($p > 0,05$), mientras que Matrera evidenció un aumento significativo de la expresión del gen en sequía (Figura 9h).

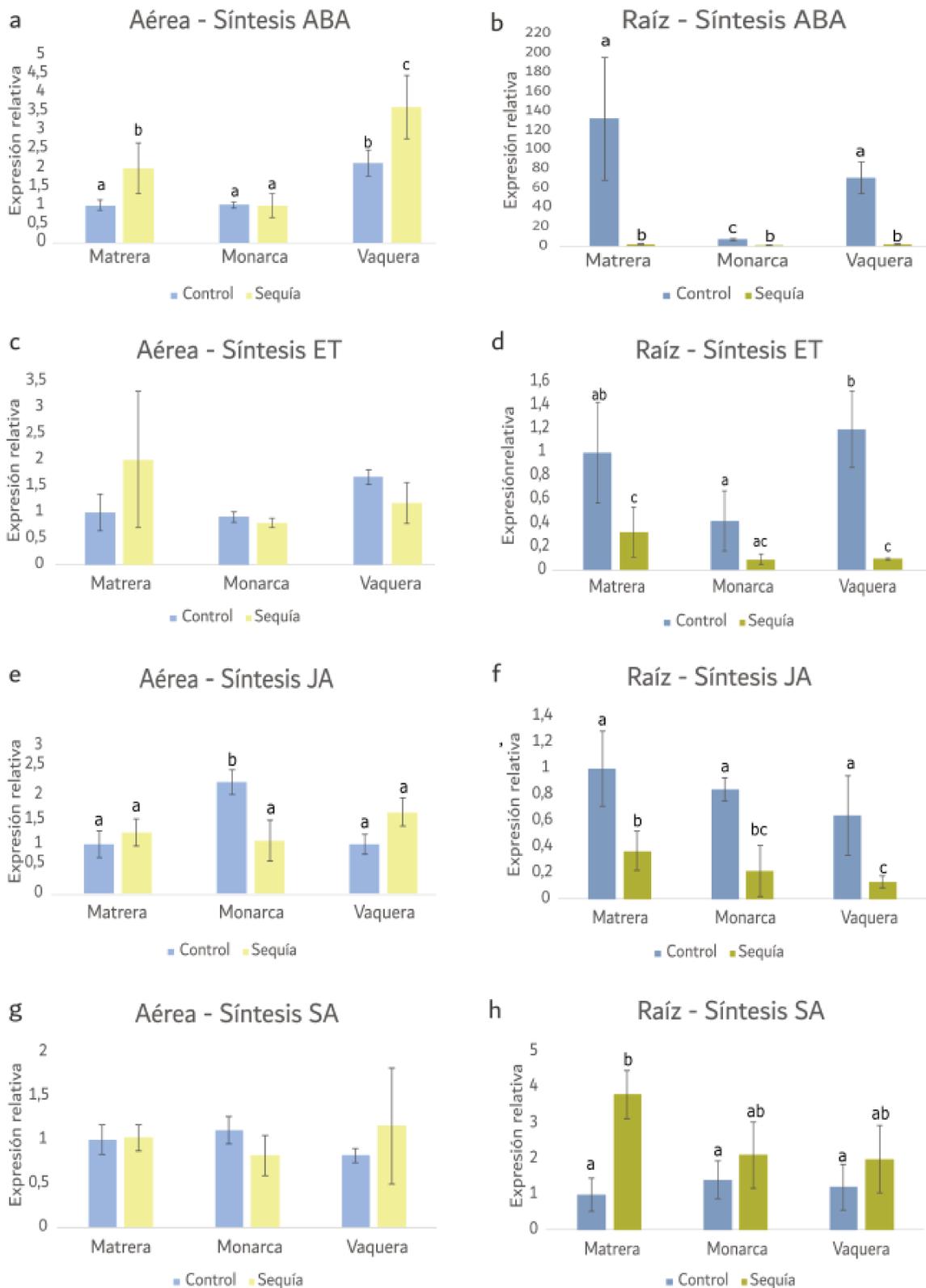


Figura 9. Análisis de expresión de genes involucrados en la síntesis de hormonas. Las plantas fueron crecidas durante 4 semanas en cámara de crecimiento luego de las cuales, la mitad de ellas se sometieron

a sequía durante 2 semanas. El resto se mantuvo con riego normal y se utilizaron como control. Al finalizar el ensayo, se tomaron muestras de hojas y raíces a partir de las cuales se obtuvo el ARN total y se midió la expresión de los genes mediante RT-qPCR. Los resultados fueron obtenidos relativizando la expresión a la correspondiente al cultivar Matrera en condiciones normales de riego (expresión = 1) utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Se midió la expresión de los genes codificantes para la aldehído oxidasa (a y b), la ACC oxidasa (c y d), la fosfolipasa A2 (e y f) y la isocorismato sintasa (g y h). En la columna de la izquierda se observan los resultados para las muestras de hojas y en la columna de la derecha para las muestras de raíz. Las barras de error indican la DE. Distintas letras por encima de las barras (a, b, c) indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey). Los gráficos sin letras por encima de las barras indican que los tratamientos no son estadísticamente diferentes.

1.4) Discusión y conclusiones

La escasez de agua se identifica como una de las principales causas de la reducción de los rendimientos de los cultivos y es la principal limitación que afecta la producción de forraje y la estabilidad del rendimiento en la mayoría de las regiones áridas y semiáridas (Shao et al., 2009). Frente a esta situación, las plantas utilizan distintos mecanismos de adaptación para minimizar los daños y aumentar la supervivencia, incluyendo la regulación osmótica, la producción de metabolitos protectores, proteínas y sistemas para la eliminación de especies reactivas de oxígeno (Ma et al., 2016).

En el presente capítulo se planteó como objetivo comparar la respuesta al estrés por déficit hídrico (aproximadamente 30% de capacidad de campo, CC) de tres cultivares de *Medicago sativa*. La alta tasa de supervivencia observada en todos los cultivares tras el estrés hídrico aplicado sugiere una capacidad intrínseca de resistencia a la sequía. Sin embargo, la disminución significativa en el índice de verdor (Figura 4b) refleja un impacto fisiológico severo, que podría indicar una reducción en la actividad fotosintética y el contenido de clorofilas. Este es un fenómeno común en plantas sometidas a estrés hídrico, ya que el déficit de agua afecta la integridad de los cloroplastos y reduce la síntesis de clorofilas (Ashraf & Harris, 2013; Flexas, 2004).

La disminución en el peso fresco y seco, tanto en la parte aérea como en las raíces, es indicativa de una reducción en el crecimiento debido al estrés. Las plantas del cultivar Monarca, en particular, mostraron una sensibilidad mayor, con una reducción significativa en la biomasa radicular (Figura 5), lo que podría explicarse por su menor capacidad para mantener el crecimiento radicular en condiciones de déficit hídrico (Figura 6). Esto es coincidente con estudios previos que muestran que un crecimiento radicular robusto es clave para la tolerancia a la sequía, ya que permite una mayor exploración y absorción de agua en el suelo (Comas et al., 2013; Lynch, 1995).

La fortificación de la capa externa de la peridermis observada en las raíces bajo sequía (Figura 7) es una respuesta adaptativa que refuerza la resistencia mecánica y reduce la pérdida de agua. Las paredes celulares suberizadas de las raíces forman importantes interfaces lipofílicas entre la planta y su entorno, contribuyendo significativamente a la regulación de la absorción de agua y el transporte de solutos dentro y fuera de ella (Schreiber, 2010). La disminución en el diámetro de las raíces, especialmente pronunciada en plantas del cultivar Monarca, sugiere una

reducción en el flujo de agua y nutrientes, lo que podría estar relacionado con su menor capacidad para tolerar la sequía. Este cambio morfológico podría estar asociado con el aumento de cantidad de ceras epicuticulares y la disminución en la apertura estomática, lo que refleja un mecanismo destinado a reducir la transpiración y mantener un balance hídrico positivo.

La mayor concentración de ceras epicuticulares es una respuesta normal a la sequía (Jenks et al., 1999; Xue et al., 2017), ya que este mecanismo ayuda a reducir la pérdida de agua formando una barrera hidrofóbica en la superficie de las hojas, disminuyendo la transpiración (Shepherd et al., 2006). Además de reducir la pérdida de agua, estas ceras pueden reflejar la radiación ultravioleta, protegiendo a las plantas del daño solar. Zhang y colaboradores (2005) informaron sobre la inducción de la producción de ceras en alfalfa y la adquisición de tolerancia a la sequía mediante la introducción del gen *WXP1* de la leguminosa modelo *Medicago truncatula*. Esto resultó en un aumento notable en la acumulación de cera en las hojas y una mayor tolerancia a la sequía en las plantas de alfalfa transgénicas. En este capítulo se observa que los tres cultivares tuvieron un comportamiento esperado, aumentando la producción de ceras epicuticulares y en proporciones similares (Figura 8).

En estudios de respuesta al estrés hídrico en plantas, la regulación hormonal juega un papel crucial en la adaptación y supervivencia (Peleg & Blumwald, 2011; Verma et al., 2016). Las hormonas vegetales, como el ácido abscísico y el etileno, son esenciales en la modulación de procesos fisiológicos que permiten a la planta enfrentar la escasez de agua (Wilkinson & Davies, 2010; Zhang et al., 2001). Al medir la expresión de genes involucrados en estas vías hormonales, es posible obtener una comprensión más detallada de los mecanismos subyacentes que contribuyen a la tolerancia al estrés hídrico en los distintos cultivares de alfalfa.

Uno de los genes seleccionados en esta tesis fue el codificante para la aldehído oxidasa (AO), enzima clave en la biosíntesis del ácido abscísico (ABA). Esta hormona vegetal es esencial para la respuesta al estrés hídrico y la regulación del cierre estomático. En la ruta de síntesis del ABA, la AO cataliza la oxidación del precursor aldehído abscísico (ABA-aldehído) a ácido abscísico (ABA) en la etapa final de su biosíntesis (Seo & Koshiba, 2002). Esta reacción es crucial, ya que el ABA es necesario para activar respuestas de defensa en la planta frente a condiciones de sequía, incluyendo la regulación de la apertura de los estomas y la modulación de la expresión génica relacionada con el estrés (Finkelstein & Rock, 2002). La falta de aumento en la expresión del gen de la aldehído oxidasa en plantas del cultivar Monarca (Figura 9a), podría

desencadenar una menor capacidad para sintetizar ABA en respuesta al estrés hídrico. El ABA es crucial para activar respuestas adaptativas, como el cierre estomático, que ayuda a reducir la pérdida de agua. Si bien la medición directa de la concentración de esta hormona sería la manera más adecuada para confirmar esta inferencia, este resultado podría ser un primer acercamiento para entender la mayor vulnerabilidad a los efectos adversos de la sequía. Esta falta de regulación genética puede ser un factor clave que podría contribuir a la sensibilidad al estrés hídrico por parte de este cultivar.

El etileno, una hormona vegetal conocida por su papel en la senescencia y la abscisión, también tiene efectos opuestos sobre el crecimiento de las plantas, pudiendo tanto inhibir como estimular el crecimiento, dependiendo del contexto y las condiciones ambientales (Pierik et al., 2006). El papel dual del etileno depende de factores como la concentración de la hormona, la etapa de desarrollo de la planta, y las interacciones con otras hormonas como el ABA y las auxinas. Estas interacciones hormonales y las condiciones ambientales determinan si el etileno actúa como un inhibidor o un promotor del crecimiento (Pierik et al., 2006). En algunos estudios, se ha observado que la producción y señalización de etileno pueden no ser significativamente alteradas durante el estrés hídrico, o que su papel puede estar más relacionado con la senescencia y la abscisión de hojas en etapas más avanzadas del estrés, en lugar de una respuesta temprana como la que induce el ABA. Sharp (2002) revisa el papel del etileno en el contexto de respuestas a la sequía y sugiere que el ABA es más crucial que el etileno para las respuestas inmediatas al estrés hídrico, como el cierre estomático y la reducción del crecimiento. La falta de cambio en la expresión de la ACC oxidasa en los cultivares de alfalfa sugiere que el etileno podría no estar jugando un rol principal en la respuesta al estrés hídrico en estas condiciones específicas.

El ácido jasmónico (JA) es conocido principalmente por su papel en la defensa contra herbívoros y patógenos, pero también participa en la modulación de respuestas a diversos estreses abióticos como la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas, y la radiación ultravioleta (Dar et al., 2015; Kazan, 2015; Ruan et al., 2019). La aplicación exógena de JAs probada hasta ahora en diferentes plantas bajo condiciones de estrés abiótico, en particular salinidad, sequía, metales pesados y temperatura (baja/alta), ha demostrado ser eficaz para mejorar la tolerancia de las plantas al estrés (Yan et al., 2013; Yoon et al., 2009). Sin embargo, su grado de eficacia depende de la especie de planta analizada o de la concentración de JA (Wasternack & Hause, 2013). En relación al análisis en los cultivares de alfalfa, la expresión de

la fosfolipasa A2 (FA2) y su relación con el JA parecen ser relevantes para la respuesta en Monarca, donde una menor expresión podría estar asociada con una reducción en la señalización de JA y, por ende, una menor activación de mecanismos de defensa.

El ácido salicílico (SA) es un compuesto fenólico de origen natural que desempeña un rol clave en la regulación del crecimiento, desarrollo, maduración y respuestas de defensa de las plantas (Hara et al., 2012; Rivas-San Vicente & Plasencia, 2011). Además del ABA, el SA está involucrado en la regulación de las respuestas por sequía. Se ha observado que los niveles endógenos de SA se incrementan hasta cinco veces en *Phillyrea angustifolia* sometida a déficit hídrico (Munne-Bosch & Peñuelas, 2003). Bandurska y Stroiński (2005) también han reportado un aumento de aproximadamente el doble del contenido de SA en raíces de cebada sometidas a estrés hídrico. La inducción de la acumulación de SA puede desempeñar un papel en un mecanismo de protección durante el estrés hídrico (Miura & Tada, 2014). Sin embargo, el efecto del SA en la tolerancia a la sequía sigue sin quedar del todo claro, ya que algunos investigadores han reportado una mejora de la tolerancia a la sequía mediante la aplicación de SA (Gao et al., 2023), mientras que otros han informado una reducción de la misma (Borsani et al., 2001). En este capítulo, la activación de la isocorismato sintasa (ICS) en plantas del cultivar Matrera sugeriría una respuesta única a través de la vía del ácido salicílico, lo que podría estar relacionado con un mayor nivel de resistencia al estrés. Sin embargo, dado lo dicho anteriormente, más análisis son necesarios para comprobar esta hipótesis.

Ante un escenario actual de cambio climático y la creciente demanda de agua para la agricultura, la selección de plantas resistentes al estrés por déficit hídrico y, en particular, la identificación de los mecanismos genéticos y fisiológicos detrás de su tolerancia es fundamental para mejorar la resiliencia del cultivo, asegurar la sostenibilidad agrícola y enfrentar los desafíos del cambio climático de manera eficaz (Erice et al., 2010; Sambatti & Caylor, 2007). La mejora de la resistencia de las plantas a la sequía se vuelve urgente y debería integrar enfoques biotecnológicos y de mejoramiento convencional. En las últimas dos décadas, los efectos del estrés por sequía sobre el rendimiento, crecimiento y calidad de los cultivos se han convertido cada vez más en un importante problema ambiental (Wu et al., 2017) y en un factor limitante principal en la producción de alfalfa (Ezura et al., 2015). Por lo tanto, estudiar el comportamiento de distintas variedades y los potenciales mecanismos involucrados en la respuesta a este estrés son de suma importancia para dirigir futuras estrategias de mejoramiento.

Como conclusiones, podemos decir que:

- Matrera y Vaquera demostraron ser los cultivares con la mayor capacidad para mantener la biomasa bajo estrés, mientras que Monarca mostró la mayor susceptibilidad, especialmente en términos de biomasa radicular y reducción en el diámetro de la raíz.
- Las diferencias en la expresión de genes relacionados con la síntesis de ABA, JA y SA entre los cultivares reflejan variaciones en la adaptación hormonal al estrés hídrico. El cultivar Monarca, en particular, parecería tener una respuesta hormonal menos efectiva, lo que podría contribuir a su mayor sensibilidad.
- La reducción en la apertura estomática y la mayor producción de ceras epicuticulares sugieren que todos los cultivares activan mecanismos para evitar la transpiración, aunque con diferentes niveles de eficacia.

Estos hallazgos subrayan la importancia de seleccionar cultivares con una regulación hormonal robusta y una arquitectura radicular adecuada para mejorar la resistencia a la sequía en programas de mejoramiento de alfalfa.

Capítulo II: Análisis integral de la respuesta de cultivares de alfalfa al anegamiento

2.1) Introducción

El anegamiento es un estrés de gran importancia a nivel global, especialmente cuando afecta regiones agrícolas. Las inundaciones tienen efectos profundos en las propiedades químicas del suelo, incluida la dinámica de nutrientes, el contenido de materia orgánica, la fertilidad del suelo y el crecimiento y desarrollo de las plantas (Rupngam & Messiga, 2024), generando grandes pérdidas económicas y productivas (FAO, 2021). Las plantas bajo condiciones de anegamiento pueden sufrir hipoxia o anoxia en las raíces, lo que limita su capacidad para absorber nutrientes del suelo (Colmer & Voeselek, 2009). El anegamiento genera en las plantas un aumento en los niveles de estrés oxidativo, toxicidad por metales pesados y deficiencia energética, lo que resulta en la inhibición del crecimiento y trastornos metabólicos (Zhengyuan et al., 2023), llevando en muchos casos a la muerte del tejido afectado o la planta completa. Además, afecta significativamente la productividad de las plantas, especialmente en zonas donde las precipitaciones intensas, o un mal drenaje del suelo, provocan encharcamiento prolongado.

El estrés hídrico por exceso puede inducir también la producción de etileno en las plantas, que, en ciertas cantidades, lleva a la inhibición del crecimiento de las raíces y a la elongación del tallo, así como a la senescencia prematura de las hojas (Voeselek & Sasidharan, 2013).

El anegamiento no solo afecta el crecimiento y desarrollo de los cultivos, sino que también aumenta su susceptibilidad a diversas enfermedades, particularmente en especies sensibles como la alfalfa. Bajo condiciones de anegamiento, la hipoxia inducida en las raíces provoca una disminución en la eficiencia del sistema inmune de la planta, lo que la hace más vulnerable a infecciones por patógenos de suelo, como los hongos y bacterias que proliferan en condiciones de humedad elevada (Burgess et al., 1999; Moslemi et al., 2018). Esta vulnerabilidad se debe, en parte, a la acumulación de etileno y otros compuestos que, si bien actúan como señales de respuesta al estrés, también pueden alterar el equilibrio hormonal y comprometer las defensas naturales de la planta (Voeselek & Bailey-Serres, 2015).

El estrés causado por la hipoxia y la anoxia debilita las raíces y facilita la entrada de patógenos como *Phytophthora medicaginis* y *Fusarium* spp., los cuales son comúnmente reportados en suelos saturados de agua (Abbas et al., 2022; Zook et al., 1986). Estas infecciones

llevan a la podredumbre de las raíces, afectando seriamente la capacidad de la planta para absorber agua y nutrientes, lo que, en última instancia, reduce la producción forrajera y la longevidad del cultivo (Giles et al., 2022; Wang et al., 2024; Watkins et al., 1996). Además, el anegamiento prolongado puede inducir la formación de tejido necrosado en las raíces, lo que proporciona un entorno favorable para el establecimiento de patógenos oportunistas (Steffens et al., 2013). Este fenómeno se debe en gran parte a que su sistema radicular es sensible a la falta de oxígeno (Striker & Colmer, 2017). Este conjunto de factores fisiológicos y ambientales crea un escenario en el que las plantas no solo están luchando contra el estrés abiótico, sino también contra amenazas bióticas, afectando tanto la calidad del forraje como su persistencia.

Además, ante un exceso hídrico, también se ven afectadas otras variables bioquímicas y fisiológicas, disminuyendo, por ejemplo, la síntesis de clorofila y la consecuente absorción de energía lumínica, lo que resulta en una notable reducción de la tasa fotosintética (Grzesiak *et al.*, 2016).

En este contexto, las plantas activan varios mecanismos fisiológicos y moleculares para adaptarse al estrés por anegamiento, que incluyen cambios en la arquitectura de las raíces, alteraciones en el metabolismo energético y la activación de vías hormonales como las del etileno y el ácido abscísico. Estas adaptaciones permiten a las plantas tolerar períodos prolongados de hipoxia (Voesenek & Bailey-Serres, 2015).

Como ya se ha expuesto anteriormente, la alfalfa es una de las leguminosas forrajeras más importantes a nivel global debido a su alto valor nutricional y su uso como alimento para el ganado. Sin embargo, su sensibilidad al anegamiento limita su productividad en regiones propensas a condiciones de exceso hídrico. Su crecimiento es deficiente en suelos con mal drenaje y propensos al encharcamiento (Striker & Colmer, 2017). Aun cuando los episodios de anegamiento sean breves, las plantas de alfalfa sufren daños importantes y en gran medida terminan muriendo (Evans, 1998). Esto implica que grandes superficies de alfalfa pueden perderse incluso tras un período de inundación relativamente corto. Esta susceptibilidad es la principal limitación para la elección del área de cultivo y para alcanzar una producción rentable.

Comparado con otros estreses abióticos, entre ellos sequía y salinidad, existen escasas investigaciones enfocadas en el estudio, caracterización e identificación de cultivos con tolerancia a anegamiento. Aún más, el estudio sobre el efecto de este estrés en raíces de alfalfa es notablemente menor, principalmente debido a la complejidad técnica de estudiar este tipo de

estrés y a la diversidad de respuestas que las plantas presentan según la especie y el entorno. Las raíces, al estar bajo tierra, presentan desafíos para la observación directa y la medición en tiempo real de sus respuestas al anegamiento. Además, los estudios sobre anegamiento suelen centrarse en los aspectos más visibles del estrés, como el crecimiento de la planta y los efectos foliares, mientras que los procesos subterráneos conllevan el desafío adicional de su monitoreo (Colmer & Voesenek, 2009).

Además, el monitoreo y control de las condiciones de anegamiento en sistemas controlados (invernaderos, cámaras de crecimiento vegetal) puede ser difícil y requiere de un seguimiento continuo. Sumado a esto, el diseño experimental puede ser complicado debido tanto a variables como la intensidad y la duración del anegamiento, como a las condiciones del suelo (Nishiuchi et al., 2012).

La escasez de estudios sobre la respuesta de la alfalfa al anegamiento resalta la importancia de generar conocimiento sobre este tema, especialmente en un contexto donde el cambio climático aumenta la frecuencia e intensidad de las precipitaciones y los eventos de inundación (Westra et al., 2013). Debido a esto y al impacto directo que tiene este estrés sobre la producción de esta forrajera, se inició la caracterización de la respuesta de tres cultivares utilizados en nuestra región bajo condiciones de crecimiento bajo exceso de agua.

Luego de 14 días de anegamiento, aunque el índice verde se redujo, los tres cultivares estudiados mostraron alta tasa de supervivencia. Al observar variables agronómicas, el cultivar Vaquera fue el menos afectado, mientras que Matrera fue el más impactado, con un desarrollo radicular similarmente reducido. A su vez, Vaquera fue el único cultivar que formó aerénquima bajo anegamiento, lo que podría explicar su mayor tolerancia. A nivel hormonal, se observó que las muestras de tejido aéreo del cultivar Vaquera no mostraron diferencias significativas entre condiciones de riego normal y anegamiento, sugiriendo una menor alteración fisiológica ante el estrés.

En conclusión, este enfoque multidisciplinario permitirá avanzar en los estudios tendientes a identificar mecanismos involucrados en la tolerancia diferencial entre cultivares y proporcionará información valiosa para mejorar la resiliencia de la alfalfa en regiones propensas a eventos de exceso hídrico.

2.2) Materiales y Métodos

2.2.1) Material vegetal y aplicación del estrés

Un total de 24 plantas de NK-Vaquera 9, 24 NK-Matrera 8 y 24 Monarca SP INTA 8 fueron cultivadas en cámara de cultivo vegetal con condiciones de temperatura y luz controladas y riego normal con agua durante 4 semanas. Luego de ello, la mitad de las plantas fueron inundadas mediante llenado de la bandeja que contenía las macetas hasta la máxima altura, de manera tal que todo el sistema radicular quedó cubierto de agua (Figura Suplementaria 1). En el momento de llevar a cabo el tratamiento de estrés, las plantas se encontraban en estadio 1 (vegetativo temprano; Rodríguez & Spada, 2007). El resto de las plantas fueron mantenidas bajo riego normal y utilizadas como control.

Las plantas fueron cultivadas en macetas de 0,2 litros con sustrato comercial GrowMix® Multipro (Terrafertil) con temperatura promedio de 25 °C y ciclo de 16:8 horas de luz/oscuridad. Este ensayo fue repetido 3 veces y los resultados muestran el promedio obtenido de ellos.

2.2.2) Determinación de variables agronómicas

Luego de 14 días de anegamiento, se determinó visualmente el porcentaje de sobrevivencia de los diferentes cultivares, considerando que una planta estaba muerta cuando el daño en el tallo y corona demostraba la imposibilidad de reversión al estado vivo. Además, se midió el índice de verdor de todas las plantas vivas utilizando el medidor de clorofilas portátil SPAD-502 (Konica Minolta).

Seguidamente, las plantas sobrevivientes fueron retiradas de su maceta y lavadas cuidadosamente para no romper el sistema radicular. Se colocaron en una batea con agua, fueron fotografiadas y digitalizadas para posteriores análisis estructurales mediante el uso de un sistema informático (ver 2.2.3). Posteriormente, se determinó el peso fresco (PF) tanto de la parte aérea como de las raíces de cada una de las plantas por separado. Cada muestra se introdujo luego en sobres de papel individuales y se llevó a estufa a 60 °C hasta determinación de peso constante. En ese momento, se procedió a realizar las mediciones para la obtención del peso seco (PS).

2.2.3) Fenotipado de raíces

Las fotografías de raíces obtenidas en el punto 2.2.2 fueron digitalizadas y utilizadas para evaluar el fenotipo de estas. Para ello, se empleó el programa de procesado y análisis de imágenes ImageJ Fiji (<https://fiji.sc/>). De esta manera se determinó el área total de las raíces y la longitud de la raíz principal.

2.2.4) Cortes histológicos

Para evaluar la morfología interna de las raíces, se tomaron muestras de estas correspondientes a los tres cultivares bajo estudio crecidos tanto en condiciones normales de riego como en anegamiento (ver 2.2.1) . Se seleccionó la zona de la raíz 3 cm por debajo de la interfase tallo-raíz y se escindieron fragmentos de 1 cm de longitud utilizando un bisturí. Se analizaron cinco réplicas biológicas de cada cultivar y tratamiento.

Los fragmentos de raíces fueron fijados en FAA (ver material suplementario) por 48 horas y conservados en etanol 70% (v/v). Los fragmentos de muestras fueron procesados según el punto 1.2.4. Brevemente, las muestras conservadas en etanol 70% fueron luego deshidratadas en una serie creciente de etanol, clarificadas con xilol (Cicarelli), e incluidas en parafina (D'Ambrogio de Argüeso, 1986; Ruzin 1999). Seguidamente, se procedió a la preparación de los bloques en moldes de inclusión de 15x15x5 mm, elaborados en polipropileno transparente. Cada bloque de raíz fue debidamente rotulado con la fecha, el tipo de muestra y la hora de producción. Una vez enfriado a temperatura ambiente, el bloque fue colocado en el brazo de un micrótopo rotatorio (Leica RM2125 RTS). A continuación, se desgastó la superficie del bloque de parafina hasta llegar al tejido, asegurando que se abarcara toda el área deseada para la sección. Para garantizar una mejor adherencia de los cortes a los portaobjetos, se aplicó una sustancia adherente, en este caso, albúmina de Mayer.

Una vez obtenidos los cortes en forma de cintas, estas fueron cuidadosamente colocadas en el portaobjeto cubierto con albúmina de Mayer y agua a temperatura ambiente. Luego, se depositaron durante 3 minutos en una placa calefactora a 45 °C, con el objetivo de eliminar pliegues. Finalmente, los portaobjetos fueron rotulados, colocados en una gradilla de vidrio y luego trasladados a una estufa a 37 °C durante 72 horas para su conservación.

Por último, las secciones fueron teñidas con los colorantes Safranina (Sigma-Aldrich) y Astra Blue (Biopack) y luego montadas en bálsamo de Canadá sintético (Johansen, 1940; Luque et al., 1996). Las fotografías de los preparados de interés fueron tomadas con una cámara digital Canon EOS REBEL T2i, adaptada a un microscopio Leica DM1000. Para el análisis de resultados y la preparación de las figuras se utilizaron los softwares ImageJ (<https://fiji.sc/>) e Inkscape (<https://inkscape.org>).

2.2.5) Cuantificación de ceras

Las ceras epicuticulares totales, se extrajeron utilizando cloroformo, siguiendo el protocolo descrito en el punto 1.2.5 (ver también Jaime et al., 2020). Brevemente, se tomaron folíolos de cinco plantas crecidas en condiciones control y cinco plantas anegadas de cada cultivar, los cuales fueron introducidos separadamente por 20 segundos en un recipiente de peso conocido, conteniendo 10 ml de cloroformo (Cicarelli). Se utilizó un recipiente diferente para cada cultivar y para cada condición. Los seis recipientes con la solución obtenida (cera + cloroformo) se colocaron en una campana de extracción de gases hasta evaporación total del cloroformo y determinación por peso constante del recipiente. El peso de las ceras se determinó por la diferencia entre el peso del recipiente después de la evaporación del solvente y el peso del recipiente vacío. Las hojas, luego de ser sumergidas en cloroformo, fueron colocadas cuidadosamente en un papel blanco, fueron digitalizadas, y las imágenes, usadas para la obtención del área foliar total utilizando el software Fiji (ImageJ). La cuantificación de cera fue expresada como cantidad de cera por unidad de área foliar (mg cm^{-2}).

2.2.6) Conteo de estomas

El conteo de estomas se realizó siguiendo el método descrito en el punto 1.2.6 y en Gudesblat et al. (2007) con modificaciones. Resumidamente, se crecieron las plantas en cámara de cultivo para plantas durante 4 semanas hasta estadio vegetativo temprano, luego la mitad de ellas se sometieron a anegamiento como se especificó anteriormente (ver 2.2.1). Una vez finalizado el ensayo, se eligieron al azar cinco folíolos de cinco plantas de cada cultivar y por

cada condición de riego, resultando en un total de 50 folíolos por cada cultivar (25 folíolos control y 25 folíolos de plantas anegadas). Los mismos se fijaron en un portaobjetos de vidrio utilizando cinta adhesiva de doble cara transparente (3M). Se utilizó una solución 1:1 de hipoclorito de sodio y un bisturí para eliminar suavemente el mesófilo, asegurando que la epidermis abaxial permaneciera adherida a la cinta adhesiva. Seguidamente, las muestras se lavaron con agua y se examinaron bajo un microscopio Leica M205 FAC con un aumento total de 400X. Al localizar los estomas y células epidérmicas, se tomaron fotografías con una cámara digital Canon EOS REBEL T2. Se seleccionaron cuatro zonas al azar para cada impresión y se realizaron conteos de estomas cerrados y abiertos.

2.2.7) Estudio de expresión génica

Como se explicó anteriormente en el punto 1.2.7, se realizó la extracción de ARN total de tres plantas de cada uno de los tres cultivares, y crecidas tanto bajo riego normal como en anegamiento. Se realizaron extracciones individuales, por un lado para la parte aérea y por otro, para las raíces de cada planta. Aproximadamente 100 mg de tejido de cada muestra fueron colocados en un tubo plástico tipo Eppendorf de 1,5 ml, seguidamente se pulverizó el material utilizando nitrógeno líquido hasta fino polvo. Luego, se adicionó 1 ml de trizol (TRIzol, Thermo Scientific). El tejido se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C y el homogenado se transfirió a un nuevo tubo. Se agregaron 500 µl de cloroformo (Cicarelli) por cada ml de TRIzol usado, se invirtió vigorosamente y se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos a 4 °C. La fase superior, conteniendo el ARN, fue transferida a un tubo nuevo para luego adicionar un volumen de isopropanol (Cicarelli). Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C, se removió el sobrenadante y se adicionó 1 ml de etanol al 75% (v/v) frío. Se mezcló y centrifugó a 7.500 g durante 5 minutos a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante y se repitió el lavado con etanol y posterior centrifugación. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 5-10 minutos. Se resuspendió el pellet de ARN total en 50 µl de agua libre de DNAsa/RNAsa. El ARN resultante fue cuantificado y analizada su integridad mediante espectrometría UV (NanoDrop, Thermo Scientific). El ARN total fue tratado con DNAsa (DNase I, NEB) según las indicaciones del fabricante. El ARN resultante se

retrotranscribió a ADNc utilizando la enzima transcriptasa reversa [Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV), Trans], siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para la cuantificación relativa de los niveles de expresión de los genes analizados se utilizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando un termociclador AriaMx Real Time PCR System (Agilent Technologies). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μ l, utilizando una Master Mix Maxima SYBR Green/ROX qPCR (Thermo Fisher Scientific), 200 ng de ADNc como molde y oligonucleótidos específicos para los genes codificantes para las enzimas aldehído oxidasa (AO), ACC oxidasa (ACCO), fosfolipasa A2 γ (FA2) e isocorismato sintasa (ICS). Estas enzimas cumplen roles claves en la síntesis de ácido abscísico (ABA), etileno (ET), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA), respectivamente. Para los controles basales de expresión se utilizó el gen UBL-2a (Ubiquitin protein ligase 2a; Castonguay et al., 2015). La secuencia de los oligonucleótidos puede encontrarse en el material suplementario. Para determinar cuantitativamente los niveles de transcripción de los genes, se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ según lo descrito por Livak y Schmittgen (2001).

2.2.8) Cuantificación de hormonas

Para determinar el perfil hormonal de los cultivares definidos como más sensible y más tolerante en función de los resultados previos, se procedió a tomar muestras de tres plantas de cada uno de ellos, crecidas tanto en condición de riego normal como luego de 14 días de anegamiento. Se evaluaron por un lado la parte aérea y por otro la radicular. Cada cultivar, condición y tejido fue evaluado por triplicado. Las muestras fueron trituradas hasta observar un polvo fino mediante mortero y nitrógeno líquido obteniendo aproximadamente 100 mg de tejido. Seguido, este fue liofilizado y enviado al servicio de determinación de fitohormonas de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC, Córdoba, Argentina). Se realizó la identificación y cuantificación del analito en estudio por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem de última generación (LC-MS/MS). Se determinó la concentración de ácido indol-3-acético (IAA, *indole-3-acetic acid*), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA), ácido giberélico (GA3, *gibberellic acid*), ácido jasmónico (JA), y kinetina (KIN, *kinetin*). Los resultados fueron expresados en nanogramos de hormona por gramos de peso seco (ng/g PS).

2.2.9) Análisis estadístico

Para probar el supuesto de normalidad se utilizó la prueba de Shapiro–Wilks (Field, 2013). La prueba de Levene se utilizó para probar el supuesto de homogeneidad de varianza (Field, 2013). Después de verificar que los datos cumplieran con los supuestos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de una prueba de Tukey para identificar diferencias entre los tratamientos. Todo el análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico R (R Core Team, 2021).

2.3) Resultados

2.3.1) Supervivencia y coloración de plantas sometidas a inundación

Tres cultivares de alfalfa fueron sometidos a anegamiento durante 14 días. La Figura 10 muestra una imagen representativa de las plantas de los 3 cultivares crecidos bajo riego normal y bajo estrés. Al evaluar los porcentajes de supervivencia, se observaron tasas de sobrevivencia altas, por lo que el estrés no fue letal para ninguno de los cultivares (Figura 11a). Los cultivares Matrera y Monarca mostraron un 92% de supervivencia mientras que el 100% de las plantas de Vaquera sobrevivieron luego de 14 días de inundación (Figura 11a).

Por otro lado, al evaluar el índice de verdor, se encontró una disminución significativa ($p < 0,05$) en los valores para los tres cultivares crecidos en estrés comparado con las plantas crecidas en condiciones normales. Específicamente, en condiciones de riego control, Matrera mostró un promedio de 50,7 unidades arbitrarias, Monarca 49,8 unidades arbitrarias y Vaquera 49,2 unidades arbitrarias (Figura 11b). Al medir el contenido de clorofilas durante anegamiento, Matrera presentó un promedio de 16,7 unidades arbitrarias, Monarca 20,9 unidades arbitrarias y Vaquera 21,9 unidades arbitrarias (Figura 11b). No hubo diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores de los cultivares bajo la misma condición de riego.

En cuanto al fenotipo de las plantas al finalizar el ensayo, los 3 cultivares mostraron una variación en el color de sus hojas, con una afectación mucho mayor para el cultivar Matrera, mientras que Vaquera mostraba un mejor porte de sus plantas luego del estrés (Figura 10).

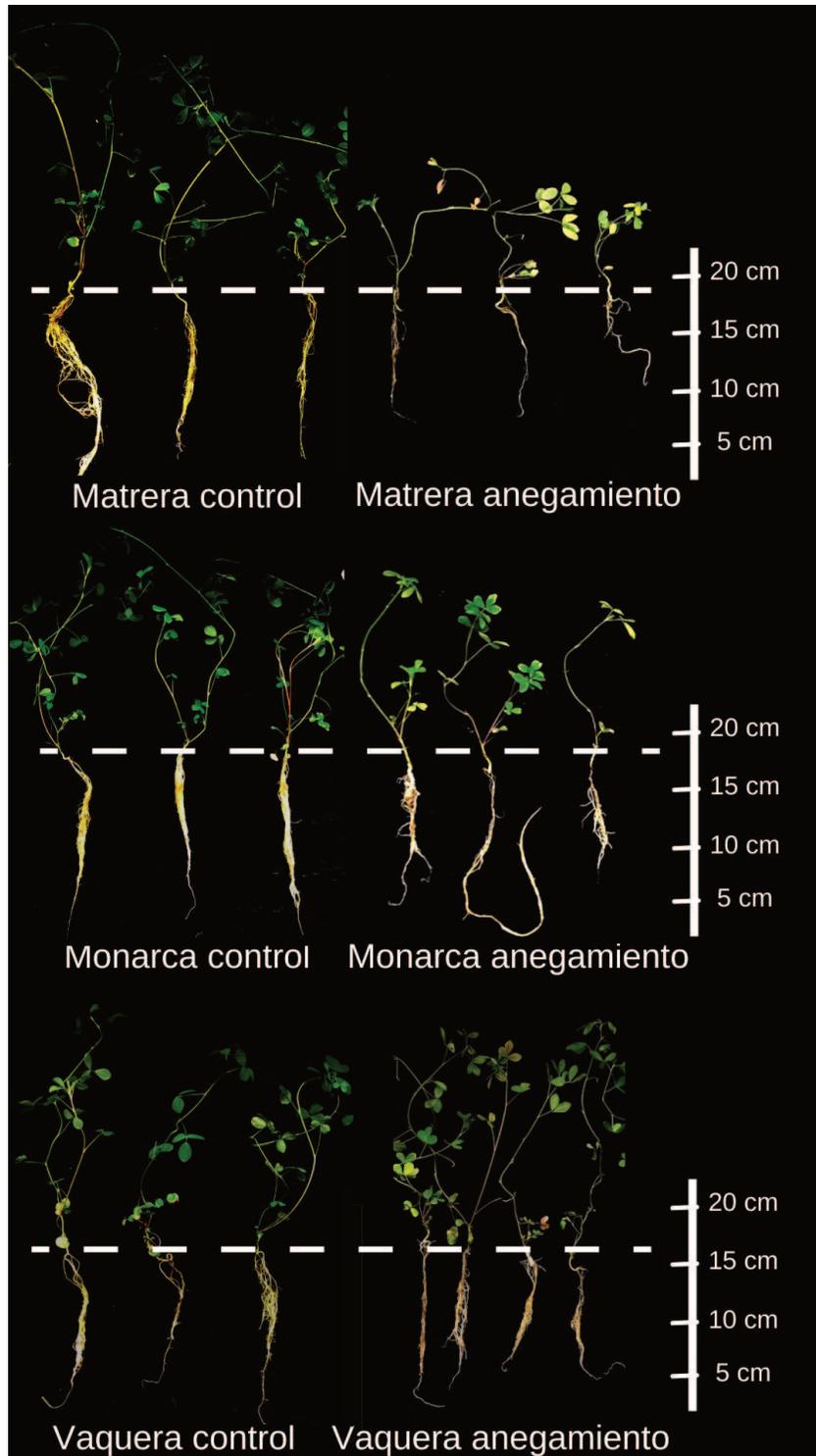


Figura 10. Fotografía de plantas de alfalfa crecidas bajo riego normal (control, izquierda) y sometidas a anegamiento (derecha). El ensayo se realizó con 24 plantas de cada cultivar (Matrera, Monarca y Vaquera) Estas fueron cultivadas en cámara de crecimiento durante 4 semanas luego de las cuales, la mitad de ellas fueron sometidas a 14 días de inundación. Las plantas restantes fueron regadas de forma

normal y se utilizaron como control. El ensayo fue repetido por triplicado y las fotografías son una muestra representativa de ellos.

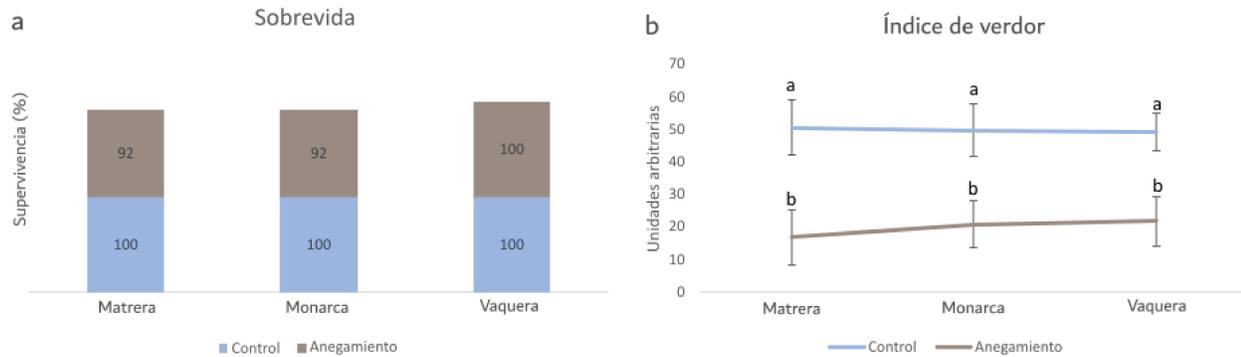


Figura 11. Caracterización de cultivares de alfalfa sometidos a 14 días de anegamiento. a. Porcentaje de supervivencia, evaluado al finalizar el ensayo, de cada uno de los cultivares bajo riego control (azul) y anegamiento (gris). b. Índice de verdor obtenido utilizando el medidor de clorofila SPAD. Las plantas fueron crecidas durante 4 semanas en cámara de cultivo y se encontraban en estado vegetativo al momento de aplicar el estrés. El mismo fue aplicado cubriendo la totalidad de las macetas con agua, de manera tal que todo el sistema radicular quedó sumergido. Se utilizaron 12 réplicas biológicas para cada condición y cultivar. El ensayo fue repetido por triplicado, obteniéndose resultados similares. Las barras de error indican la desviación estándar (DE). Letras diferentes sobre las gráficas (a, b) indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey).

2.3.2) Determinación de variables biométricas

Luego de 14 días de anegamiento, las plantas estresadas junto con aquellas crecidas en condiciones normales de riego, fueron retiradas de sus bandejas, lavadas cuidadosamente y analizadas para la evaluación de parámetros agronómicos.

Primeramente, se separó la parte aérea de la raíz de cada planta y se determinó el peso fresco (PF) de cada sección, a los que se denominó PFA y PFR, respectivamente. Los resultados se observan en la Figura 12. Respecto a las plantas crecidas bajo riego control, Matrera mostró un promedio de 1,02 g de PFA, mientras que las plantas del cultivar Monarca evidenciaron un promedio de 0,88 g y Vaquera 0,93 g (Figura 12a). No se encontró diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores de PFA entre cultivares en condiciones normales de riego. Sin embargo, al

evaluar el PFA de aquellas plantas sometidas a anegamiento, diferentes comportamientos han sido encontrados entre genotipos. Por un lado, Matrera mostró un PFA de 0,30 g luego del estrés y Monarca un PFA de 0,37 g. Ambos cultivares mostraron una disminución significativa ($p < 0,05$) de los valores al comparar con aquellos crecidos en condiciones normales (Figura 12a). Contrariamente a lo observado para estos cultivares, el PFA promedio para Vaquera fue de 0,82 g luego del estrés, no encontrándose diferencia significativa ($p > 0,05$) al compararlo con el valor del mismo genotipo crecido bajo riego control (Figura 12a).

En cuanto a los estudios de pesos de raíces, no se encontró diferencia significativa ($p > 0,05$) entre las plantas de los tres cultivares crecidos en condiciones de riego normal. Las del genotipo Matrera, tuvieron un PFR promedio de 0,20 g, las correspondientes a Monarca 0,21 g y a Vaquera 0,16 g (Figura 12b). Sin embargo, al evaluar aquellas sometidas a anegamiento, se encontró que Matrera tenía un PFR de 0,05 g, una disminución significativamente menor ($p < 0,05$) a aquellas del mismo genotipo crecidas en condiciones normales de riego (Figura 12b). Sin embargo, en Monarca se observó un PFR promedio de 0,12 g, el cual no fue significativamente diferente ($p > 0,05$) al mismo genotipo crecido en condiciones control (Figura 12b). Finalmente, el cultivar Vaquera evidenció un PFR promedio de 0,16 g luego del estrés, el cual tampoco fue significativamente diferente ($p > 0,05$) al promedio obtenido por su control (Figura 12b).

Luego del secado en estufa hasta peso constante, se determinó el peso seco (PS) tanto de la parte aérea (PSA) como de la raíz (PSR). En condiciones controles, las muestras aéreas de los cultivares Matrera, Monarca y Vaquera no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre sus promedios, con valores de PSA de 0,22 g para Matrera, 0,25 g para Monarca y 0,20 g para Vaquera (Figura 12c). Por otro lado, sí se obtuvieron valores significativamente menores ($p < 0,05$) al evaluar el PSA de Matrera y Monarca en condiciones de estrés, con un promedio de 0,08 g y 0,07 g, respectivamente (Figura 12c). Interesantemente, el PSA del cultivar Vaquera crecido en condiciones de estrés fue de 0,21 g, no mostrando diferencia significativa ($p > 0,05$) con aquel obtenido en condiciones normales de riego (Figura 12c).

Finalmente y respecto al PSR, tampoco se observó diferencia estadística ($p > 0,05$) entre los cultivares crecidos en condiciones normales, con valores de PSR de 0,033 g para Matrera, 0,039 g para Monarca y 0,026 para Vaquera (Figura 12d). Sin embargo, sí hubo una marcada disminución del PSR de Matrera crecida durante estrés, con un valor promedio de 0,010 g, el cual fue significativamente menor ($p < 0,05$) a su control (Figura 12d). Por el contrario, los

genotipos Monarca y Vaquera no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) con sus respectivos controles, con un PSR promedio luego del estrés de 0,02 g y 0,03 g, respectivamente (Figura 12d).

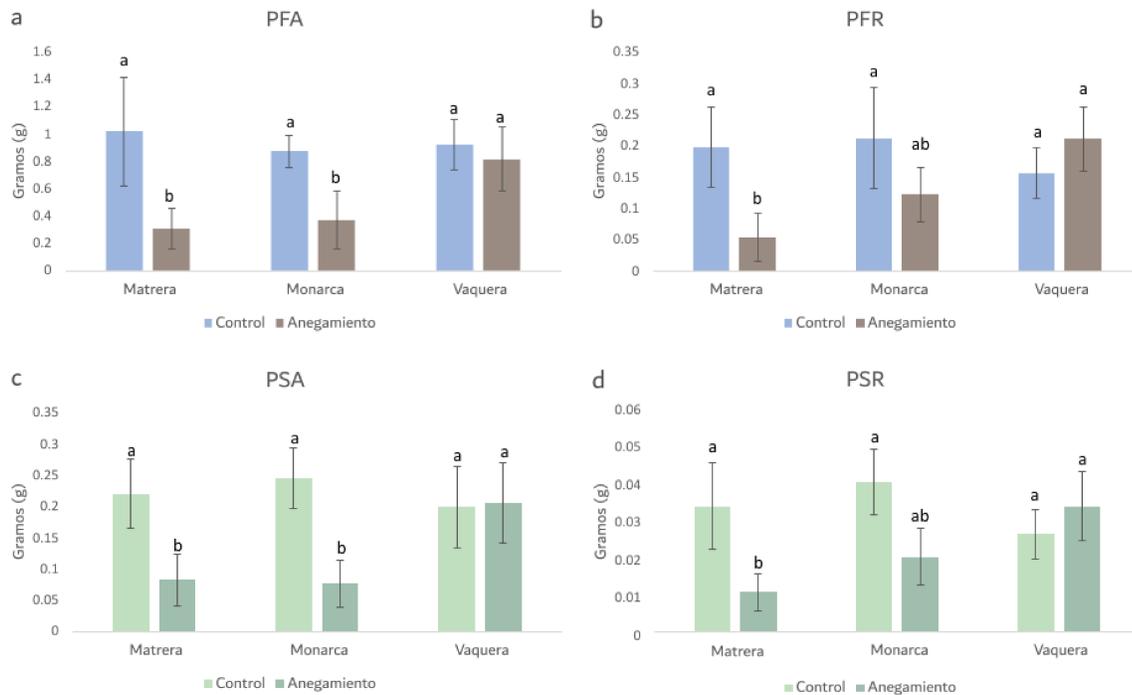


Figura 12. Resultados biométricos obtenidos luego del exceso hídrico. a. Peso fresco aéreo (PFA). b. Peso fresco de la raíz (PFR). c. Peso seco de hojas y tallos (PSA). d. Peso seco de raíces (PSR). Veinticuatro plantas de cada cultivar fueron crecidas en cámara de cultivo con condiciones controladas de luz y temperatura y bajo riego normal (control) durante 4 semanas. Luego, la mitad de ellas fueron anegadas mediante llenado de las bandejas que contenían las macetas de manera tal que la totalidad de su sistema radicular quedó bajo agua. La mitad restante siguió con las condiciones iniciales y fueron utilizadas como control. El ensayo fue realizado por triplicado, con resultados similares entre ellos. Las barras de error indican la DE. Diferentes letras sobre los histogramas (a, b) indican valores significativamente diferentes entre tratamientos ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey).

Previo a la determinación de las variables biométricas, tanto las plantas crecidas en condiciones normales como aquellas sometidas a estrés por anegamiento fueron fotografiadas individualmente para un posterior análisis radicular. Las imágenes obtenidas fueron luego digitalizadas y analizadas utilizando el software ImageJ. De esta manera se determinó la longitud y el área total de las raíces de cada cultivar y de cada condición de crecimiento (Figura 13).

En cuanto a la longitud de las raíces, no se observó diferencia ($p > 0,05$) al comparar plantas del cultivar Matrera crecidas en condiciones normales de riego (10,8 cm) y plantas estresadas (9,6 cm; Figura 13a). Del mismo modo, tampoco se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) en la longitud de las plantas Vaquera control y aquellas anegadas, determinando longitudes promedio de 13,1 cm y 12,6 cm, respectivamente (Figura 13a). Por el contrario, al analizar el cultivar Monarca se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la longitud de sus raíces luego del estrés, con valores de 15,9 cm en condiciones normales y 10,6 cm en anegamiento (Figura 13a).

Luego, se procedió a evaluar el área total de las raíces. El cultivar Matrera se vio afectado por el anegamiento, mostrando una disminución significativa ($p < 0,05$) del área de sus raíces, con un área promedio de 6,3 cm² en condiciones control y 1,9 cm² luego del estrés (Figura 13b). Contrario a lo sucedido con la longitud, en el cultivar Monarca no se observó un efecto significativo ($p > 0,05$) en el área radicular, con un valor promedio de 11,0 cm² bajo riego normal y 7,8 cm² luego del anegamiento (Figura 13b). Del mismo modo, plantas del cultivar Vaquera tampoco mostraron diferencia significativa ($p > 0,05$) en el área promedio bajo riego control (9,8 cm²) y aquel luego del estrés hídrico (8 cm²; Figura 13b).

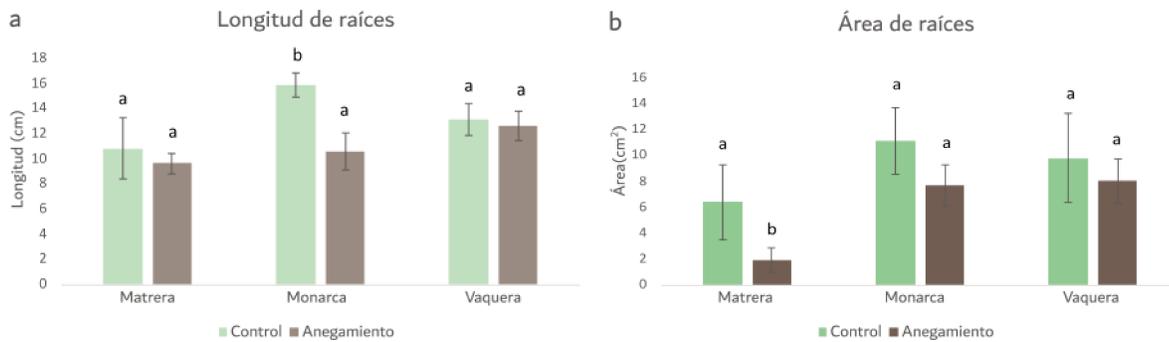


Figura 13. Análisis de la longitud total y área total de las raíces de los distintos cultivares y crecidos bajo distintas condiciones de riego. En verde se muestran los resultados para las plantas cultivadas bajo riego normal (control) y en gris, los valores de aquellas sometidas a anegamiento. a. Longitud total de las raíces. b. Área radicular total de los tres cultivares de alfalfa. Las plantas fueron cultivadas en condiciones controladas durante 4 semanas hasta estadio vegetativo temprano. Luego, la mitad de ellas fueron anegadas por 14 días y el resto se mantuvo con riego normal (control). Para el análisis se utilizó ImageJ Fiji (<https://fiji.sc/>). Se utilizaron 12 réplicas biológicas para cada condición y cultivar. El ensayo fue realizado por triplicado, con resultados similares entre ellos. Las barras de error indican la DE. Diferentes letras (a, b) corresponden a diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey).

2.3.3) Estudio morfológico de las raíces

Con el objetivo de observar determinantes morfológicos que reflejen adaptaciones o daños sufridos por las raíces en respuesta al estrés hídrico, se realizaron cortes histológicos comparativos entre plantas cultivadas en condiciones de riego normales y aquellas expuestas a inundación. Se evaluaron cortes transversales de 10 μm de espesor de raíces primarias de los 3 cultivares. Las muestras fueron tomadas al momento de finalizar los 14 días de anegamiento.

Como se observa en la Figura 14, los tres cultivares mostraron una disminución en el diámetro de los cortes al comparar aquellos crecidos en condiciones control con los que sufrieron el exceso hídrico. Este resultado se condice con la menor disponibilidad de oxígeno en el suelo durante el anegamiento, afectándose la división celular y la elongación en las raíces.

Interesantemente, al evaluar la morfología interna de plantas del cultivar Vaquera, se observó la generación de aerénquima en la raíz de plantas crecidas bajo anegamiento (Figura 14,

flechas negras). El aerénquima es un tejido vegetal especializado que se forma en las raíces de ciertas plantas. Este está compuesto por grandes espacios intercelulares que permiten el almacenamiento y transporte de gases, como oxígeno y dióxido de carbono, entre la planta y sus raíces sumergidas, ayudando a la planta a sobrevivir en condiciones de hipoxia. Por el contrario, las plantas correspondientes a los cultivares Matrera y Monarca no evidenciaron formación de aerénquima en las raíces analizadas (Figura 14).

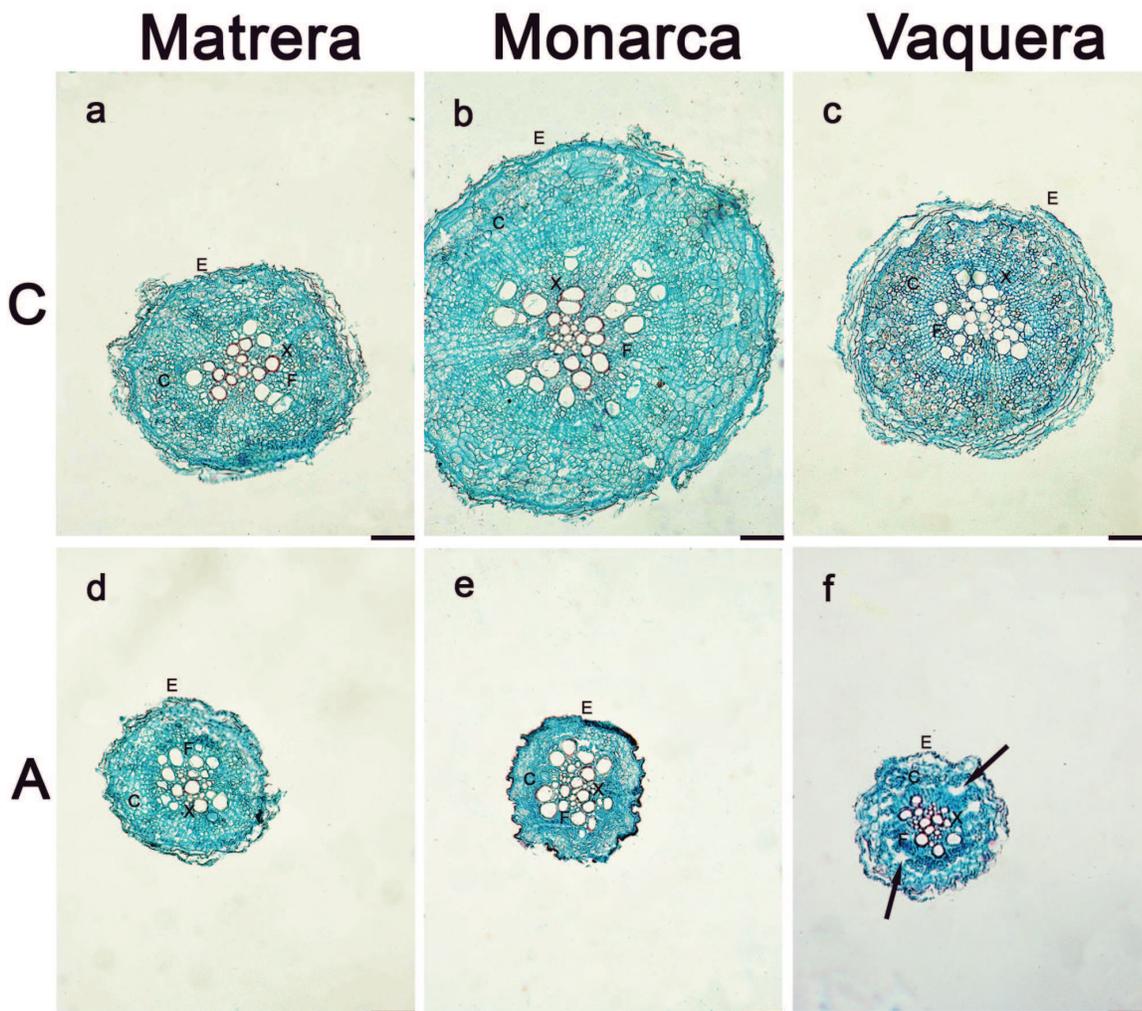


Figura 14. Análisis histológico de raíces de alfalfa crecidas bajo riego normal (Fila C) y sometidas a 14 días de anegamiento (Fila A). Se seleccionó la zona de la raíz 3 cm por debajo del comienzo de la misma y se tomaron muestras de la raíz principal. Los cortes transversales se realizaron a 10 μ m de espesor y fueron teñidos con Safranina y Astra Blue. Se utilizaron 5 réplicas biológicas de cada cultivar y

tratamiento. La figura es representativa de los resultados de todas las réplicas analizadas. Las flechas negras indican los espacios aéreos correspondientes al aerénquima del cultivar Vaquera. La letra X indica el xilema, la F el floema, la letra C señala el córtex y la E, la epidermis. Las barras negras indican la escala y corresponden a 100 μm .

2.3.4) Cuantificación de ceras epicuticulares y análisis estomático

Para observar variaciones fisiológicas en respuesta a las distintas condiciones hídricas, se cuantificó la producción de ceras epicuticulares totales en plantas de alfalfa cultivadas bajo condiciones de riego normal y anegamiento mediante extracción de las mismas con cloroformo. Para ello, se seleccionaron al azar, cinco hojas de cinco plantas de cada cultivar y por cada condición de riego. En cuanto a los resultados obtenidos, el cultivar Matrera no mostró diferencia significativa ($p > 0,05$) entre el promedio de ceras en condiciones control (1,6 mg/cm^2) y el promedio obtenido en anegamiento (1,1 mg/cm^2 ; Figura 15a). Por el contrario, las plantas correspondientes a los cultivares Monarca y Vaquera disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) el contenido de ceras epicuticulares durante el estrés. En condiciones control, las plantas del cultivar Monarca produjeron en promedio 1,48 mg/cm^2 mientras que las correspondientes a Vaquera 1,73 mg/cm^2 de ceras epicuticulares por área foliar. Estos valores se vieron disminuidos luego del exceso hídrico, con un promedio de 0,87 mg/cm^2 para Monarca y 0,90 mg/cm^2 para Vaquera (Figura 15a).

Por otra parte, se utilizó el sistema de negativo descrito anteriormente para realizar un análisis de cuantificación estomática en las plantas bajo estudio. De esta manera se cuantificó el número de estomas totales por mm^2 correspondientes para los tres cultivares bajo las dos condiciones de crecimiento (normal/anegamiento). Como se muestra en la Figura 15b, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el número de estomas totales entre cultivares, y tampoco entre las diferentes condiciones de riego.

Luego, se procedió a determinar el porcentaje de apertura estomática. En este caso, se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) de la misma en los tres cultivares durante el estrés hídrico (Figura 15c). Por un lado, las plantas del cultivar Matrera mostraron un promedio de 69,1% de estomas abiertos en condiciones control, mientras que luego del estrés se encontró un promedio de 58% de apertura estomática. Por su parte, las plantas correspondientes al cultivar

Matrera presentaron un 72,1% de apertura estomática en condiciones control y un 47% en anegamiento. Por último, el cultivar Vaquera, tuvo en promedio un 69,7% de estomas abiertos y solo un 31% permanecieron abiertos en anegamiento (Figura 15c).

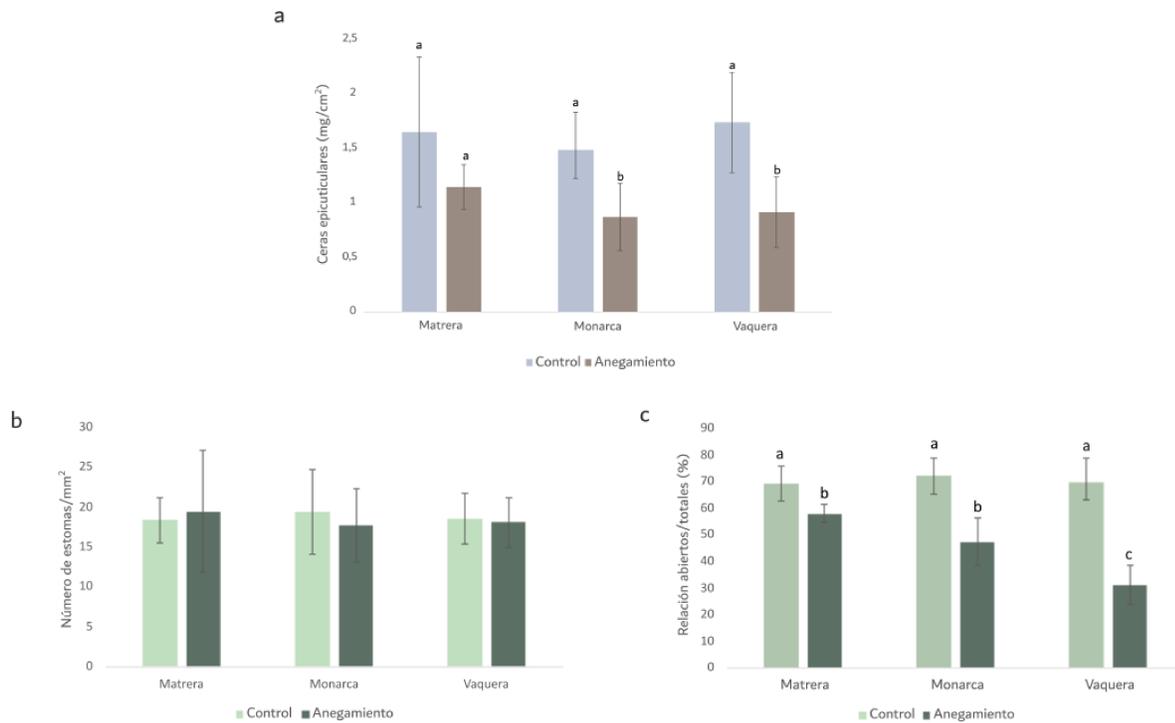


Figura 15. Análisis fisiológico de tres cultivares de alfalfa luego de ser sometidos a 14 de anegamiento. a. Contenido de ceras epicuticulares totales expresado en cantidad de ceras por área foliar de cultivares crecidos bajo riego normal (azul) y exceso hídrico (gris). b. Número de estomas totales. c. Porcentaje de apertura estomática. Tanto en b. como en c., se graficó en verde claro los promedios obtenidos por las plantas crecidas bajo riego normal, mientras que en verde oscuro se indican las barras corresponden a aquellas sometidas a estrés. En todos los casos se utilizaron 5 réplicas biológicas para cada cultivar y para cada condición de riego. Las barras de error indican la DE. Distintas letras por encima de las barras (a, b, c) indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey). Los gráficos sin letras por encima de las barras indican que los tratamientos no son estadísticamente diferentes.

2.3.5) Análisis molecular de la expresión de genes relacionados con vías hormonales

Para evaluar los mecanismos moleculares que puedan intervenir en la adaptación de la alfalfa frente a este tipo de condiciones adversas, se determinaron los niveles de expresión de genes involucrados en la síntesis de hormonas vegetales. Se cuantificó la expresión de los genes tanto en muestras de parte aérea como de raíz de plantas correspondientes a los tres cultivares en ambas condiciones de riego.

En este estudio inicialmente se determinó el nivel de expresión del gen codificante para la aldehído oxidasa (AO). Como se expuso en el capítulo anterior, la AO es una enzima clave en la biosíntesis del ABA (Seo & Koshiba, 2002). En condiciones de anegamiento, el ABA juega un rol fundamental en la respuesta de la planta al estrés hídrico, regulando el cierre estomático y ajustando la expresión de genes relacionados con la tolerancia al estrés. Teniendo en cuenta las muestras aéreas y las condiciones evaluadas, el cultivar Matrera aumentó un 170% la expresión de este gen en anegamiento al comparar con las plantas control (Figura 16a). Del mismo modo, cuando se analizó Monarca también se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de la expresión de este gen, con un valor promedio del 172% mayor en las plantas estresadas y al compararlas con su control (Figura 16a). En este sentido, en Vaquera se observó un aumento de la expresión del gen del 80% cuando se evaluaron las plantas en condiciones de estrés (Figura 16a). En cuanto a las muestras de tejido radicular, los tres cultivares mostraron un claro aumento de la expresión del gen de la AO, con un 180% de aumento promedio de la expresión para Matrera, 7.000% para Monarca y 400% para Vaquera (Figura 16b).

Luego se evaluó la expresión del gen codificante para la ACC oxidasa (ACCO). Al catalizar la última etapa de la síntesis del etileno, esta enzima juega un papel clave en la modulación de las respuestas adaptativas de las plantas al anegamiento, contribuyendo a la formación de estructuras que mejoran el intercambio gaseoso y a la regulación del crecimiento para aumentar la supervivencia en ambientes con exceso de agua (Pan et al., 2021). En las condiciones ensayadas y teniendo en cuenta lo encontrado para muestras aéreas, se encontró un aumento significativo ($p < 0,05$) de la expresión del gen en plantas de los tres cultivares (Figura 16c). Las plantas del cultivar Matrera mostraron un aumento del 150% de la expresión génica luego de la inundación, mientras que las correspondientes a Monarca tuvieron un aumento promedio del 200% al comparar la expresión con la de su control. Finalmente, las plantas del cultivar Vaquera mostraron en promedio 110% mayor expresión del gen codificante para la

ACCO durante el anegamiento y en comparación con el control (Figura 16c). En relación a la expresión génica en raíces, Se observó que tanto en Monarca como en Vaquera la expresión del gen aumentó significativamente ($p < 0,05$), mientras que en Matrera no se encontró diferencia significativa ($p > 0,05$) entre plantas crecidas bajo riego normal y aquellas anegadas (Figura 16d). Más detalladamente, Monarca evidenció un 100% mayor expresión del gen durante el estrés y Vaquera un 50% al comparar con sus controles (Figura 16d).

Luego, se midió la expresión del gen codificante para la enzima fosfolipasa A2 (FA2), esta es una enzima involucrada en la hidrólisis de fosfolípidos de membranas celulares. La reacción hidrolítica produce entre otros compuestos, ácido linolénico, el cual es un precursor directo en la biosíntesis del ácido jasmónico (Wasternack & Hause, 2013). Al evaluar la expresión de FA2 en muestras aéreas de plantas de alfalfa, se encontró una respuesta diferencial entre los 3 cultivares. Por un lado, en plantas del cultivar Matrera se observó un aumento del 150% en la expresión del gen durante el anegamiento (Figura 16e). Sin embargo, al analizar plantas del cultivar Monarca, no se detectaron variaciones significativas ($p > 0,05$) en la expresión del gen durante el estrés, y sus valores de expresión fueron similares a los de las plantas estresadas del cultivar Matrera (Figura 16e). Finalmente, las plantas del cultivar Vaquera no mostraron variaciones estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre condiciones, siendo sus niveles semejantes a los observados en plantas del cultivar Matrera bajo riego normal (Figura 16e). Por otra parte, al evaluar la expresión de FA2 en raíz, solo las plantas del cultivar Vaquera mostraron un aumento significativo ($p < 0,05$) con, en promedio, 260% mayor expresión durante el anegamiento (Figura 16f). Las plantas correspondientes a los cultivares Matrera y Monarca no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los niveles de expresión de FA2 entre condiciones de riego (Figura 16f).

Finalmente, se determinó la expresión del gen codificante para la isocorismato sintasa (ICS). Como se expuso en el capítulo anterior, esta es una enzima clave en la biosíntesis del ácido salicílico (SA; Wildemurth et al., 2001). Esta hormona juega un papel relevante en la adaptación de las plantas al anegamiento al influir en la modulación de ROS, la defensa contra patógenos y el ajuste del crecimiento en condiciones adversas (Herrera-Vásquez et al., 2015; Vlot et al., 2009). Al evaluar la expresión de ICS en muestras de tejido aéreo, se encontró un aumento significativo ($p < 0,05$) de su expresión para los tres cultivares evaluados en esta tesis (Figura 16g). Concretamente, las plantas del cultivar Matrera mostraron en promedio 100%

mayor expresión durante el estrés. Las plantas del cultivar Monarca evidenciaron en promedio 150% mayor expresión en anegamiento; y finalmente, se encontró un 160% mayor expresión en plantas correspondientes al cultivar Vaquera al compararlas con plantas sometidas a riego normal (Figura 16g). En muestras de raíz, también se observó una mayor expresión ($p < 0,05$) para los tres cultivares. En promedio, las plantas del cultivar Matrera aumentaron 360 veces la expresión del gen durante anegamiento, mientras que las del cultivar Monarca 17 veces y las del cultivar Vaquera 233 veces mayor expresión en condiciones de estrés al comparar con los correspondientes controles de riego normal (Figura 16h).

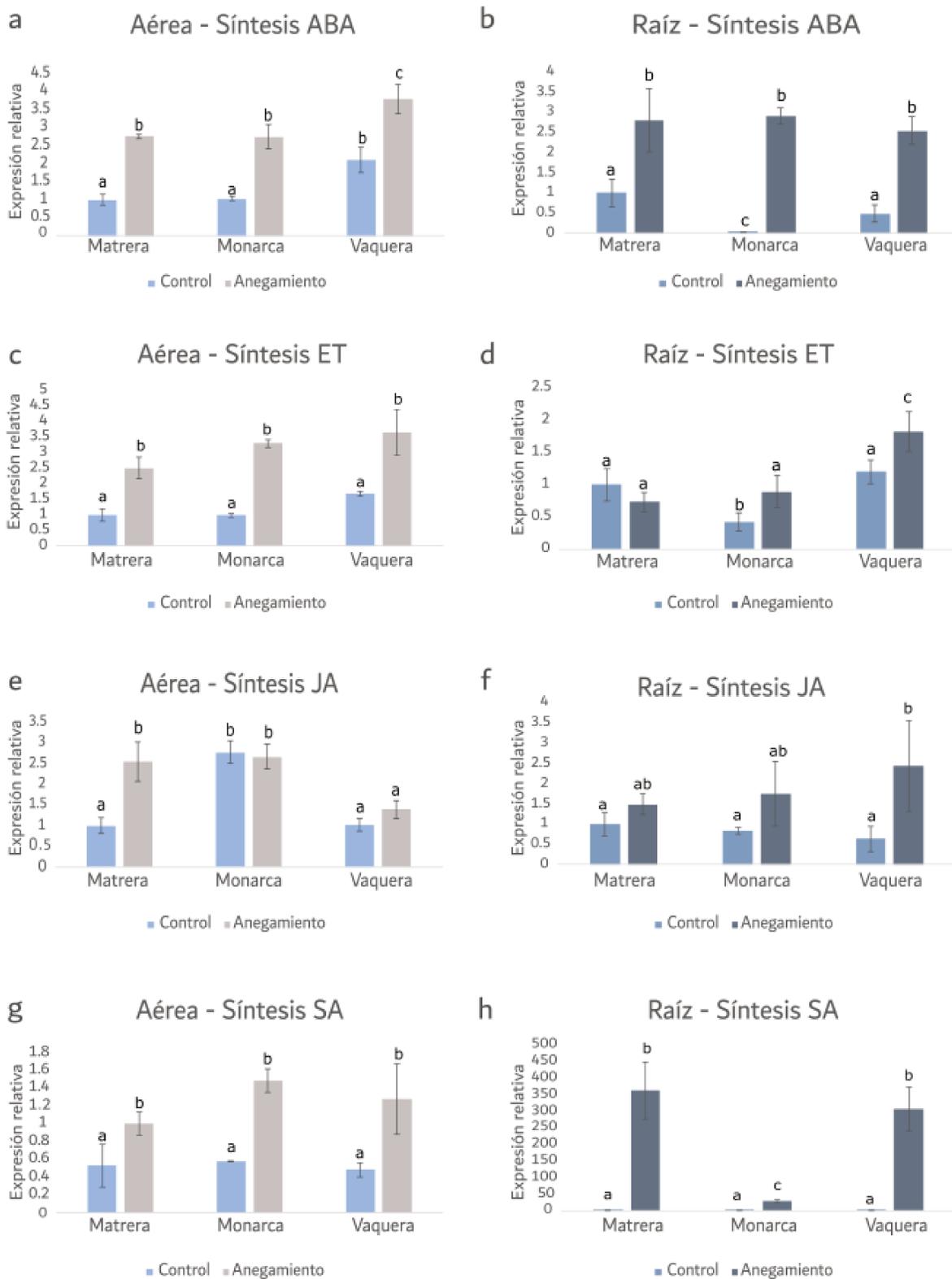


Figura 16. Análisis de expresión de genes involucrados en la síntesis de hormonas. Las plantas fueron crecidas durante 4 semanas en condiciones controladas de luz, riego y temperatura. Luego, la mitad de

ellas se sometieron a anegamiento durante 14 días. El sistema radicular quedó cubierto de agua durante todo el período de estrés. El resto de las plantas se mantuvo con riego normal y se utilizó como control. Al finalizar el ensayo, se tomaron muestras de hojas y raíces a partir de las cuales se extrajo el ARN total y se midió la expresión de los genes mediante RT-qPCR. Los datos mostrados corresponden a la expresión evaluada relativizada a la expresión del cultivar Matrera en condiciones normales de riego (expresión = 1) utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por cada condición de riego, cultivar y tejido. Se midió la expresión de los genes codificantes para la aldehído oxidasa (a y b), la ACC oxidasa (c y d), la fosfolipasa A2 (e y f) y la isocorismato sintasa (g y h). La columna de la izquierda corresponde a los resultados obtenidos de muestras aéreas. La columna de la derecha indica los resultados de muestras de raíz. Las barras de error indican la DE. Distintas letras por encima de las barras (a, b, c) indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey).

2.3.6) Perfil hormonal de los cultivares

El conjunto de resultados obtenidos de los análisis agronómicos, fisiológicos y moleculares realizados previamente permite inferir que el cultivar Matrera podría ser el más sensible al anegamiento mientras que Vaquera se comportaría como el cultivar con mayor tolerancia al estrés por exceso hídrico. Estos dos cultivares fueron seleccionados para realizar un análisis detallado de los niveles hormonales en muestras de la parte aérea y de raíz de plantas cultivadas bajo riego normal (control) y anegamiento. Estos niveles fueron medidos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem.

Si bien el análisis molecular de la expresión génica del punto anterior puede ofrecer una impresión inicial sobre la síntesis de hormonas en respuesta al estrés, no siempre refleja con precisión los niveles hormonales reales presentes en los tejidos. Esto se debe a que la regulación de las hormonas vegetales es un proceso complejo, que no solo depende de la transcripción de los genes involucrados en su biosíntesis, sino también de factores postraduccionales, la estabilidad de las proteínas, la actividad enzimática y la movilidad de las hormonas entre tejidos (Santner et al., 2009). Debido a esto, se obtuvo el perfil hormonal de estos dos cultivares con comportamientos contrastantes ante el estrés para obtener una visión más completa y precisa de los niveles hormonales y su papel en la respuesta de las plantas al anegamiento. Los resultados se pueden observar en las Figuras 17 y 18.

Este análisis se centró en aquellas hormonas cuyos genes de síntesis fueron anteriormente caracterizados respecto a sus niveles de expresión mediante RT-qPCR. En este caso, no se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) en el contenido de ácido abscísico ni entre cultivares, tampoco entre condiciones de riego ni tejidos analizados (Figura 17a y 17d).

En relación a la cuantificación de ácido jasmónico (JA), cuando se estudió el tejido aéreo se observó concordancia con lo determinado a nivel molecular (Figura 16e), donde se evidenció un aumento en el contenido de JA en plantas del cultivar Matrera durante el anegamiento, mientras que no hubo modificaciones en los valores en plantas del cultivar Vaquera (Figura 17b). Interesantemente, al evaluar el contenido de JA en raíces, se determinó un menor contenido ($p < 0,05$) en muestras provenientes de plantas del cultivar Matrera afectadas por el anegamiento (71 ng/g PS) al comparar con el promedio obtenido en condiciones control (430 ng/g PS; Figura 17e). Por el contrario, en plantas del cultivar Vaquera se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) del contenido de JA en raíces durante el estrés, con un promedio de 493 ng/g PS, mientras que en condiciones control el promedio fue de 93 ng/g PS (Figura 17e).

También, se evaluó el contenido de ácido salicílico (SA) en plantas bajo anegamiento. En relación a la parte aérea, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en la cantidad de SA en plantas del cultivar Matrera durante el estrés, con un promedio de 180.000 ng/g PS, mientras que en condiciones normales el promedio fue de 4.300 ng/g PS (Figura 17c). En cuanto a las plantas del cultivar Vaquera, no se encontraron diferencias significativas en su contenido de tejido aéreo ($p > 0,05$; Figura 17c). Al analizar el tejido radicular, y de manera similar a lo encontrado en el análisis molecular (Figura 16h), los dos cultivares aumentaron significativamente ($p < 0,05$) el contenido de SA durante el estrés (Figura 17f).

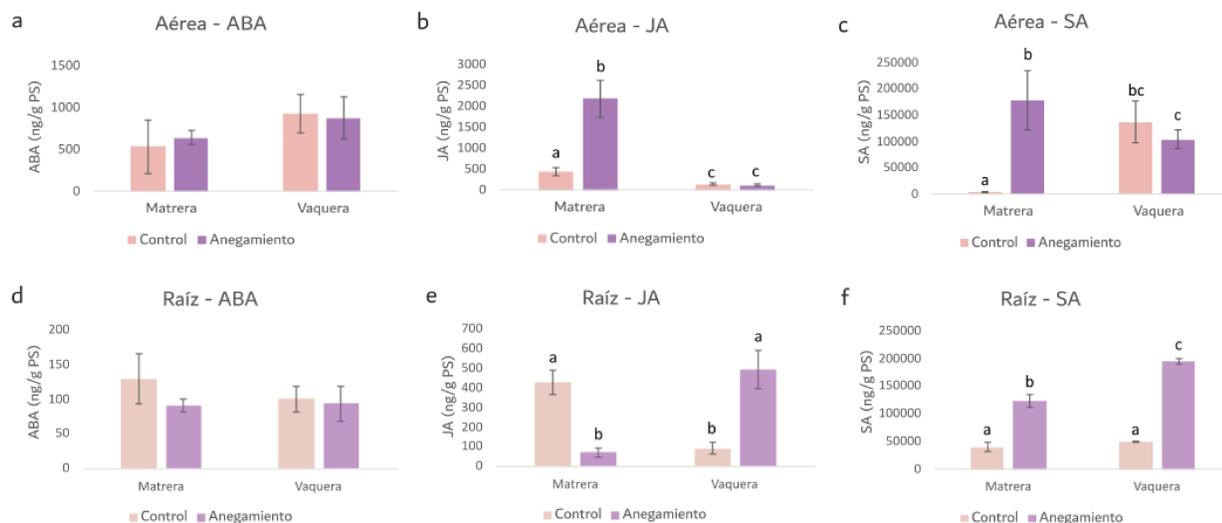


Figura 17. Contenido de ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA) en plantas del cultivar determinado previamente como más sensible (Matrera) y como más tolerante (Vaquera) al anegamiento. Las plantas de ambos cultivares fueron crecidas durante 4 semanas en condiciones controladas de luz, riego y temperatura. Luego, y mientras se encontraban en estadio vegetativo temprano, la mitad de ellas se sometieron a anegamiento durante 14 días. El resto de las plantas se mantuvo con riego normal y se utilizaron como control. Al finalizar el ensayo, se tomaron en promedio, 100 mg de tejido aéreo y 100 mg de raíz de cada planta. Los tejidos se pulverizaron en frío y se liofilizaron. Cada muestra fue analizada mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por cada condición de riego, cultivar y tejido. La fila superior corresponde a la determinación de ABA (a), JA (b) y SA (c) en muestras aéreas. La fila inferior indica la concentración de ABA (d), JA (e) y SA (f) en raíces. Las barras de error indican la DE. Distintas letras por encima de las barras (a, b, c) indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey). Los gráficos sin letras por encima de las barras indican que los tratamientos no son estadísticamente diferentes.

Las auxinas, citoquininas (como la kinetina) y giberelinas son fundamentales en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal, controlando procesos como la elongación celular, división celular y diferenciación de tejidos (Gomes & Scortecci, 2021). En este estudio se decidió evaluar su contenido en plantas de los cultivares Matrera y Vaquera, y los resultados se observan en la Figura 18. Primeramente, se evaluó la concentración de ácido indol-3-acético (IAA, *indole-3-acetic acid*), la auxina natural más abundante en plantas, y no se encontraron

diferencias ($p > 0,05$) en sus valores ni entre cultivares, ni entre condiciones de riego o tejidos analizados (Figura 18a y d).

Un comportamiento similar fue encontrado al medir la concentración de kinetina (KIN, *kinetin*), donde tampoco se observaron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre los promedios obtenidos entre cultivares, condiciones de riego y tejidos (Figura 18b y e).

Para finalizar, se cuantificaron los niveles de ácido giberélico (GA3, *gibberellic acid*). En cuanto a la parte aérea, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en el contenido de GA3 en plantas del cultivar Matrera durante el estrés, con un promedio de 2.535 ng/g PS, mientras que el promedio de las plantas control fue de 289 ng/g PS (Figura 18c). El cultivar Vaquera, no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) en el contenido de GA3 al comparar las plantas estresadas con aquellas crecidas bajo riego normal (Figura 18c). Interessantemente, en tejido subterráneo proveniente de plantas del cultivar Matrera no se encontró diferencias ($p > 0,05$) en el contenido de GA3 de plantas anegadas y de aquellas crecidas bajo riego normal (Figura 18f). Las plantas del cultivar Vaquera, por su parte, mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), con una disminución del contenido de GA3 en raíces durante el estrés (292 ng/g PS) al comparar con su control (577 ng/g PS; Figura 18f).

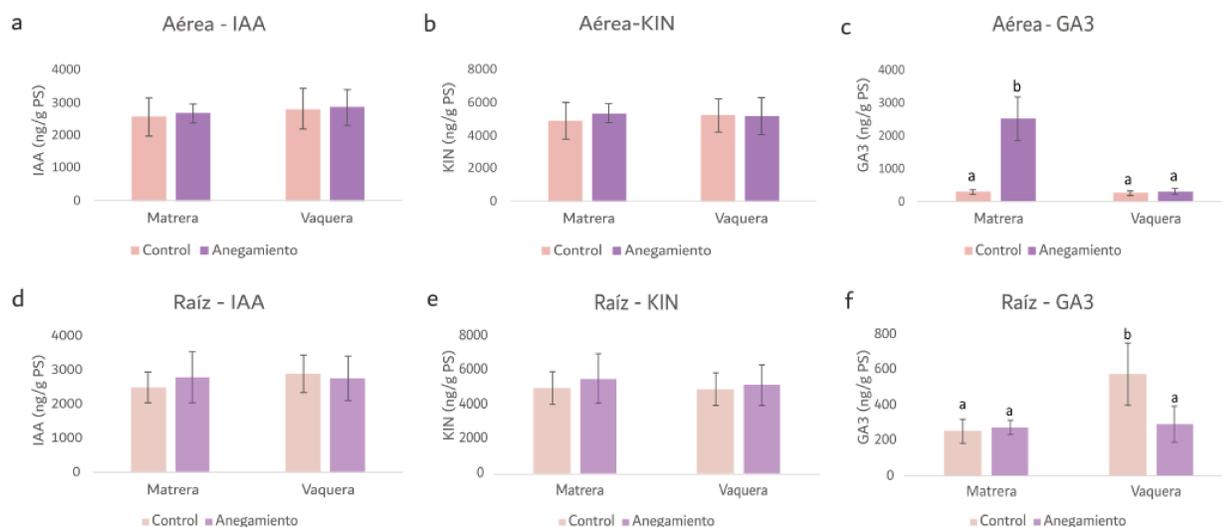


Figura 18. Concentración de ácido indol-3-acético (IAA), kinetina (KIN) y ácido giberélico (GA3) en tejidos vegetales determinada mediante LC-MS/MS. Se cultivaron plantas de los cultivares Matrera y

Vaquera en cámara de crecimiento durante 4 semanas hasta estadio vegetativo temprano. La mitad de las plantas se cubrieron de agua de manera tal que todo su sistema radicular quedó anegado por 14 días. El resto de las plantas continuaron durante el mismo período bajo riego normal y fueron utilizadas como control. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por cada condición de riego, cultivar y tejido. La fila superior corresponde a la determinación de IAA (a), KIN (b) y GA3 (c) en hojas. La fila inferior indica la concentración de IAA (d), KIN (e) y GA3 (f) en raíces. Las barras de error indican la DE. Distintas letras por encima de las barras (a, b) indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey). Los gráficos sin letras por encima de las barras indican que los tratamientos no son estadísticamente diferentes.

2.4) Discusión y conclusiones

El anegamiento es una clase de estrés hídrico que genera graves daños a las raíces de una amplia variedad de plantas, entre ellas alfalfa (*Medicago sativa* L.). El efecto de este estrés se ve especialmente exacerbado cuando las temperaturas del suelo son elevadas (Striker & Colmer, 2017). El anegamiento reduce la disponibilidad de oxígeno en las raíces, provocando hipoxia, lo que conlleva daños en el sistema radicular y muerte de tejidos (Voeselek & Sasidharan, 2013). Además, las inundaciones predisponen a las plantas a enfermedades severas, como es el caso de la pudrición de la raíz causada por el patógeno *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis* (Wilcox & Mircetich, 1985). Como resultado, la alfalfa es considerada como un cultivo sensible al anegamiento en comparación con otras especies. Aún más, en el estudio realizado por Striker & Colmer (2017), la alfalfa fue determinada como la especie más sensible al anegamiento entre diversas pasturas evaluadas.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que, aunque los tres cultivares de alfalfa presentaron una elevada tasa de supervivencia tras 14 días de anegamiento en cámara de cultivo (Figura 11a), su capacidad para mantener su productividad y estructura radicular difiere significativamente.

El índice de verdor es un parámetro que se utiliza ampliamente para evaluar la salud y el vigor de las plantas, ya que está asociado con el contenido de clorofilas, esenciales para la fotosíntesis y el crecimiento vegetativo (Richardson et al., 2002). En condiciones de hipoxia, se pueden desencadenar procesos de degradación de clorofila y daños en el sistema fotosintético de las plantas, lo que se traduce en una disminución del índice de verdor en comparación con plantas no sometidas a estrés (Ashraf, 2012). En esta tesis, se encontró una disminución de aproximadamente el 60% en el índice de verdor de los tres cultivares estudiados durante el estrés (Figura 11b). En un estudio reciente se encontró que un tratamiento de inundación de 5 días de duración no modificó significativamente el contenido global de clorofila en plantas de alfalfa (Sghaier et al., 2020), por lo que indicaría que la duración del estrés es clave y que la degradación de clorofilas no sería una respuesta inmediata.

Estudios previos, como los realizados por Striker y Colmer (2017), reportaron que, bajo condiciones de anegamiento o deficiencia de oxígeno, plantas de alfalfa alcanzaron una masa seca media de solo el 40% en comparación con las plantas controles. Valores similares se encontraron en este estudio para plantas de los cultivares Matrera y Monarca, con un promedio

de 35% de masa seca aérea en comparación a sus controles (Figura 12c). Interesantemente, las plantas del cultivar Vaquera anegadas, no mostraron diferencia en el PS aéreo al compararlas con aquellas bajo riego normal (Figura 12c).

La reducción significativa en el área de la raíz de las plantas del cultivar Matrera bajo anegamiento (Figura 13b) sugiere que este cultivar experimenta un colapso en la integridad estructural de su sistema radicular bajo hipoxia. Esto podría reflejar una menor capacidad de resistencia al anegamiento en comparación con los otros cultivares, al no mantener un área radicular adecuada para la absorción de agua y nutrientes. La reducción en el área radicular limita la superficie de contacto con el suelo, afectando potencialmente la capacidad de la planta para enfrentar el estrés hídrico en condiciones de anegamiento prolongado (Voesenek & Bailey-Serres, 2015). Las plantas de los cultivares Monarca y Vaquera, sin embargo, lograron mantener el área radicular en niveles estables (Figura 13b). En este contexto, estos cultivares parecen estar menos afectados en términos de pérdida de área radicular, lo que podría traducirse en una ventaja adaptativa bajo anegamiento. Es interesante notar que, en el caso de las plantas del cultivar Monarca, aunque la longitud de la raíz se redujo (Figura 13a), el área radicular no se vio significativamente afectada (Figura 13b). Esto podría sugerir que, aunque el crecimiento en longitud disminuye, las plantas de este cultivar compensan su relación de contacto con el medio que las rodea manteniendo un área radicular suficiente para su función.

Una de las principales respuestas anatómicas a la hipoxia es el desarrollo de aerénquima en la raíz como respuesta a las condiciones de anegamiento (Mahmood et al., 2019). El tejido aerenquimático proporciona un sistema continuo de espacios aéreos interconectados (lagunas aerenquimáticas) de menor resistencia para el transporte de oxígeno desde los tallos hasta las raíces sumergidas, permitiendo el crecimiento de las raíces y la exploración del suelo en condiciones anaeróbicas (Striker, 2012). Se ha encontrado una tendencia positiva entre la tolerancia a inundaciones y la capacidad de formar aerénquima en especies como el maíz (*Zea mays*; Mano & Omori, 2007). Al analizar la morfología interna de las raíces de plantas de los cultivares bajo estudio, se encontró que el cultivar Vaquera se destacó como el único con formación de aerénquima (Figura 14), lo que sería una estrategia adaptativa clave que podría explicar su menor afectación en las variables agronómicas.

Por otro lado, un grupo de investigadores ha encontrado que la deposición de cristales de cera epicuticular se reduce en plantas de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de

hipoxia (Kim et al., 2017). Teniendo en cuenta que la cutícula es una barrera importante para el intercambio de gases, especialmente cuando los estomas están cerrados en condiciones de anegamiento, estos autores sugieren que la formación de una cutícula permeable puede ser una respuesta adaptativa de las plantas para absorber el oxígeno atmosférico (Kim et al., 2017). Cuando evaluamos plantas de los cultivares Monarca y Vaquera observamos una disminución del contenido de ceras epicuticulares en condiciones de anegamiento (Figura 15a), lo que podría indicar una respuesta fisiológica importante para tolerar este estrés. En contraste, las plantas del cultivar Matrera mantuvieron estable su producción de ceras bajo anegamiento (Figura 15a), lo que podría sugerir una menor respuesta fisiológica adaptativa, limitando su efectividad frente al anegamiento.

El cierre estomático durante las inundaciones es un efecto bien estudiado (Sojka, 1992). Está determinado como una respuesta temprana al estrés, con el objetivo de disminuir la pérdida de agua por transpiración, lo que resulta en una reducción de la fotosíntesis neta y la conductancia estomática (Gil et al., 2007). Una reducción de la conductancia estomática y de la tasa fotosintética ha sido encontrada en soja (*Glycine max*) dos días después de la aplicación del anegamiento (Oosterhuis et al., 1990). En este trabajo, y en concordancia con lo reportado, hemos encontrado una disminución significativa en el porcentaje de apertura estomática en los tres cultivares durante el anegamiento (Figura 15c).

El etileno juega un papel fundamental en la respuesta de las plantas al anegamiento (Khan et al., 2020). Bajo condiciones de hipoxia, este gas regula diversas respuestas fisiológicas clave. La acumulación de etileno promueve la formación de aerénquima, inhibe el crecimiento de raíces y favorece la elongación de tallos y el hipocotilo, permitiendo que las plantas busquen mejores condiciones aéreas en su entorno inundado (Jackson, 2008; Steffens & Sauter, 2010). Un aumento en la expresión de ACCO en tejidos aéreos, como se observó en plantas correspondientes a los tres cultivares (con incrementos del 110% a 200%, Figura 16c), podría asociarse con respuestas como la formación de estructuras de escape, que mejoran el intercambio de gases y facilitan la supervivencia en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno. Sin embargo, el comportamiento diferencial en raíces sería un hallazgo clave que podría explicar el comportamiento diferencial entre cultivares. Mientras que en plantas de Monarca y Vaquera se observaron incrementos significativos de la expresión de ACCO (Figura 16d), en las correspondientes a Matrera no se detectaron cambios significativos. No obstante, vale la pena

resaltar que la expresión de ACCO en plantas del cultivar Vaquera bajo anegamiento fue significativamente mayor al observado en los cultivares Monarca y Matrera (Figura 16d). Esto podría explicar por qué la formación de aerénquima es únicamente observada en este genotipo, dando una ventaja importante a este cultivar.

Aunque no es directamente responsable del cierre estomático, las vías de regulación del etileno interactúan con las del ácido abscísico (ABA) para ajustar el intercambio gaseoso en situaciones de estrés hídrico (Voesenek & Sasidharan, 2013). Al evaluar la expresión del gen involucrado en la síntesis de ABA, se ha observado un aumento significativo en los tres cultivares en ambos tejidos evaluados (Figura 16a y 16b), lo que podría tener influencia en el cierre de los estomas observado previamente (Figura 15c).

Además, se ha sugerido que el ácido jasmónico (JA) podría regular la expresión del gen que codifica para la ACC oxidasa (Jordán & Casaretto, 2006), aumentando la producción de etileno en condiciones de estrés, lo que refuerza su papel en la respuesta al anegamiento. En tejido aéreo, el aumento tanto en la expresión de *FA2* (Figura 16e) como en el contenido de JA (Figura 17b) en plantas del cultivar Matrera durante el anegamiento indica una activación coordinada de la ruta de síntesis de JA en respuesta al estrés. Esta correlación entre la expresión de *FA2* y los niveles de JA sugiere que Matrera emplearía al JA en tejido aéreo como una señal de adaptación, probablemente para modular la respuesta al estrés y activar mecanismos de defensa oxidativa. Por otro lado, en plantas del cultivar Vaquera no se observaron cambios en los niveles de JA cuando se analizó el tejido aéreo (Figura 17b) al igual que no se detectó variación en la expresión de *FA2* (Figura 16e), lo que podría indicar una estrategia de respuesta menos dependiente de JA en estos tejidos, sugiriendo que este cultivar podría estar activando otras rutas hormonales o mecanismos de respuesta para tolerar el estrés hídrico en la parte aérea. En raíces, la disminución del contenido de JA en plantas del cultivar Matrera bajo anegamiento contrasta con la respuesta observada en las correspondientes a Vaquera, que muestra un notable incremento en la cantidad de JA en raíces durante el estrés (Figura 17e). Este hallazgo podría estar sugiriendo que las plantas del cultivar Vaquera activan la acumulación de JA en la raíz como respuesta adaptativa para enfrentar el estrés directo en la zona de absorción y contacto con el agua acumulada. Este aumento en raíces podría estar relacionado con la necesidad de activar mecanismos de defensa locales para mitigar el daño por ROS en un ambiente hipóxico. Este tipo

de ajuste radicular ha sido observado en otras especies que también aumentan la concentración de JA en raíces para tolerar condiciones adversas (Haque et al., 2014).

Respecto al ácido salicílico (SA), el presente estudio mostraría una fuerte activación del sistema de defensa en las plantas mediante el aumento de la expresión del gen *ICS* y la acumulación de SA en respuesta al anegamiento, especialmente en raíces (Figuras 16h y 17f). Este incremento es consistente con la función del SA como modulador clave en la respuesta al estrés, donde participa en la regulación de la acumulación de ROS y en la inducción de respuestas protectoras, tales como la fortificación de las defensas contra patógenos y el control del crecimiento celular en condiciones de hipoxia (Herrera-Vásquez et al., 2015; Janda et al., 2014). Observando específicamente los resultados por cultivar, Matrera se destaca con un aumento considerable de SA en la parte aérea y raíces (Figura 17c y f), sugiriendo que este cultivar podría depender en gran medida del SA para modular las respuestas frente al estrés oxidativo y fortalecer sus defensas bajo condiciones de anegamiento. En contraste, aunque el cultivar Vaquera muestra una importante expresión de *ICS* en raíz (233 veces mayor expresión de *ICS*, Figuras 16h y 17f), su contenido de SA en la parte aérea no muestra variación (Figura 17c). Este resultado podría indicar que su estrategia de adaptación involucra principalmente la acumulación localizada de SA en la raíz, permitiéndole responder al anegamiento con cambios específicos en su estructura radicular. La ausencia de cambios significativos en el contenido de SA en la parte aérea de plantas del cultivar Vaquera, a diferencia de los otros dos cultivares evaluados en esta Tesis, también podría sugerir una estrategia de optimización de recursos ante el estrés prolongado, donde priorizaría las respuestas radiculares tendientes a mejorar la resistencia y capacidad de recuperación en ambientes saturados de agua. Esto refleja una variabilidad en las estrategias adaptativas entre cultivares, lo que podría contribuir a seleccionar variedades con respuestas más efectivas a las condiciones de anegamiento.

En este estudio, también se analizaron las concentraciones de otras hormonas vegetales de importancia como auxinas (IAA), citoquininas (kinetina) y giberelinas (Figura 18). Estas fueron reportadas como fundamentales en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal (Mok, 2019; Yamaguchi, 2008; Zhao, 2010), donde controlan procesos como la elongación celular, división celular y diferenciación de tejidos, manteniendo un equilibrio entre el crecimiento vegetativo y reproductivo en condiciones normales de crecimiento. Sin embargo, en respuesta a estrés abiótico, como el anegamiento, las plantas suelen priorizar mecanismos de supervivencia

que podrían implicar mecanismos de regulación en otras vías hormonales, como las de ABA y etileno (Martínez Callejón, 2018), relegando a las auxinas, citoquininas y giberelinas a un rol secundario o modulador. Al evaluar su contenido en los cultivares de alfalfa bajo estudio, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de IAA y KIN (Figura 18a, b, d y e) entre las plantas control y las sometidas a anegamiento, lo que sugiere que la participación de estas hormonas en la respuesta al estrés por anegamiento es imperceptible o se mantiene en niveles basales.

En el caso de Matrera, el aumento observado de GA3 en tejido aéreo (Figura 18c) podría reflejar la activación de vías de elongación celular, lo cual, aunque en algunos casos puede permitir el escape para emerger de la inundación, podría también conducir a un gasto energético elevado que resulta en la pérdida de biomasa (Figura 12a y c). En este sentido, las giberelinas suelen estar implicadas en la elongación celular y el crecimiento en condiciones de cultivo normal (Castro-Camba et al., 2022), pero su reducción en tejidos específicos, como el observado en raíces de plantas del cultivar Vaquera (Figura 18f), sugiere un ajuste de este genotipo para reducir el gasto energético en condiciones de anegamiento. Esto podría permitirle a las plantas de este cultivar redirigir recursos hacia otros procesos metabólicos que mejoren su tolerancia sin comprometer el desarrollo radicular. Asimismo, aunque hay una menor cantidad de GA3, las plantas del cultivar Vaquera podrían estar priorizando mantener la funcionalidad de sus raíces para absorber oxígeno y nutrientes en el entorno anegado, sin necesariamente estar alterando la estructura física. También, podría haber un rol compensatorio de otras hormonas, por ejemplo, el nivel de JA elevado observado en raíces de plantas del cultivar Vaquera bajo estrés (Figura 17e), podría estar promoviendo mecanismos para inducir la resistencia estructural y fisiológica frente al anegamiento (Kazán, 2015), permitiendo que las raíces mantengan su forma y tamaño. La falta de cambios en la longitud y área de las raíces en Vaquera (Figura 13) sugiere una adaptación que permitiría a la planta mantener su estructura radicular sin necesidad de invertir en un crecimiento extra. En este sentido, al reducir las giberelinas, las plantas del cultivar Vaquera podrían estar evitando el estímulo innecesario de elongación radicular en un ambiente en el que el crecimiento adicional no necesariamente confiere una ventaja, especialmente si la planta dirige su respuesta a generar estabilidad y eficiencia metabólica.

A medida que las fluctuaciones climáticas y eventos de exceso hídrico se vuelven más frecuentes y severos, es indispensable identificar y favorecer el cultivo de aquellos cultivares que

presenten respuestas fisiológicas y bioquímicas eficientes. La comprensión de estas respuestas no solo mejora el conocimiento fundamental sobre la tolerancia al estrés hídrico, sino que además es clave para implementar estrategias agrícolas adaptativas, contribuyendo a la sostenibilidad en zonas susceptibles a inundaciones. Este enfoque, además, remarca la importancia de la alfalfa como un recurso valioso en los sistemas agrícolas actuales, que demanda cultivos con mayor resiliencia para hacer frente a los desafíos climáticos emergentes.

En síntesis, los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que la capacidad para formar aerénquima y mantener la estabilidad en los niveles hormonales en las partes aéreas bajo condiciones de anegamiento podría estar relacionada con la mayor tolerancia al estrés hídrico observado en plantas del cultivar Vaquera. Estos mecanismos de adaptación, mediados por el etileno, permiten que las plantas de este cultivar toleren mejor la hipoxia y minimicen los daños en comparación con los observados en plantas de cultivares más sensibles como es el caso de Matrera.

Como conclusiones, podemos mencionar que:

- El cultivar Vaquera destaca por mantener su peso fresco (PF) y seco (PS) aéreo y de raíz bajo estrés, mientras que Matrera sufre una reducción significativa en ambos parámetros.
- Las plantas del cultivar Vaquera muestran la formación de aerénquima, un tejido especializado que ayuda a tolerar condiciones de hipoxia, mientras que Matrera y Monarca no muestran esta adaptación morfológica. Esto es clave para la resistencia al anegamiento en plantas del cultivar Vaquera.
- Las plantas de los cultivares Monarca y Vaquera reducen significativamente su producción de ceras epicuticulares durante el anegamiento, lo que favorece la permeabilidad de la cutícula.
- En términos de respuestas hormonales, las plantas del cultivar Vaquera destacan por un aumento significativo en la expresión del gen codificante para la ACC oxidasa en raíces, lo que podría estar ligado a la formación de estructuras adaptativas como el aerénquima.

Estos hallazgos destacan la importancia de optimizar la regulación hormonal, la respuesta antioxidante y la adaptación morfológica de las raíces en alfalfa para enfrentar el anegamiento, promoviendo cultivares más resilientes y sostenibles frente a fenómenos climáticos extremos.

3.1) Introducción

En el presente capítulo, se llevó a cabo la caracterización de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* expresantes del gen *MsMDHAR*, codificante para la enzima monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) de alfalfa. La selección de este gen se llevó a cabo en base a análisis transcriptómicos y proteómicos previamente publicados (Zeng et al., 2019), los cuales indicaron su posible rol en la tolerancia al estrés hídrico. Además, investigaciones bibliográficas han destacado la importancia de la MDHAR en otras especies (Großkinsky et al., 2020; Yeh et al., 2019), sugiriendo una implicancia en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en la mejora de la tolerancia al estrés oxidativo. Esta evidencia proporcionó una base sólida para explorar su potencial en la mejora genética de cultivos como la alfalfa, particularmente en contextos de estrés hídrico.

La enzima monodehidroascorbato reductasa es una de las enzimas claves del ciclo del ascorbato-glutatión (AsA-GSH). Este ciclo desempeña un papel clave en la adaptación de las plantas vasculares a varios tipos de estrés ambiental al eliminar y detoxificar las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas durante el estrés (Hasanuzzaman et al., 2012). La vía produce y recicla antioxidantes como AsA y GSH, que neutralizan los ROS y previenen el daño oxidativo (Pandey et al., 2015). Además, ayuda en la síntesis de componentes de la pared celular y participa en la biosíntesis de fitohormonas esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Chen et al., 2006).

Para sintetizar estos antioxidantes, la vía AsA-GSH requiere de cuatro enzimas: ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR) (Pandey et al., 2015). La enzima MDHAR juega un papel esencial en esta vía al regenerar el AsA (Gallie, 2013), lo que previene el daño oxidativo y mantiene el equilibrio celular. Durante períodos de estrés oxidativo, el AsA puede oxidarse formando monodehidroascorbato (MDHA), una molécula relativamente inestable que puede reaccionar con componentes celulares y causar daño oxidativo (Li et al., 2020). Esta molécula puede dismutar rápidamente a dehidroascorbato (DHA) o a AsA mediante una reacción espontánea o catalizada por la enzima monodehidroascorbato reductasa (MDHAR; Foyer &

Noctor, 2011). La MDHAR cataliza la reducción de MDHA previniendo así el desequilibrio redox celular (Nahar et al., 2017). El esquema del ciclo puede observarse en la Figura Suplementaria 2.

Estudios han demostrado que la actividad de la MDHAR es esencial para el desarrollo adecuado de las plantas, incluyendo el crecimiento de plántulas, el desarrollo de raíces y el avance hacia la etapa reproductiva (Barba-Espin et al., 2010; Truffault et al., 2016). Además, se observó que la expresión y actividad de esta enzima aumenta en respuesta a diferentes tipos de estrés, tales como sequía, salinidad y alta luminosidad, entre otros (Kavitha et al., 2010), sugiriendo un papel crucial en la adaptación de las plantas a condiciones ambientales adversas (Gallie, 2013). Investigaciones previas han sugerido que niveles más altos de AsA asociados con la sobreexpresión del gen *MDHAR* podrían generar plantas con tolerancia al estrés abiótico (Eltayeb et al., 2007), particularmente durante el estrés salino y estrés por frío (Shin et al., 2013; Sultana et al., 2012). Sin embargo, hay poca información disponible sobre el papel de la MDHAR (y los niveles de AsA) en la tolerancia al estrés hídrico.

En este capítulo, se investigó la participación del gen *MsMDHAR* en los procesos de tolerancia al estrés hídrico (inundación y sequía) mediante su expresión constitutiva en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Asumiendo que la mayoría de los procesos básicos están conservados en plantas dicotiledóneas, se utilizó este sistema heterólogo para evaluar la aplicación potencial de la *MsMDHAR* como herramienta biotecnológica. Los resultados aquí encontrados sugieren una relación entre *MsMDHAR* y el nivel de ascorbato en plantas de *arabidopsis*. Así mismo, se observó una asociación de la alta expresión de *MsMDHAR* con una mayor tolerancia al estrés hídrico por parte de las plantas transgénicas sumado a un mayor desarrollo de raíces de los eventos conteniendo el gen de alfalfa. Finalmente, se destaca el aumento en la producción de semillas y biomasa por parte de plantas transgénicas de *MsMDHAR* bajo diferentes condiciones de crecimiento. En resumen, los datos encontrados son de gran relevancia y resultan prometedores para futuros programas de mejoramiento de la alfalfa.

3.2) Materiales y métodos

3.2.1) Construcción genética

A partir de plantas de alfalfa cultivadas en condiciones normales, se extrajo el ARN total utilizando TRIzol (Thermo Scientific). El ARN resultante se retro-transcribió a ADNc utilizando la enzima transcriptasa reversa (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV, Trans) y oligo dT, siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego, se realizó una PCR utilizando oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *MsMDHAR* (*MsMDHARF* y *MsMDHARR*, ver secuencias en material suplementario). El material genético amplificado fue purificado, digerido con las enzimas de restricción *XbaI* y *SalI* (Promega), e insertado en el plásmido pCHF3 (Jarvis et al., 1998), el cual fue previamente cortado con las mismas enzimas. El constructo fue entonces transformado en la cepa de *Escherichia coli* DH5 α y, una vez obtenidos clones positivos y confirmados por secuenciación, se procedió a la transformación de la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* con el mismo plásmido (Hofgen & Willmitzer, 1988).

3.2.2) Transformación e identificación de plantas modificadas

Las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) se obtuvieron utilizando el método de inmersión floral (Clough & Bent, 1998). La selección de plantas transformadas se basó en su resistencia a kanamicina, y se realizó una PCR utilizando ADN genómico (extraído siguiendo el protocolo de Doyle & Doyle, 1990) y los oligonucleótidos *MsMDHARF* y *MsMDHARR* (descritos anteriormente) para verificar la inserción. Como control, se obtuvieron de manera similar, plantas transformadas con el vector pCHF3 vacío. En todos los casos, se examinaron tres eventos homocigotas independientes (T3). Estos eventos fueron identificados como *MsMDHAR-3*, *MsMDHAR-9* y *MsMDHAR-14*. Para simplificar la nomenclatura, el vector vacío se denominó como tipo salvaje (WT) en el texto.

3.2.3) Determinación de ascorbato y dehidroascorbato

Se utilizó el método de Gillespie & Ainsworth (2007) con modificaciones. Brevemente, se recolectó material vegetal (20 mg) en tubos y el tejido se homogeneizó con nitrógeno líquido usando un mortero previamente enfriado. Se añadió 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 6% (Sigma-Aldrich) y se transfirió a un microtubo de 1,5 ml. Las muestras se centrifugaron (13.000 g durante 5 minutos a 4 °C) y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml. Los extractos se almacenaron en hielo y el ensayo comenzó de inmediato para evitar la degradación del ácido ascórbico. Resumidamente, se añadieron 10 µl de buffer fosfato 75 mM (pH=7,0) a todos los tubos. Luego, se agregaron 20 µl de TCA al 6% a los tubos considerados blancos de reacción y 20 µl de estándares de ácido L-ascórbico (AsA, Sigma Aldrich; 0,15–10 mM) o muestra a los tubos a ensayar. Luego se añadieron 10 µl de ditioneitol (DTT, Sigma-Aldrich) 10 mM a los tubos de AsA total (AsA+DHA) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente se añadieron 10 µl de N-Etilmaleimida (NEM, Sigma-Aldrich) al 0,5% a los tubos de AsA total para eliminar el exceso de DTT. Posteriormente, se añadieron 20 µl de agua a los tubos de AsA reducido para equilibrar el volumen de todos los tubos. Finalmente, se añadieron 50 µl de TCA al 10%, 40 µl de H₃PO₄ al 43%, 40 µl de 2,2'-bipiridilo al 4% y 20 µl de FeCl₃ al 3% a todos los tubos. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 1 hora y luego se determinó la absorbancia a 525 nm en un lector de microplacas SPECTROstar Nano (BMG Labtech). El procedimiento descrito anteriormente se resume en la Tabla 1. La cantidad de AsA total y reducido se calculó usando la ecuación de regresión entre los estándares de AsA y A525 de la siguiente manera:

$$\text{nmol AsA/well} = [(A525 - \text{Ordenada al origen}) / \text{pendiente}]$$

El AsA oxidado (Dehidroascorbato, DHA) se calculó como la diferencia entre el total y el reducido. Se utilizaron 5 réplicas biológicas por línea analizada.

	AsA		AsA+ DHA	
Componentes	test	blanco	test	blanco

fer fosfato 75 mM (pH=7)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
stándar/muestra	20 µl	-	20 µl	-
TCA 6%	-	20 µl	-	20 µl
DTT 10 mM	-	-	10 µl	10 µl
NEM 0,5%	-	-	10 µl	10 µl
Agua	20 µl	20 µl	-	-
TCA 10%	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
H ₃ PO ₄ 43%	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl
2'-bipiridilo 4%	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl
FeCl ₃ 3%	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Volumen total	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Tabla 1. Resumen del protocolo de determinación de AsA y DHA en plantas de arabidopsis expresantes del gen MsMDHAR. Se siguió la metodología de Gillespie & Ainsworth (2007) con modificaciones. El ensayo se basa en la reducción del Fe⁺³ a Fe⁺² por AsA y la detección espectrofotométrica de Fe⁺² acomplexado con el 2,2'-dipiridilo.

3.2.4) Ensayos de estrés abiótico

Las semillas de arabidopsis (eventos transgénicos MsMDHAR-3, MsMDHAR-9 y MsMDHAR-14 y WT) se sembraron en placas de Petri conteniendo medio MS-agar al 50% (Duchefa Biochemie) y se transfirieron a una cámara de crecimiento para la germinación y crecimiento de plántulas. Luego de la aparición de la primera hoja verdadera, las plántulas se trasladaron a un invernadero con ambiente controlado (22°C, humedad relativa 65-70%, fotoperiodo 14:10 (luz/oscuridad) e intensidad lumínica 220-250 µmol m⁻² s⁻¹; Gasperl et al.,

2021) donde se trasplantaron a macetas de 15 cm de diámetro con un volumen de 0,43 litros, conteniendo una mezcla de turba y vermiculita (3:1).

Las plantas se sometieron a tres condiciones de riego: sequía, anegamiento y riego normal, con 14 réplicas por tratamiento. Para realizar el ensayo de estrés por anegamiento, las macetas se cubrieron con agua hasta el borde del sustrato colocándolas en bandejas de plástico durante 14 días. Para simular el estrés por sequía, se suspendió el riego durante 14 días y se consideró que el estrés comenzó cuando el peso de las macetas más la planta fue constante. El estrés hídrico se aplicó cuando las plantas estaban en el estadio fenológico 1,06-1,08 (Boyes et al., 2001) y, por lo tanto, aún en la etapa vegetativa. Después de los tratamientos, las plantas se distribuyeron aleatoriamente en el invernadero. Catorce días después de que comenzó el estrés, se tomaron muestras de hojas de diez replicados biológicos de cada línea bajo cada condición para análisis molecular. Al final del tratamiento de estrés, las plantas se sometieron a condiciones de riego normales hasta el final del ciclo de crecimiento. Al final del ciclo de vida, se determinaron variables agronómicas de interés como peso seco de la roseta e inflorescencia, así como el rendimiento y número de semillas.

3.2.5) Fenotipado de raíces

Las semillas de las líneas transgénicas y WT se sembraron en medio MS-agar al 50% (Duchefa Biochemie) y se cultivaron en una cámara de ambiente controlado (Fitoclima PLH, Aralab) a 22 °C, $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidad de flujo de fotones, período de 14/10 h día/noche y con 65-70% de humedad relativa durante 7 días hasta la aparición de la primera hoja verdadera. Luego se transfirieron a placas verticales que contenían medio MS-agar al 50% y se incubaron hasta los 12-15 días de edad para evaluar el desarrollo de las raíces. El estrés osmótico se indujo añadiendo 250 mM de manitol al medio MS en las placas verticales. Las placas se digitalizaron utilizando un escáner Epson GT-1500, se procesaron con ImageJ Fiji (<https://fiji.sc/>) y se analizaron utilizando RhizoVision Explorer (Seethepalli & York, 2020). El ensayo fue replicado tres veces, con 8 réplicas biológicas por cada evento y condición.

3.2.6) Determinación de ceras

Las plantas de las tres líneas transgénicas independientes y del vector vacío se cultivaron en macetas con sustrato y en una cámara de crecimiento con las condiciones descritas anteriormente. Las plantas se sometieron a tres condiciones de riego: sequía, anegamiento y riego normal (como fue detallado previamente). En el momento de la aparición del botón floral, se extrajeron las ceras epicuticulares siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el punto 1.2.5. Las hojas completamente expandidas se colocaron sobre una hoja de papel para determinar el área total utilizando Fiji ImageJ. Se expresó el resultado como cantidad de ceras por unidad de área foliar. Se utilizaron 5 réplicas biológicas por cada genotipo y tratamiento evaluado.

3.2.7) Conteo de estomas

El conteo de estomas se realizó siguiendo el método descrito por Gudesblat et al. (2007). Las plantas se cultivaron bajo condiciones de sequía, anegamiento y riego normal como se especificó anteriormente. Se eligieron al azar dos hojas de roseta de cinco plantas de cada línea, resultando en un total de 10 hojas por evento transgénico o plantas WT, por condición. Las hojas se fijaron en un portaobjetos de vidrio utilizando cinta adhesiva de doble cara transparente (3M). El mesófilo se eliminó raspándolo con una hoja de bisturí y una solución 1:1 de hipoclorito de sodio, asegurando que la epidermis abaxial permaneciera adherida a la cinta. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua y se examinaron bajo un microscopio Leica M205 FAC con un aumento total de 400X. Al localizar los estomas y células epidérmicas, se tomaron fotografías con una cámara digital Canon EOS REBEL T2. Se seleccionaron cuatro zonas al azar para cada impresión y se realizaron conteos de estomas cerrados y abiertos.

3.2.8) Contenido de clorofila *a*

La clorofila *a* se extrajo con acetona y se cuantificó espectrofotométricamente como se informó previamente (Jaime et al., 2020). Las plantas transgénicas y WT se cultivaron bajo condiciones normales durante 3 semanas. Luego, se sometieron a dos condiciones de estrés: algunas se anegaron durante 14 días, mientras que otras se sometieron a sequía hasta el 30% de la capacidad de campo. Cada condición estuvo acompañada de plantas con riego normal como

control. Se seleccionaron al azar cinco plantas de cada genotipo y cada condición de riego para el análisis. Se extrajo una hoja de roseta de cada planta, se pesó y se utilizó para la determinación de pigmentos. El material foliar se homogeneizó con nitrógeno líquido y se incubó a 4 °C en acetona al 90% (v/v) durante 18 horas en la oscuridad. Luego, las muestras se centrifugaron a 1.000 g durante 5 minutos. Se midió la absorbancia a 646, 663 y 750 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (Hitachi U2000). La estimación de la clorofila *a* se realizó utilizando los coeficientes de extinción y ecuaciones determinadas previamente por Wellburn (1994).

3.2.9) Medición del contenido relativo de agua

El contenido relativo de agua (CRA) foliar se determinó utilizando plantas de 3 semanas de edad cultivadas bajo sequía, anegamiento y riego normal como se describió en 4.2.8. Se seleccionaron al azar cinco plantas de cada línea transgénica así como del WT y se tomó una hoja de roseta de cada planta para su determinación. Las hojas se pesaron individualmente (peso fresco, PF) y se sumergieron en agua destilada durante 18 horas para saturación. Luego, las hojas se pesaron (peso turgente, PT) después de eliminar el exceso de agua colocándolas sobre toallas de papel. Posteriormente, las hojas se secaron a 70 °C hasta un peso constante (peso seco, PS). El RWC se calculó utilizando la ecuación reportada por Smart & Bingham (1974):

$$\text{CRA} = \frac{(\text{PT} - \text{PS})}{(\text{PF} - \text{PS})} \times 100$$

3.2.10) Determinación de ROS

La producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se detectó utilizando 3,3-diaminobencidina (DAB; Sigma Aldrich) como se describió previamente (Jaime et al., 2020). Se utilizaron plantas de 3 semanas de edad cultivadas bajo sequía, anegamiento y riego normal como se describió en los puntos anteriores. Se seleccionaron al azar tres plantas de cada línea transgénica así como del WT y se tomaron dos hojas de roseta de cada planta para su determinación. Las hojas se incubaron cubiertas con una solución de DAB (1 mg/ml (v/v)) en tubos de plástico y se incubaron durante 18 horas en la oscuridad. Luego, las hojas se decoloraron por inmersión en etanol al 96% (v/v) y se incubaron a 37 °C. Se montaron y

visualizaron cinco fragmentos de cada hoja utilizando un microscopio de fluorescencia (Leica M205 FAC) con un aumento óptico de 40X. Las imágenes obtenidas se analizaron y procesaron utilizando ImageJ Fiji. Se utilizaron cinco fotografías seleccionadas al azar de plantas individuales para cada análisis. Las áreas teñidas se identificaron utilizando la función de umbral normalizado y se procesaron utilizando el vector H DAB del plugin de deconvolución de color en ImageJ Fiji. Se analizó el canal correspondiente a R:0.26814753; G:0.57031375; B:0.77642715.

3.2.11) Cuantificación del nivel de expresión génica

La extracción de ARN total de las hojas de cada una de las líneas analizadas se realizó bajo condiciones normales utilizando el reactivo TRIzol (TRIzol, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de qPCR se llevó a cabo utilizando un termociclador AriaMx Real-Time PCR System. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 μ l, utilizando el PerfectStart Green qPCR Master Mix (TransGen Biotech), 200 ng de ADNc como molde y oligonucleótidos específicos para la amplificación de un fragmento del gen que codifica para la MsMDHAR (q-MsMDHAR-F y q-MsMDHAR-R; ver secuencias en material suplementario). Para los controles de expresión basal, se utilizaron oligonucleótidos específicos para el gen de actina de *Arabidopsis thaliana* (Charrier et al., 2002) (q-AtACTIN-F y q-AtACTIN-R; ver secuencias en material suplementario).

3.2.12) Análisis estadístico

Para testear el supuesto de normalidad, se utilizó la prueba de Shapiro–Wilks (Field, 2013). La prueba de Levene para la igualdad de varianzas se utilizó para probar la suposición de homogeneidad de varianza (Field, 2013). Después de verificar que los datos cumplieran con estos supuestos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías (según necesario) seguido de una prueba de Tukey para identificar diferencias entre los tratamientos. Todo el análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico R (R Core Team, 2021).

3.3) Resultados

3.3.1) Análisis molecular de eventos de *Arabidopsis thaliana* expresantes de *MsMDHAR*

Con la finalidad de comprender la función de la MDHAR de la alfalfa durante los procesos de estrés abiótico, se empleó un sistema heterólogo de plantas de *Arabidopsis thaliana* con expresión constitutiva del gen. Con este propósito, se aisló la secuencia codificante de la *MsMDHAR* (JN979555.1) de plantas de alfalfa y se clonó, dirigida por el promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S (35SCaMV), en el plásmido pCHF3 (Jarvis et al., 1998). Posteriormente, esta construcción se utilizó para transformar plantas de arabis. Las plantas homocigotas de la tercer filial (T3) se genotipificaron para detectar la presencia de secuencias de *MsMDHAR* (Figura 19a).

Luego se procedió a cuantificar los niveles de expresión del gen mediante PCR en tiempo real. Como se observa en la Figura 19b, al analizar plantas de los eventos transgénicos 3, 9 y 14 que expresan *MsMDHAR*, se observó que *MsMDHAR*-9 exhibía un alto nivel de expresión del gen, mostrando 46,97 veces más expresión que *MsMDHAR*-3, mientras que *MsMDHAR*-14 exhibía un bajo nivel de expresión, mostrando 1,28 veces más expresión que *MsMDHAR*-3. En este sentido, *MsMDHAR*-3 y *MsMDHAR*-14 se definieron como eventos de baja expresión.

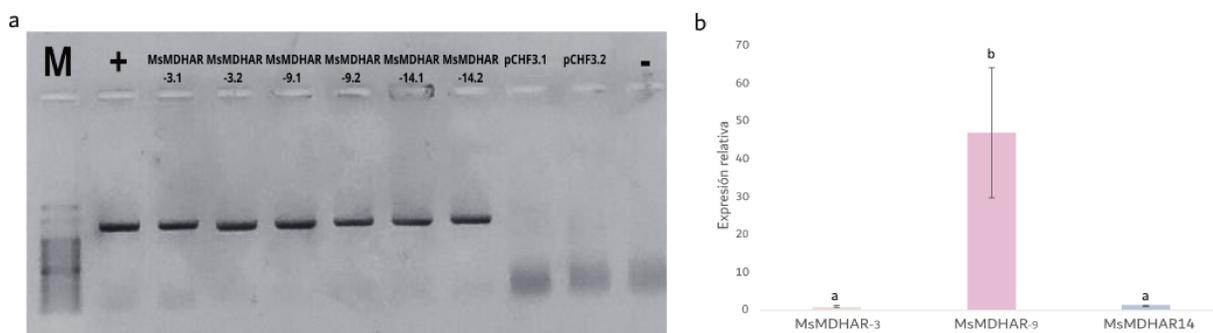


Figura 19. Análisis molecular de las plantas transgénicas. a. Genotipificación de *MsMDHAR* mediante PCR a partir de ADN genómico de plantas transformadas. Se extrajo ADN genómico total (10 µg) del vector vacío (pCHF3) y de tres líneas transgénicas independientes. La extracción de ADN y los experimentos de PCR se realizaron a partir de duplicados biológicos. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (M). "+" corresponde al control positivo (gen *MsMDHAR* purificado) y "-" indica el control negativo (mezcla de PCR sin molde de ADN). b. Niveles de expresión de *MsMDHAR* en eventos

de arabidopsis. Se utilizó ADNc extraído a partir de hojas de líneas MsMDHAR-3, MsMDHAR-9 y MsMDHAR-14 cultivadas en condiciones normales para detectar la expresión de *MsMDHAR* mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados se calcularon en relación con la línea transgénica MsMDHAR-3 (expresión = 1) utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los niveles de transcripción se determinaron utilizando tres réplicas y se normalizaron utilizando el gen de actina de arabidopsis.

3.3.2) Análisis metabólico

Para analizar indirectamente la actividad de la MDHAR, se determinaron los niveles de AsA y DHA en plantas transgénicas de arabidopsis bajo condiciones normales de crecimiento. Se observó que las plantas del evento MsMDHAR-9 tenían un nivel significativamente mayor de AsA ($18,07 \pm 1,24$ nmol/pocillo) en comparación con las plantas con vector vacío (10 ± 2 nmol/pocillo; Figura 20). Por otro lado, como era de esperar, las plantas que expresaban MsMDHAR-9 mostraron niveles significativamente más bajos de DHA ($3,84 \pm 0,29$ nmol/pocillo) en comparación con las plantas control ($7,43 \pm 2,14$ nmol/pocillo). Al analizar los eventos MsMDHAR-3 y MsMDHAR-14, no se observaron diferencias significativas en los niveles de AsA en comparación con las plantas con vector vacío, lo que indica que un alto nivel de expresión de *MsMDHAR* puede ser necesario para un aumento marcado en el nivel de AsA.

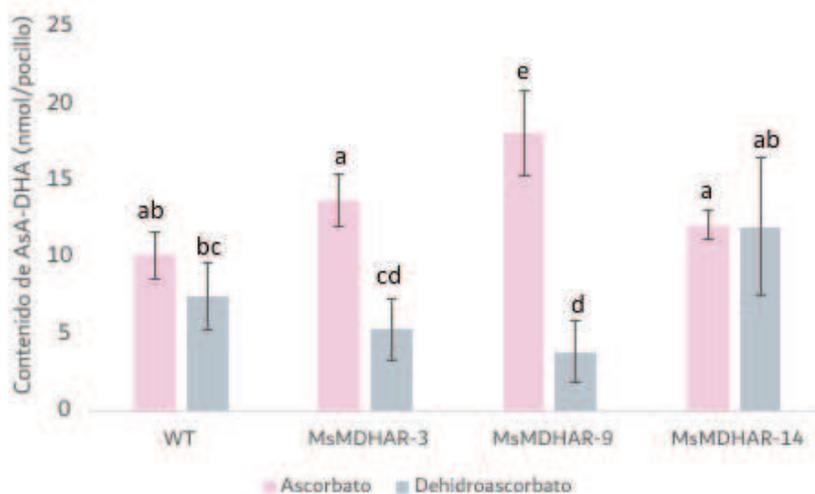


Figura 20. Análisis de la actividad de MsMDHAR. Cuantificación de los niveles de AsA y DHA en plantas transgénicas de arabidopsis crecidas bajo condiciones normales de riego. El procedimiento para la

cuantificación de AsA y DHA se resume en la Tabla 1. Se representan los valores promedio con barras de error que indican la desviación estándar. Se utilizaron 5 réplicas biológicas por evento en cada experimento. A su vez, cada experimento se repitió tres veces con resultados similares. Letras diferentes sobre los histogramas (a, b, c, d, e) denotan diferencias significativas entre las líneas ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey).

3.3.3) Evaluación de plantas transgénicas MsMDHAR sometidas a estrés hídrico

Para comprender la función de MsMDHAR durante los procesos de estrés hídrico causados por sequía y anegamiento, se estudió su influencia en la tolerancia de arabis a estos estreses en términos de crecimiento vegetativo y reproductivo (Figura 21). Con este propósito, se analizaron las plantas transgénicas MsMDHAR-3, -9 y -14 luego de 14 días de sequía o 14 días de anegamiento. Posteriormente, se permitió la recuperación mediante riego normal hasta el final del ciclo de la planta, luego del cual, se procedió a la medición del peso seco (PS) de las hojas de roseta y de la inflorescencia, y la determinación del peso y número de semillas (Figura 21a, 21b, 21c y 21d). Los resultados obtenidos de la determinación del PS de las hojas en roseta y la inflorescencia durante los tratamientos de estrés hídrico mostraron una tendencia positiva para las plantas del evento MsMDHAR-9 en comparación con las plantas WT (Figura 21a y 21b).

Específicamente, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en el PS de roseta durante sequía y anegamiento en las plantas MsMDHAR-9, con aumentos del 113% y 220%, respectivamente, en comparación con las plantas WT (Figura 21a). En cuanto al PS de la inflorescencia, se notó un aumento del 174% durante la sequía y del 377% durante el anegamiento al comparar plantas transgénicas MsMDHAR-9 con las salvajes (Figura 21b). Por otro lado, se determinó que el rendimiento de semillas en las plantas MsMDHAR-9 fue significativamente ($p < 0,05$) mayor tanto en condiciones de crecimiento normales como en los tratamientos de sequía y anegamiento (Figura 21c), con aumentos del 75%, 96% y 77%, respectivamente, en comparación con las plantas con el vector vacío. Mientras tanto, al comparar las plantas MsMDHAR-3 y MsMDHAR-14 con las plantas WT, no se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) en el rendimiento de semillas en condiciones normales y de sequía (Figura 21c). Sin embargo, sí se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) del 52% en el

rendimiento de semillas en las plantas transgénicas MsMDHAR-3 bajo tratamiento de anegamiento en comparación con las plantas WT (Figura 21c).

En cuanto al número promedio de semillas por planta, también mostró una tendencia positiva para las plantas transgénicas de arabidopsis MsMDHAR-9 en comparación con las plantas WT (Figura 21d). Específicamente, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en el número de semillas producidas durante las condiciones de crecimiento normales y sequía en las plantas MsMDHAR-9, con aumentos del 71% y 117%, respectivamente, en comparación con las plantas WT (Figura 21d). Al analizar las plantas transgénicas MsMDHAR-14 sometidas a sequía, anegamiento y riego normal, no se observaron diferencias significativas en el peso seco de la hoja en roseta y la inflorescencia ni en el peso y número de semillas en ninguno de los tratamientos (Figura 21), excepto por el peso seco de la roseta en plantas anegadas, donde se observó un aumento de peso en relación con las plantas WT (Figura 21a).

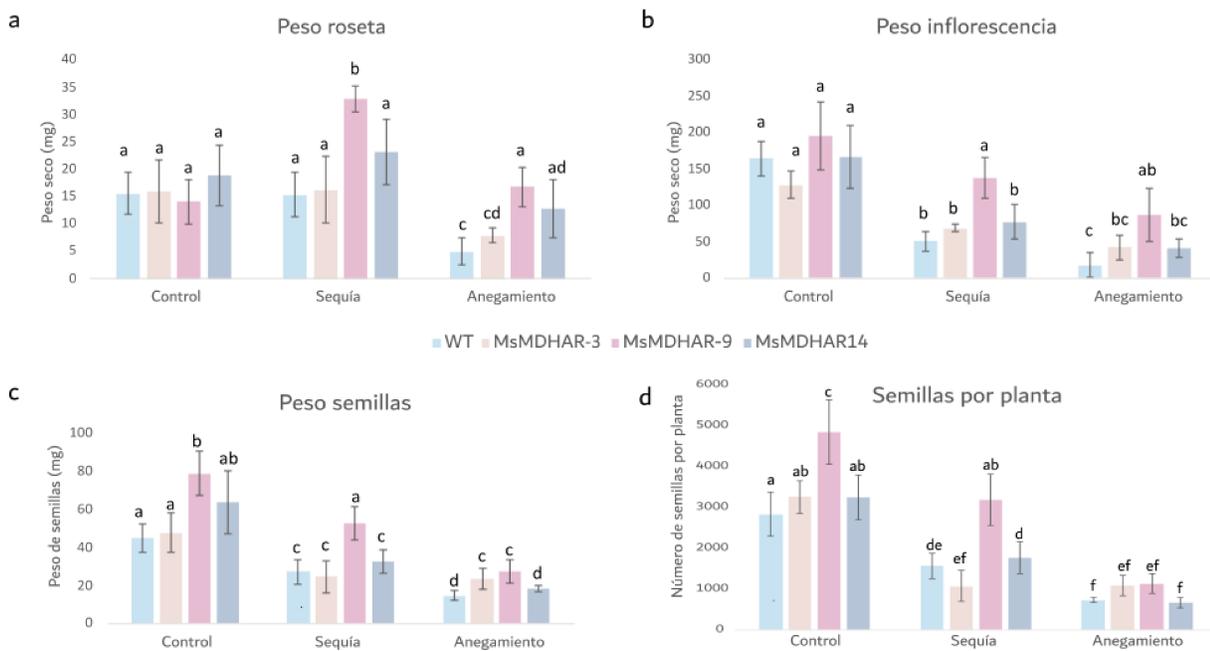


Figura 21. Desarrollo de la biomasa aérea bajo condiciones de estrés hídrico. a. Determinación del peso seco (PS) de las hojas de roseta. b. PS de la inflorescencia. c. Rendimiento de semillas. d. Número de semillas en plantas transgénicas (MsMDHAR-3, MsMDHAR-9 y MsMDHAR-14) y plantas WT de arabidopsis durante condiciones normales de crecimiento (control), sequía y anegamiento. Se realizaron catorce réplicas por tratamiento y genotipo, sometidas a diferentes condiciones de riego durante 14 días

antes de las determinaciones. El estrés hídrico se aplicó cuando las plantas estaban en la etapa vegetativa. Al final del ciclo de vida, se determinaron el peso seco de la roseta y la inflorescencia, el rendimiento de semillas y el número de semillas. Las barras de error indican la desviación estándar (DE). Las diferentes letras sobre los histogramas (a, b, c, d, e, f) indican diferencias significativas entre las líneas ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey).

3.3.4) Estudio del desarrollo de raíces en condiciones normales y de sequía

En condiciones de crecimiento normales, las plantas que expresan *MsMDHAR* (*MsMDHAR-3*, *MsMDHAR-9* y *MsMDHAR-14*) mostraron una mayor área de cobertura de raíces y biomasa radicular (Figura 22), lo que sugiere un efecto positivo de *MsMDHAR* en el desarrollo de raíces. Al analizar la biomasa seca de las raíces, se observó un peso de $2,0 \pm 0,13$ mg para las plantas con el vector vacío WT, mientras que las raíces de las plantas transgénicas que expresan *MsMDHAR-3* mostraron un peso promedio de $3,50 \pm 0,05$ mg. Las líneas *MsMDHAR-9* evidenciaron un peso de $3,0 \pm 0,6$ mg y las *MsMDHAR-14* un peso de $2,13 \pm 0,40$ mg (Figura 22b).

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) al analizar el área total de la raíz ocupada por las plantas transgénicas en comparación con el vector vacío WT ($0,83 \pm 0,18$ cm², Figura 22c). En este caso, el área de la raíz fue de $1,44 \pm 0,30$ cm² para *MsMDHAR-3*, de $1,58 \pm 0,36$ cm² para *MsMDHAR-9* y de $1,30 \pm 0,27$ cm² para *MsMDHAR-14* (Figura 22c). Finalmente, al analizar el largo total de la raíz principal, no se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) entre las plantas transgénicas y las plantas con el vector vacío WT (Figura 22d).

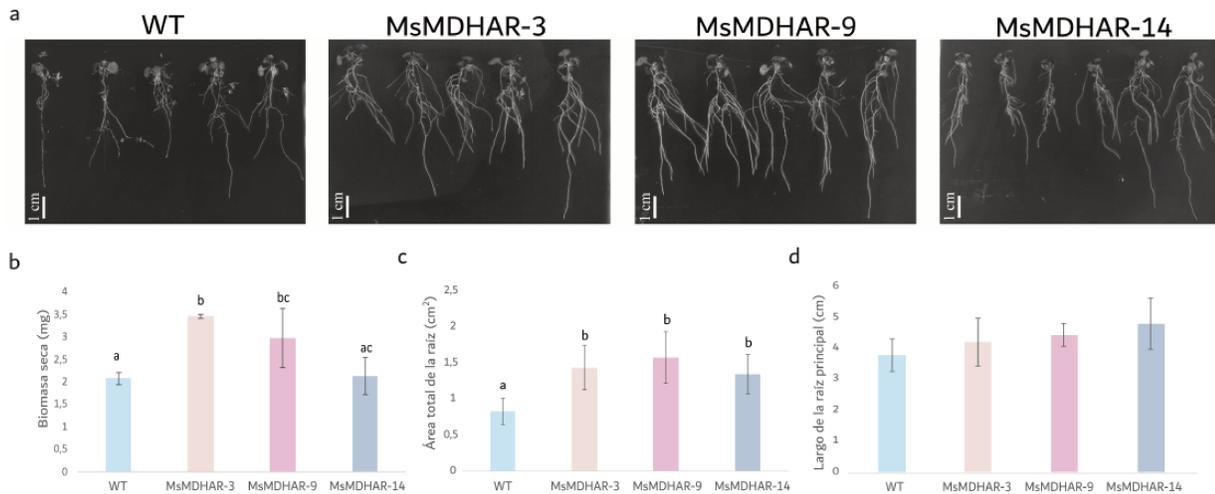


Figura 22. Análisis in vitro de raíces transgénicas de arabisopsis MsMDHAR bajo condiciones de crecimiento normales. a. Imagen representativa de raíces de plántulas de 12 días. b. Peso seco de la raíz. c. Área total de la raíz. d. Longitud de la raíz principal de plantas de arabisopsis WT y transgénicas, cultivadas en placas verticales con medio MS. Las plántulas se cultivaron en placas horizontales durante 7 días y luego verticalmente durante 5 días en medio MS al 50% con 1,2% de agar e incubadas a 22 °C, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 14/10 h día/noche. Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes, cada uno con 8 réplicas biológicas por cada evento. Las fotografías fueron analizadas utilizando RhizoVision Explorer. Las barras de error indican DE. Letras diferentes sobre los histogramas (a, b, c) indican diferencias significativas entre líneas ($p < 0,05$, ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey). Los gráficos sin letras por encima de las barras indican que los tratamientos no son estadísticamente diferentes.

Cuando se analizó el PS, la longitud y el área de las raíces durante el estrés por sequía (inducido por la suplementación con 250 mM de manitol), las plantas de arabisopsis transgénicas que expresaban *MsMDHAR* mostraron valores significativamente más altos ($p < 0,05$) en comparación con las plantas con el vector vacío (Figura 23). Específicamente, se observó un peso de $0,58 \pm 0,09$ mg para las plantas WT, mientras que las raíces de MsMDHAR-3, -9 y -14 tenían un peso de $1,30 \pm 0,22$ mg, $1,36 \pm 0,15$ mg y $1,55 \pm 0,07$ mg, respectivamente (Figura 23b). Además, las raíces de las plantas MsMDHAR-3 desarrollaron un área de $0,35 \pm 0,04$ cm², las MsMDHAR-9 ocuparon un área de $0,42 \pm 0,09$ cm² y las plantas

MsMDHAR-14 tuvieron un área de $0,44 \pm 0,11 \text{ cm}^2$, mientras que el área de la raíz de las plantas WT control fue de $0,20 \pm 0,03 \text{ cm}^2$ (Figura 23c).

Cuando se analizó la longitud de la raíz principal en plantas sometidas a sequía, las plantas MsMDHAR-3 mostraron una longitud promedio de $3,61 \pm 0,49 \text{ cm}$, las plantas MsMDHAR-9 tuvieron una longitud de $3,31 \pm 0,39 \text{ cm}$ y las MsMDHAR-14 una longitud de $3,54 \pm 0,71 \text{ cm}$. Todos los eventos mostraron longitudes de la raíz principal significativamente mayores ($p < 0,05$) que las plantas WT, que evidenció un promedio de $2,62 \pm 0,17 \text{ cm}$ (Figura 23d).

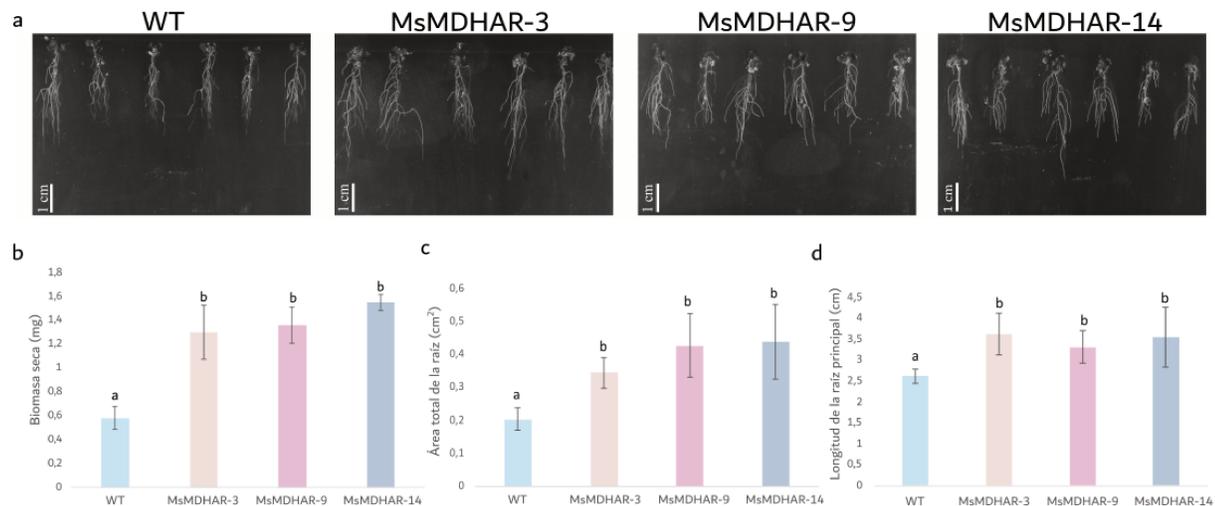


Figura 23. Análisis in vitro de raíces transgénicas de arabisopsis MsMDHAR sometidas a estrés osmótico. a. Imagen representativa de raíces de plántulas de 15 días. b. Peso seco de la raíz. c. Área total de la raíz. d. Longitud de la raíz principal de plantas de arabisopsis WT y transgénicas, cultivadas en placas verticales. Las plántulas de control y transgénicas se cultivaron de manera horizontal inicialmente en medio MS al 50% suplementado con 1,2% de agar durante 7 días y luego fueron trasladadas a placas verticales con el mismo medio pero suplementado con 250 mM de manitol e incubadas a 22 °C, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 14/10 h día/noche. Las fotografías se tomaron 15 días después de la siembra y son representativas de tres experimentos independientes, cada uno con 8 réplicas biológicas de cada evento. El análisis de las imágenes se realizó utilizando RhizoVision Explorer. Las barras de error indican DE. Letras diferentes sobre los histogramas (a, b) indican diferencias significativas entre líneas ($p < 0,05$, ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey).

3.3.5) Análisis fisiológicos de las plantas transgénicas MsMDHAR

Para expandir nuestro conocimiento sobre los mecanismos mediante los cuales la mayor expresión de *MsMDHAR* mejora la tolerancia a estrés en plantas de *Arabidopsis thaliana*, se analizaron la producción de ceras epicuticulares, el número de estomas abiertos y totales, la acumulación de clorofila *a* (Cl *a*) y el contenido relativo de agua (CRA; Figuras 24 y 25).

Se observó que las plantas transgénicas MsMDHAR-3, -9 y -14 producen una mayor cantidad ($p < 0,05$) de cera epicuticular en comparación con las plantas WT bajo condiciones de crecimiento normal (Figura 24a). Las plantas transgénicas MsMDHAR-3 tenían $2 \pm 0,13$ mg/cm² de cera, las MsMDHAR-9 tenían $2,3 \pm 0,5$ mg/cm² y las MsMDHAR-14 tenían $1,94 \pm 0,05$ mg/cm², mientras que las plantas WT tenían $1,6 \pm 0,1$ mg/cm² (Figura 24a). Cuando las plantas con vector vacío y las transgénicas fueron sometidas a sequía e inundación, se observó un aumento en la producción de cera en las plantas WT, pero no en las plantas transgénicas, que mantuvieron el alto nivel de ceras durante el estrés.

Curiosamente, al estudiar el número de estomas totales y abiertos, no se observó una diferencia significativa ($p > 0,05$) entre las plantas transgénicas MsMDHAR-3, -9, -14 y las WT bajo condiciones de crecimiento normal (Figuras 24b y 24c). Sin embargo, cuando fueron sometidas a sequía e inundación, se observó una fuerte disminución en la apertura estomática, como era de esperarse en condiciones de estrés. No obstante, dicha disminución difirió entre las plantas transgénicas y las plantas WT; los eventos transgénicos mostraron una disminución del 43% en la apertura estomática, mientras que las plantas con vector vacío mostraron una disminución del 72% en comparación con las condiciones de riego normal (Figura 24c).

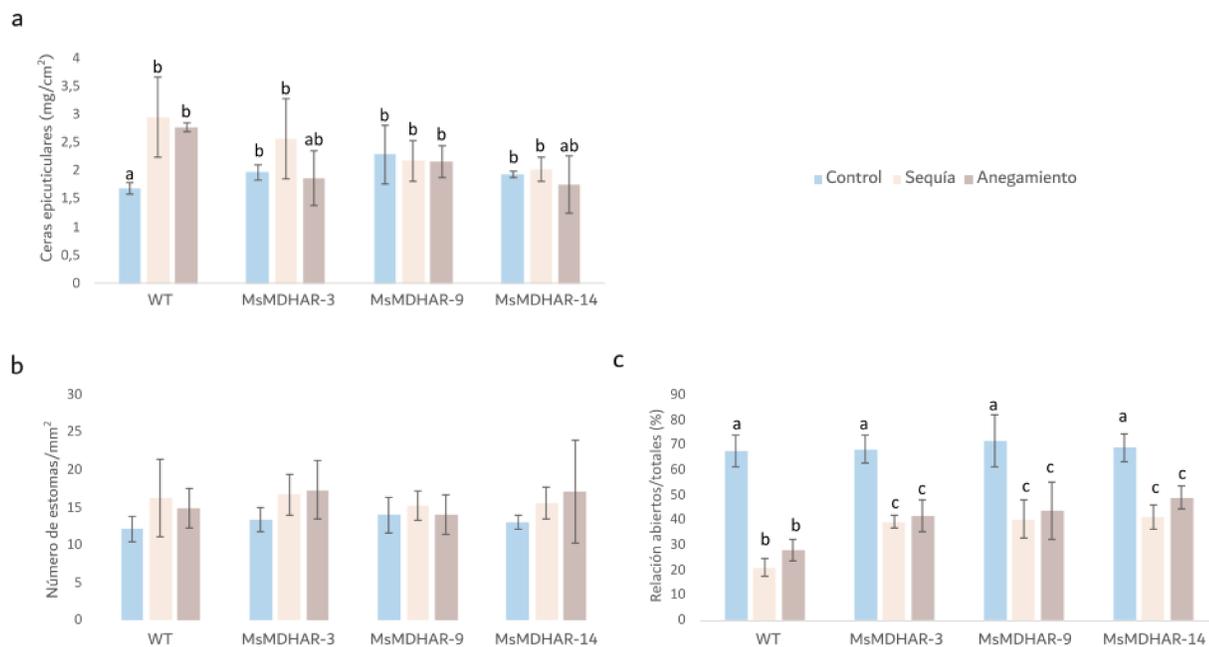


Figura 24. Mediciones de parámetros fisiológicos relacionados con la tolerancia al estrés hídrico. a. Determinación de ceras epicuticulares. b. conteo total de estomas. c. Porcentaje de estomas abiertos. Las líneas WT y transgénicas (MsMDHAR-3, MsMDHAR-9 y MsMDHAR-14) se cultivaron bajo condiciones controladas: 22 °C, 65-70% de humedad relativa, 14:10 h día, 220-250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El estrés hídrico se aplicó cuando las plantas estaban en la etapa vegetativa y en el momento de la aparición del botón floral. Las ceras epicuticulares se extrajeron usando cloroformo. El conteo estomático se realizó en plantas de 3 semanas de edad usando un microscopio Leica M205 FAC. Se fotografiaron tres campos de visión de cada uno de los cinco replicados biológicos de cada genotipo. En condiciones control, se cuantificó un promedio (\pm DE) de $12,1 \pm 1,7$ (WT), $13,4 \pm 1,6$ (MsMDHAR-3), $14 \pm 2,3$ (MsMDHAR-9) y $13 \pm 0,9$ (MsMDHAR-14). De manera similar, se cuantificó un promedio de $16,3 \pm 5,2$ (WT), $16,7 \pm 2,6$ (MsMDHAR-3), $15,2 \pm 2$ (MsMDHAR-9) y $15,6 \pm 2,1$ (MsMDHAR-14) durante la sequía. Finalmente, el número promedio de estomas por campo de visión fue de $14,9 \pm 2,6$ (WT), $17,3 \pm 3,2$ (MsMDHAR-3), $14 \pm 2,6$ (MsMDHAR-9) y $17 \pm 6,9$ (MsMDHAR-14) bajo inundación. Las barras de error indican DE. Las diferentes letras sobre los histogramas (a, b, c) indican diferencias significativas entre líneas ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey). Los gráficos sin letras por encima de las barras indican que los tratamientos no son estadísticamente diferentes.

Mientras tanto, cuando se cuantificó el pigmento fotosintético Cl *a*, no se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) entre las plantas transgénicas MsMDHAR-3, -9, -14 y las

plantas WT bajo condiciones de crecimiento normal (Figuras 25a y 25b). Sin embargo, cuando se analizó la acumulación de Cl a en sequía y se comparó con la condición de riego control, la Cl a se redujo significativamente ($p < 0,05$) en las plantas WT (37,12%), mientras que no se observó una diferencia significativa ($p > 0,05$) en las plantas transgénicas MsMDHAR-3, -9, -14 (Figura 25a). Luego, se observaron niveles significativamente ($p < 0,05$) más altos de Cl a en las plantas transgénicas MsMDHAR-9 en comparación con las plantas WT bajo inundación (Figura 25b). Las plantas transgénicas MsMDHAR-3 tenían $0,22 \pm 0,07$ mg/g PF de Cl a, las MsMDHAR-9 tenían $0,26 \pm 0,03$ mg/g PF y las MsMDHAR-14 tenían $0,21 \pm 0,03$ mg/g PF, mientras que las plantas WT tenían $0,19 \pm 0,05$ mg/g PF (Figura 25b).

Al analizar el CRA, no se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) cuando las plantas transgénicas y WT estaban bajo riego normal (Figuras 25c y 25d). Cuando las plantas fueron sometidas a sequía e inundación, se observó una disminución (Figura 25c) y un aumento (Figura 25d) en el CRA, respectivamente, en las plantas WT pero no en las plantas transgénicas.

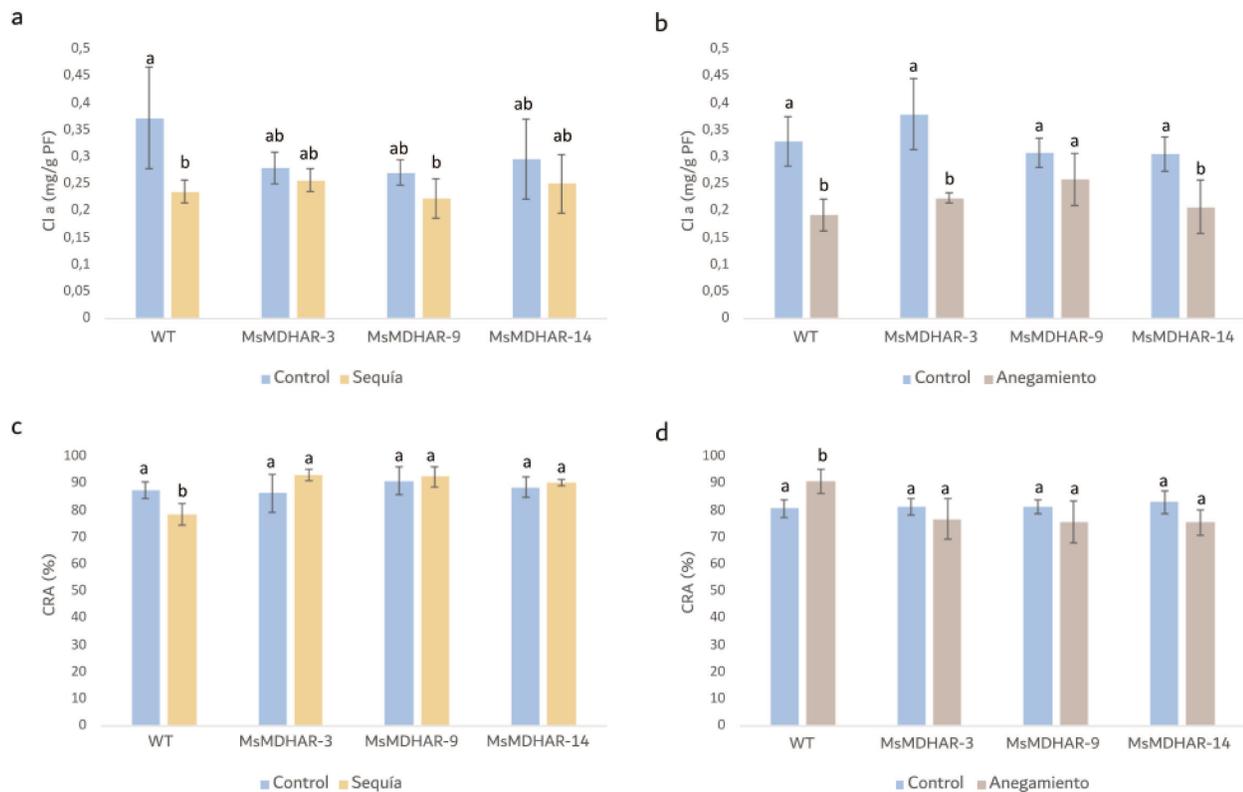


Figura 25. Cuantificación de clorofila *a* (Cl *a*) en plantas bajo riego normal (barras azules), sequía (barras amarillas, a) y anegamiento (barras grises, b). Contenido relativo de agua de las hojas (CRA %) bajo riego normal (barras azules), sequía (barras amarillas, c) y anegamiento (barras grises, d). El CRA y el contenido de Cl *a* fueron evaluados en plantas WT y transgénicas sometidas a estrés hídrico, tanto por exceso como por déficit. Cada condición fue acompañada por plantas bajo riego normal utilizadas como control. Las barras de error indican la DE. Las diferentes letras sobre los histogramas (a, b) indican diferencias significativas entre líneas ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey).

3.3.6) Los niveles de H₂O₂ se reducen en las plantas transgénicas MsMDHAR-9

Adicionalmente, se determinaron los niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) bajo condiciones de crecimiento normales, sequía y anegamiento (Figuras 26 y 27). Se observaron áreas de tinción DAB significativamente ($p < 0,05$) menores en las plantas transgénicas MsMDHAR-9 en comparación con el tipo salvaje (WT) (Figura 26), con áreas de tinción DAB siendo 22%, 39,5% y 40% más altas en las plantas WT bajo riego normal, sequía y anegamiento respectivamente (Figuras 26a, 26b y 26c). Luego, se determinó un área de tinción de DAB significativamente ($p < 0,05$) menor al analizar las plantas transgénicas MsMDHAR-3 bajo riego normal y anegamiento (Figuras 26a y 26c). No se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) al analizar las plantas transgénicas MsMDHAR-3 cultivadas bajo condiciones de sequía, y las plantas transgénicas MsMDHAR-14 cultivadas bajo riego normal, sequía y anegamiento (Figuras 26a, 26b y 26c).

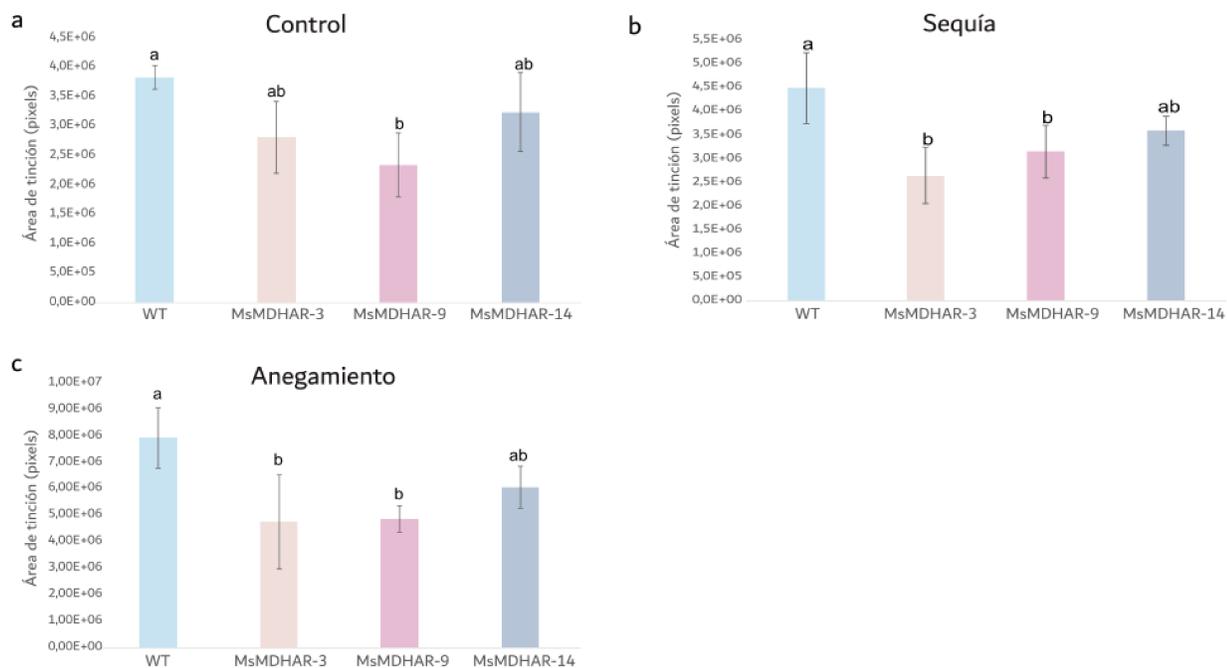


Figura 26. Especies reactivas de oxígeno acumuladas en las plantas WT y transgénicas durante el estrés hídrico. a. Área teñida con DAB (en píxeles) de las hojas de plantas cultivadas con riego normal. b. Área teñida de plantas sometidas a sequía hasta el 30% de la capacidad de campo. c. Área de depósitos de DAB en plantas anegadas durante 14 días. Se utilizaron cinco fotografías microscópicas de hojas de plantas WT y transgénicas teñidas con DAB para cada análisis. Las áreas teñidas se identificaron utilizando la función de umbral normalizado y se procesaron usando el vector H DAB de ImageJ Fiji. Las barras de error indican la desviación estándar. Las letras diferentes sobre los histogramas (a, b) indican diferencias significativas entre las líneas ($p < 0,05$, ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey).

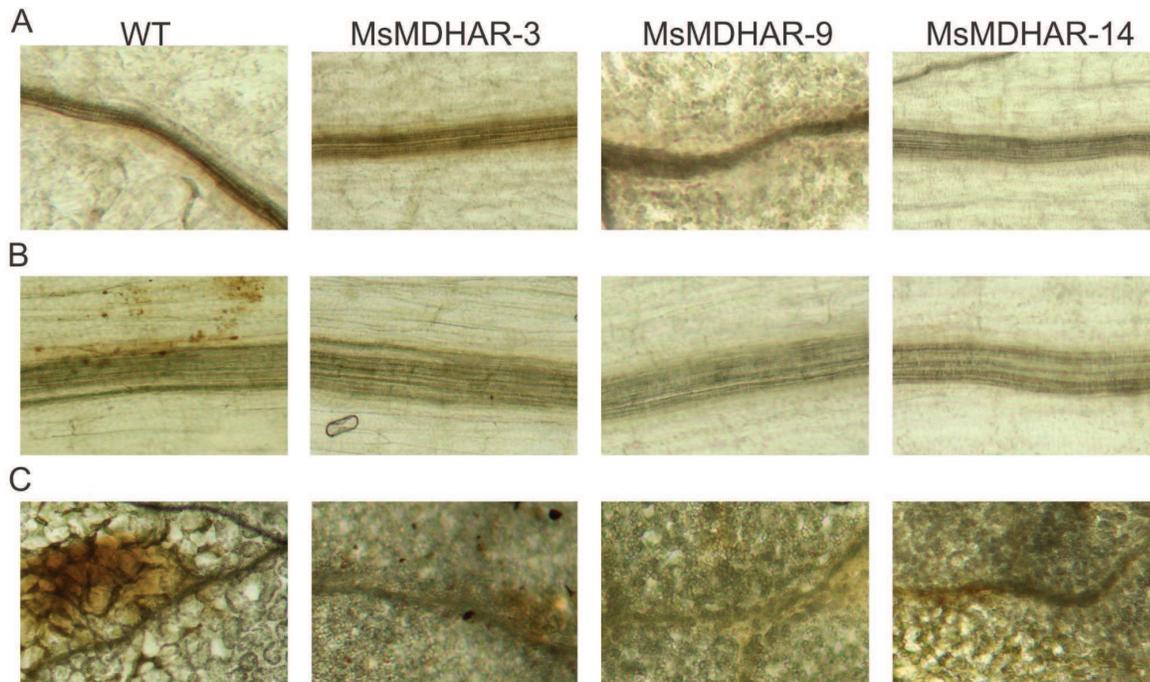


Figura 27. Visualización microscópica del peróxido de hidrógeno detectado mediante tinción con DAB. Imágenes representativas de plantas WT, MsMDHAR-3, MsMDHAR-9 y MsMDHAR-14 bajo riego normal (A), sometidas a sequía hasta el 30% de la capacidad de campo (B) y anegamiento durante 14 días (C). Las hojas se incubaron con una solución DAB de 1 mg/mL (v/v) durante 18 horas antes de blanquearlas en etanol al 96% (v/v). Las imágenes se examinaron con un microscopio Leica M205 FAC utilizando un aumento de 40X.

3.4) Discusión

Así como otros seres vivos, las plantas poseen un sistema enzimático altamente eficiente cuyo papel es protegerlas contra el daño oxidativo y mantener la homeostasis redox (Morales & Munné-Bosch, 2016). Las principales enzimas que constituyen este sistema, involucradas en la eliminación y desintoxicación de ROS, incluyen MDHAR, DHAR y GR (Mittler et al., 2011; Liebthal et al., 2018). Entre ellas, se considera que la MDHAR es la enzima con la mayor capacidad antioxidante y de eliminación de radicales libres en las plantas.

Basado en el estudio transcriptómico realizado en el capítulo 3, sumado a otro análisis proteómico y transcriptómico previamente publicado (Zeng et al., 2019), se puede inferir sobre la participación de *MsMDHAR* de alfalfa en la tolerancia a este proceso de estrés. Debido a esto se decidió evaluar esta hipótesis utilizando un sistema heterólogo.

Nuestros resultados establecen una relación directa entre el nivel de expresión de *MsMDHAR* y la acumulación de AsA y la degradación de DHA en plantas de *arabidopsis*, lo que se cree que media el equilibrio de ROS y las respuestas al estrés en plantas. En este sentido, se ha observado que, aunque el nivel de expresión en los eventos *MsMDHAR*-3 y -14 es bajo en comparación con el *MsMDHAR*-9, y no suficiente para aumentar los niveles de AsA, podría existir un nivel de regulación fino involucrado en prevenir una acumulación significativa de DHA en estas plantas. Los resultados presentados en este capítulo nos permitieron concluir que la expresión de *MsMDHAR* tiene la capacidad de modificar el metabolismo de AsA y sus derivados en plantas de *arabidopsis*. Por lo tanto, es razonable hipotetizar que *MsMDHAR* participaría en respuestas de las plantas a la tolerancia a los estreses abióticos, y particularmente al estrés hídrico.

Se procedió, luego, a evaluar cómo se ve influido el fenotipo de estas plantas bajo condiciones de estrés hídrico, tanto por sequía como por anegamiento. Primero, se realizaron mediciones de componentes involucrados en el rendimiento de la planta, como el desarrollo de biomasa de hojas e inflorescencias y la producción de semillas. En este sentido, podemos inferir que *MsMDHAR* tiene una contribución directa en el aumento del rendimiento de semillas de *arabidopsis* (peso y número de semillas) y biomasa de hojas en roseta e inflorescencias. En estos ensayos se encontró que los efectos fenotípicos de la expresión de *MsMDHAR* sólo se observaron en el evento de alta expresión (*MsMDHAR*-9). Por lo tanto, esto dependería del nivel de ascorbato presente en las plantas y su acción antioxidante. Aún más, el alto nivel de expresión

de *MsMDHAR* promovería la producción de semillas bajo condiciones de riego normal e incluso bajo sequía y anegamiento.

Recientemente, se aisló y caracterizó la PgMDHAR de plantas de *Pennisetum glaucum* (Sonkar et al., 2023). Estos autores propusieron que la estabilidad aumentada de la enzima MDHAR podría ser la razón detrás de la excelente tolerancia al estrés abiótico de estas plantas. Otro estudio reciente encontró que la alta suplementación de azufre en plantas de *Brassica napus* L. mejoró la tolerancia al anegamiento mediante aumento en la producción de antioxidantes (Hussain et al., 2023). Este trabajo informó que el AsA fue uno de los antioxidantes más importantes que contribuye a la mejora de la productividad y que MDHAR, DHAR, GR, CAT y APX fueron las enzimas más críticas involucradas en esta mejora (Hussain et al., 2023). Los hallazgos presentados en este trabajo, junto con informes previos de otros autores, apuntan a un papel relevante del metabolismo del ascorbato en la tolerancia de las plantas a los estreses abióticos, y son muy prometedores para futuros planes de mejoramiento de plantas.

Las moléculas de ROS son señalizadoras muy importantes para el mantenimiento celular. Sin embargo, en condiciones de estrés, como puede ser una situación de hipoxia, se genera una mayor acumulación de ROS en raíces y tejidos aéreos, siendo el H_2O_2 la principal ROS presente en estos tejidos (Chang et al., 2012; Pucciariello et al., 2012; Xu et al., 2014; Zhang et al., 2017; Sachdev et al., 2021). En un escenario de sequía, el proceso de producción de H_2O_2 y otras ROS también se exacerba, causando múltiples daños oxidativos en las plantas (Noctor et al., 2002; Miller et al., 2010; Sachdev et al., 2021). En este contexto, en esta tesis se analizó la acumulación de H_2O_2 en hojas de plantas transgénicas bajo riego normal y estrés hídrico. Nuestros hallazgos sugieren que *MsMDHAR*, junto con altos niveles de AsA y los procesos que modula, pueden estar involucrados en la reducción de la acumulación de H_2O_2 tanto bajo condiciones de riego control como de estrés hídrico.

Luego, se realizó un ensayo in vitro para estudiar cómo la expresión de *MsMDHAR* influía en el desarrollo de las raíces. Nuevamente, nuestros resultados demuestran que bajo condiciones de riego normal y estrés osmótico, las plantas de *Arabidopsis* que expresan *MsMDHAR* exhiben una mayor producción de raíces, tanto en términos de biomasa como de área. Ahmad & Li (2021) mostraron una correlación entre el aumento de los niveles endógenos de ciertas hormonas, el aumento de la actividad de las enzimas MDHAR, DHAR, CAT y GR, y el incremento de la producción de raíces en suelos compactados bajo condiciones de sequía.

La evaluación de diferentes variables fisiológicas relacionadas con el desarrollo de las plantas tanto bajo condiciones de control como de estrés reveló que las plantas transgénicas exhibieron una mayor tolerancia que las plantas de control. En este sentido, se estudiaron la acumulación de ceras, la apertura estomática, la acumulación de clorofila *a* y el contenido relativo de agua. Observamos que las plantas WT aumentaron la producción de ceras epicuticulares durante los tratamientos de sequía y anegamiento, mientras que las plantas MsMDHAR mantuvieron consistentemente un alto nivel de producción de ceras epicuticulares independientemente de la presencia del estrés. Estos resultados sugieren que las plantas que expresan *MsMDHAR* estarían mejor adaptadas al efecto inicial del estrés hídrico, ya que tendrían una capa protectora de cera en sus cutículas. Aunque algunos informes confirman el aumento de ceras bajo condiciones de sequía (Aharoni et al., 2004), su papel durante el anegamiento sigue siendo poco claro. Por lo tanto, los resultados presentados en esta tesis implican que la producción de ceras epicuticulares puede ser similar bajo condiciones de sequía y anegamiento. En un estudio relacionado, Zhu et al. (2013) informaron que la sobreexpresión de *EsWAX1* en plantas de *Arabidopsis thaliana* mejoró significativamente la tolerancia a la sequía a través de un mecanismo que involucra niveles aumentados de ceras y AsA.

Durante el estrés por inundación, sumersión y anegamiento, las plantas tienden a cerrar sus estomas, lo que lleva a la degradación de clorofilas y una consiguiente reducción en su capacidad de captura de luz, resultando en una disminución de la tasa fotosintética (Kuai et al., 2014; Yan et al., 2018). Respuestas similares se observan en el caso del estrés por sequía (Chaves & Oliveira, 2004; Chaves et al., 2009). En nuestro estudio, cuando analizamos el número total de estomas, no observamos diferencias al comparar plantas con vector vacío y plantas transgénicas MsMDHAR. Interesantemente, al analizar el porcentaje de estomas abiertos durante el estrés, como era de esperar, se observó una reducción drástica en todas las líneas transgénicas. Sin embargo, lo notable fue que esta reducción fue significativamente menos pronunciada en los eventos transgénicos, lo que sugiere que incluso bajo condiciones de estrés, mantienen un mayor número de estomas abiertos para asegurar el intercambio de gases. Más allá de lo observado a nivel oxidativo, estos resultados, junto con la alta producción de ceras epicuticulares, proporcionan un sólido fundamento para explicar la tolerancia al estrés hídrico.

En resumen, a partir de los resultados obtenidos en este capítulo y gracias a la caracterización funcional de MsMDHAR en *Arabidopsis*, podemos concluir que esta enzima

participa en la tolerancia al estrés hídrico, tanto causado por sequía como por anegamiento. Entre los cambios causados por MsMDHAR que contribuirían a una mayor tolerancia al estrés, identificamos una mayor producción de antioxidantes (AsA), mayor contenido de ceras epicuticulares, mayor acumulación de clorofila *a*, mayor contenido relativo de agua (CRA) en sequía y menor en anegamiento, y menor producción de H₂O₂.

A medida que las sociedades progresan, hay una tendencia creciente a explotar los recursos naturales, lo que resulta en la alteración del medio ambiente natural. En consecuencia, varios tipos de estrés abiótico, como el estrés salino, la sequía, el anegamiento, las temperaturas extremas y la exposición a radiación, así como la exposición a contaminantes orgánicos o inorgánicos, se están volviendo más frecuentes (Rivero et al., 2022). Los resultados de este trabajo muestran la capacidad de las plantas generadas para sobrevivir y prosperar en algunos de estos entornos desafiantes, representando un avance significativo en la biotecnología agrícola, abriendo nuevas posibilidades para el desarrollo de cultivos más resilientes que puedan contribuir a la seguridad alimentaria global frente a los desafíos del cambio climático.

DISCUSIÓN GENERAL

La sequía y el anegamiento son los problemas globales más graves para la agricultura (Akhtar & Nazir, 2013). El estrés por sequía ocurre cuando la tasa de transpiración de las superficies de las hojas es mayor que la absorción de agua por las raíces (Salehi-lisar et al., 2012). Por el contrario, en los suelos anegados, el exceso de agua llena los poros del suelo, disminuyendo la concentración de oxígeno (Pan et al., 2021), lo que reduce el intercambio de gases entre la atmósfera y el suelo, creando un estado de hipoxia que lleva a la muerte del tejido vegetal (Fukao et al., 2019). Tanto el anegamiento como la sequía afectan a una serie de procesos biológicos y químicos, que pueden modificar el crecimiento de los cultivos, tanto a corto como a largo plazo (Sapeta et al., 2013; van Veen et al., 2014; Yan et al., 2018). La tolerancia de las plantas al estrés hídrico representa uno de los desafíos más importantes en la agricultura moderna debido a los efectos del cambio climático y la creciente demanda por cultivos resilientes.

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es un cultivo forrajero clave en Argentina y el mundo, ampliamente reconocido por su alta productividad y calidad nutricional, lo que la convierte en un componente esencial para la alimentación del ganado en sistemas de producción intensivos (Atumo et al., 2021). Este cultivo ocupa una superficie significativa en las regiones templadas del país (Jáuregui et al., 2022), contribuyendo tanto a la economía agropecuaria como a la sostenibilidad de los sistemas agrícolas, debido a su capacidad para fijar nitrógeno y mejorar la estructura del suelo (Anglade et al., 2015). Sin embargo, el rendimiento de la alfalfa está fuertemente condicionado por factores climáticos. Los eventos extremos como la sequía y la inundación, son cada vez más frecuentes e intensos debido al cambio climático, y generan importantes reducciones en la biomasa aérea y radicular, comprometiendo tanto su rendimiento como su persistencia en los sistemas de producción (Cao et al., 2017; Diatta et al., 2021). La alfalfa es una especie con alta diversidad genética, especialmente debido a su naturaleza alógama (polinización cruzada), lo que promueve la variabilidad dentro y entre poblaciones (Li & Brummer, 2012). Diferentes cultivares pueden tener variantes alélicas que les confieren diferentes capacidades para tolerar todo tipo de estrés, entre ellos el hídrico.

En este contexto, esta tesis exploró diferentes estrategias para abordar este problema, evaluando tanto la respuesta de cultivares de alfalfa como la caracterización funcional del gen *MsMDHAR* de alfalfa en un sistema heterólogo.

En el Capítulo 1, el análisis de los tres cultivares de alfalfa frente a la sequía evidencia las profundas implicancias del déficit de agua en la productividad agrícola, resaltando la relevancia de mecanismos adaptativos específicos en cada cultivar. Los cultivares Matrera y Vaquera demostraron una mayor capacidad de adaptación, manteniendo significativamente más biomasa bajo estrés en comparación con el cultivar Monarca, lo que indicaría diferencias intrínsecas en sus estrategias de resistencia.

En el Capítulo 2 de esta tesis se analizó la respuesta de tres cultivares de alfalfa al estrés por anegamiento, un tipo de estrés hídrico que afecta principalmente las raíces, reduciendo la disponibilidad de oxígeno y causando daños por hipoxia. En este estudio, se observó que aunque los cultivares presentaron una alta tasa de supervivencia tras 14 días de anegamiento, su capacidad para mantener la productividad y la estructura radicular fue variable. A través de una evaluación agronómica y fisiológica, se identificaron diferencias significativas en la tolerancia al estrés hídrico entre los cultivares, destacándose Vaquera como el más tolerante. Este cultivar fue el único que desarrolló aerénquima en sus raíces, lo que podría explicar su mejor adaptación al anegamiento, al permitir una mayor absorción de oxígeno en condiciones de hipoxia.

En el Capítulo 3, se abordó el estudio funcional del gen *MsMDHAR* de alfalfa, una enzima clave en el reciclaje de ascorbato, dentro del sistema antioxidante de las plantas. Los resultados obtenidos en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* demostraron que la sobreexpresión de *MsMDHAR* no solo mejora la acumulación de antioxidantes (AsA) y reduce la concentración de H_2O_2 , sino que también tiene impactos significativos en la biomasa, el rendimiento de semillas y la producción de raíces. Además, se observó que las plantas transgénicas producían niveles altos de ceras epicuticulares y un porcentaje mayor de estomas abiertos, características que probablemente contribuyeron a su mayor tolerancia al estrés. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran de manera concluyente que la introducción del gen de alfalfa en plantas de *Arabidopsis* confiere una mayor tolerancia tanto a la sequía como al anegamiento. Este hallazgo no solo valida la hipótesis planteada, sino que también destaca el potencial de la ingeniería genética para mejorar la resistencia de las plantas a condiciones ambientales adversas. Aunque *Arabidopsis* es una planta modelo ampliamente utilizada, es crucial trasladar estos resultados a un

contexto agronómico real. Por lo tanto, el siguiente paso implicaría el desarrollo de plantas transgénicas de alfalfa sobreexpresantes del gen elegido y evaluar si la mayor tolerancia observada en arábidopsis también se manifiesta en este cultivo de importancia económica.

La integración de estos hallazgos permite establecer una relación entre las respuestas fisiológicas observadas en alfalfa y los mecanismos moleculares identificados en plantas transgénicas de Arabidopsis. En este sentido, los resultados sugieren que la mejora en la tolerancia al estrés hídrico podría lograrse mediante una combinación de estrategias: (1) selección de cultivares con características agronómicas y fisiológicas adaptativas, como las observadas en Vaquera, y (2) modificación genética dirigida a optimizar el metabolismo antioxidante, como lo evidencia la funcionalidad de MsMDHAR.

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis contribuyen al entendimiento de los mecanismos fisiológicos y moleculares que subyacen a la tolerancia al estrés hídrico en plantas. Con una agricultura enfrentando cada vez mayores desafíos, este conocimiento representa un avance importante para promover prácticas más sostenibles y cultivos mejor preparados para los retos ambientales y productivos del futuro.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A., Mubeen, M., Sohail, M. A., Solanki, M. K., Hussain, B., Nosheen, S., ... & Fang, X. 2022. Root rot a silent alfalfa killer in China: Distribution, fungal, and oomycete pathogens, impact of climatic factors and its management. *Frontiers in Microbiology*, 13, 961794.

Aharoni, A., Dixit, S., Jetter, R., Thoenes, E., van Arkel, G., & Pereira, A. 2004. The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16(9), 2463-2480.

Ahmad, H., & Li, J. 2021. Impact of water deficit on the development and senescence of tomato roots grown under various soil textures of Shaanxi, China. *BMC Plant Biology*, 21(1), 241.

Akhtar, I., & Nazir, N. 2013. Effect of waterlogging and drought stress in plants. *International Journal of water resources and environmental sciences*, 2(2), 34-40.

Anglade, J., Billen, G. y Garnier, J. 2015. Relationships for estimating N₂ fixation in legumes: incidence for N balance of legume-based cropping systems in Europe. *Ecosphere*, 6 (3), 1-24.

Annicchiarico P. 2007. Lucerne shoot and root traits associated with adaptation to favourable or drought-stress environments and to contrasting soil types. *Field Crop Res.* 102, 51–59.

Ashraf, M. A. 2012. Waterlogging stress in plants: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 7(13), 1976-1981.

Ashraf, M. H. P. J. C., & Harris, P. J. 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*, 51, 163-190.

Atumo, T. T., Kauffman, R., Gemiyo Talore, D., Abera, M., Tesfaye, T., Tunkala, B. Z., ... & Kebede Kalsa, G. 2021. Adaptability, forage yield and nutritional quality of alfalfa (*Medicago sativa*) genotypes. *Sustainable Environment*, 7(1), 1895475.

Aziz, A., & Kapoor, D. 2018. Salicylic acid: it's physiological role and Interactions. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11(7), 3171-3177.

Bandurska, H., and Stroiński, A. 2005. The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. *Acta Physiol. Plant.* 27, 379–386.

Barba-Espin, G., Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M.J., Albacete, A., Faize, L., Faize, M., Pérez-Alfocea, F., & Hernández, J.A. 2010. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. *Plant Cell Environment*, 33, 981–994.

Barsukov, N.M., Leonova, E.S. & Zaitsev, I.S. 2024. Multifoliate Alfalfa: Its Causes and Effect. *Russ J Genet* 60, 265–273.

Basigalup, D. H., Giletta, M. A., Odorizzi, A., Arolfo, V., Sanchez, F. R., & Urrets Zavalía, G. 2018. An overview of alfalfa (*Medicago sativa* L.) situation in Argentina. Second world alfalfa congress. Global interaction for alfalfa innovation November 11-14, 2018. Córdoba, Argentina.

Basigalup, D. H., Odorizzi, S. A., & Ferreira, R. D. P. 2022. Cultivares en América Latina.

Blume, L., Hoischen-Taubner, S., & Sundrum, A. 2021. Alfalfa--a regional protein source for all farm animals. *Landbauforschung*, 71(1), 1+.

Borsani, O., Valpuesta, V., and Botella, M. A. 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol.* 126, 1024–1030.

Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., et al. 2001. Growth Stage–Based Phenotypic Analysis of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13, 1499-510.

Burgess, T., McComb, J. A., Colquhoun, I., & Hardy, G. S. 1999. Increased susceptibility of *Eucalyptus marginata* to stem infection by *Phytophthora cinnamomi* resulting from root hypoxia. *Plant Pathology*, 48(6), 797-806.

Cao, G., Dong, H., Che, Z., Qi, L. C., Wang, T., Song, H., ... & Dong, Z. R. (2017). Effects of Waterlogging Stress on the Yield and Quality of Alfalfa Varieties. *Acta Agrestia Sinica*, 25(1), 135.

Castonguay, Y., Michaud, J. and Dubé, M.-P. 2015. Reference Genes for RT-qPCR Analysis of Environmentally and Developmentally Regulated Gene Expression in Alfalfa. *American Journal of Plant Sciences*, 6, 132-143.

- Castro-Camba, R., Sánchez, C., Vidal, N., & Vielba, J. M. 2022. Plant development and crop yield: The role of gibberellins. *Plants*, 11(19), 2650.
- Chang, R., Jang, C.J., Branco-Price, C., Nghiem, P., & Bailey-Serres, J. 2012. Transient MPK6 activation in response to oxygen deprivation and reoxygenation is mediated by mitochondria and aids seedling survival in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 78(1-2),109-122.
- Charrier, B., Champion, A., Henry, Y., & Kreis, M. 2002. Expression Profiling of the Whole *Arabidopsis* Shaggy-Like Kinase Multigene Family by Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Plant Physiology*, 130(2), 577–590.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. 2003. Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional plant biology*, 30(3), 239-264.
- Chaves, M.M., & Oliveira, M.M. 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2365-2384.
- Chaves, M.M., Flexas, J., & Pinheiro, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103(4), 551–560.
- Chen, J. 2024. *Arabidopsis* ICS1 produces salicylic acid precursor isochorismate through a gated channel mechanism, *Plant Physiology*, Volume 196, Issue 2, Pages 672–674.
- Chen, Z., & Gallie, D.R. 2006. Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. *Plant Physiology*, 142, 775–787.
- Clough, S.J., & Bent, A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16, 735–743.
- Colmer, T. D., & Voesenek, L. A. C. J. 2009. Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Functional Plant Biology*, 36(8), 665-681.
- Comas, L. H., Becker, S. R., Cruz, V. M. V., Byrne, P. F., & Dierig, D. A. 2013. Root traits contributing to plant productivity under drought. *Frontiers in plant science*, 4, 442.
- Consejo Agroindustrial Argentino. <https://consejoagroindustrialargentino.org.ar>

- D'Ambrogio de Argüeso, A. 1986. Manual de técnicas de histología vegetal. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires: 83.
- Dar, T. A., Uddin, M., Khan, M. M. A., Hakeem, K. R., Jaleel, H. 2015. Jasmonates counter plant stress: a review. *Environmental and experimental Botany*, 115, 49-57.
- Davies, J. A. 2018. Aislamiento y caracterización de microsimbiontes de *Medicago sativa* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Del Pozo Ibañez, M. 1977. La Alfalfa, su cultivo y aprovechamiento. 2. ed. Madrid: Mundi-Prensa. 379p.
- Dempsey, D. M. A., Vlot, A. C., Wildermuth, M. C., & Klessig, D. F. 2011. Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 9.
- Diatta, A. A., Min, D., & Jagadish, S. K. 2021. Drought stress responses in non-transgenic and transgenic alfalfa—Current status and future research directions. *Advances in Agronomy*, 170, 35-100.
- Ding, J., Liang, P., Wu, P., Zhu, M., Li, C., Zhu, X., Gao, D., Chen, Y., & Guo, W. 2020. Effects of waterlogging on grain yield and associated traits of historic wheat cultivars in the middle and lower reaches of the Yangtze River, China. *Field Crops Research*, 246, 107695.
- Doyle, J.J., & Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Echeverría E. M.; J. C. Moschetti & E. M. Martínez. 1995. Producción de semilla de alfalfa. pp. 208 - 240. EN: Hijano, E. & A. Navarro. 1995. La Alfalfa en la Argentina. INTA Centro Regional Cuyo. Edit. Editar, San Juan. 280 p.
- Eltayeb, A. E., Kawano, N., Badawi, G. H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Shibahara, T., ... & Tanaka, K. 2007. Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta*, 225, 1255-1264.

Erice G, Louahlia S, Irigoyen JJ, Sanchez-Diaz M, Avice JC. 2010. Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *J. Plant Physiol.* 167: 114–120.

Evans P. 1998. Lucerne. In 'Soilguide: a handbook for understanding and managing agricultural soils. Bulletin no. 4343'. (Ed. G Moore) pp. 302-303. (Agriculture Western Australia: Perth).

Ezura H., Wang Z., Ke Q. B., Kim M. D., Kim S. H., Ji C. Y., et al. 2015. Transgenic alfalfa plants expressing the sweetpotato orange gene exhibit enhanced abiotic stress tolerance. *PLoS One* 10.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The Impact of Disasters and Crises on Agriculture and Food Security; FAO: Rome, Italy, 2021; 245p, Available online: <https://www.fao.org/resources/digital-reports/disasters-in-agriculture/en/> (accessed on November 2024).

Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N. S. M. A., Fujita, D. B. S. M. A., & Basra, S. M. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable agriculture*, 153-188.

Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., Siddique, K. H. M. 2012. Drought Stress in Plants: An Overview. *Plant Responses to Drought Stress*, 1–33.

Ferradini, N., Iannacone, R., Capomaccio, S., Metelli, A., Armentano, N., Semeraro, L., et al. 2015. Assessment of heat shock protein 70 induction by heat in alfalfa varieties and constitutive overexpression in transgenic plants. *PLoS ONE* 10:e0126051.

Field, A. 2013. *Discovering statistics using IBM SPSS statistics*. Sage

Finkelstein, R. R., & Rock, C. D. 2002. Abscisic acid biosynthesis and response. *The Arabidopsis Book/American society of plant biologists*, 1.

Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., Sharkey, T. D. 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant biology*, 6(03), 269-279.

- Foyer, C. H., & Noctor, G. 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant physiology*, 155(1), 2-18.
- Fukao, T., Barrera-Figueroa, B.E., Juntawong, P., & Peña-Castro, J.M. 2019. Submergence and waterlogging stress in plants: a review highlighting research opportunities and understudied aspects. *Frontiers in Plant Science*, 10, 340.
- Gallie, D.R. 2013. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of Experimental Botany*, 64, 433–443.
- Gao, Q., Liu, Y., Liu, Y., Dai, C., Zhang, Y., Zhou, F., & Zhu, Y. 2023. Salicylic Acid Modulates the Osmotic System and Photosynthesis Rate to Enhance the Drought Tolerance of *Toona ciliata*. *Plants*, 12(24), 4187.
- Gasperl, A., Balogh, E., Boldizsár, Á., Kemeter, N., Pirklbauer, R., Möstl, S., Kalapos, B., Szalai, G., Müller, M., Zellnig, G., & Kocsy, G.. 2021. Comparison of Light Condition-Dependent Differences in the Accumulation and Subcellular Localization of Glutathione in Arabidopsis and Wheat. *International Journal of Molecular Science*. 9, 22(2):607.
- Gil, P., B. Schaffer, S.M. Gutiérrez, C. Li, 2007. Effect of Waterlogging on Plant Water Status, Leaf Gas Exchange and Biomass of Avocado (*Persea americana Mill*). *Viña Del Mar, Chile.*, 12(16): 978-956-17-0413-8.
- Giles, J. M., Tordsen, C. L., Rebstock, T. R., Bucciarelli, B., Samac, D. A., & Sathoff, A. E. 2022. Management strategies and distribution of *Aphanomyces* root rot of alfalfa (*Medicago sativa*), a continuing threat to forage production in the United States. *Plant Pathology*, 71(6), 1231-1240.
- Gillespie, K.M., & Ainsworth, E.A. 2007. Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants. *Nature Protocols*, 2(4), 871-874.
- Głąb, T. 2011. Effect of soil compaction on root system morphology and productivity of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Polish Journal of Environmental Studies*, 20(6).
- Gomes, G. L. B., & Scortecci, K. C. 2021. Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms. *Plant Biology*, 23(6), 894-904.

Goodess, C. M. 2013. How is the frequency, location and severity of extreme events likely to change up to 2060?. *Environmental science & policy*, 27, S4-S14.

Goplen, B.P.; Baenziger, H.; Bailey, L.D.; Gross, A.T.H.; Hanna, M.R.; Michaud, R.; Richards, K.W.; Waddington, J. 1980. *Growing and managing alfalfa in Canada*. Ottawa: Agriculture Canada, 49 p.

Großkinsky, D. K., Roitsch, T., & Liu, F. 2020. Higher activity of monodehydroascorbate reductase and lower activities of leaf and spike vacuolar invertase and glutathione S-transferase reveals higher number of grains per spike in spring wheat genotypes grown under well-watered and drought conditions. *BMC Plant Biol*.

Grzesiak S. 2016. Impact of soil compaction stress combined with drought or waterlogging on physiological and biochemical markers in two maize hybrids. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38,109.

Gudesblat, G.E., Iusem, N.D., & Morris, P.C. 2007. Guard cell-specific inhibition of *Arabidopsis* MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytologist*, 173(4), 713-721.

Haque ME, Abe F, Mori M, Oyanagi A, Komatsu S, Kawaguchi K. 2014. Characterization of a wheat pathogenesis-related protein, TaBWPR-1.2, in seminal roots in response to waterlogging stress. *J Plant Physiol* 171:602–609.

Hara, M., Furukawa, J., Sato, A., Mizoguchi, T., and Miura, K. 2012. “Abiotic stress and role of salicylic acid in plants,” in *Abiotic Stress Responses in Plants*, eds A. Parvaiza and M. N. V. Prasad (New York, NY: Springer), 235–251.

Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., da Silva, J.A.T., & Fujita, M. 2012. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defence is a key factor. *Crop stress and its management: perspectives and strategies*, 261-315.

Herbert, S., Hashemi, M., Chickering-Sears, C., & Weis, S. 2000. Alfalfa. In *Center for Agriculture, Food, and the Environment*, University of Massachusetts Amherst. Retrieved from <https://ag.umass.edu/crops-dairy-livestock-equine/fact-sheets/alfalfa>.

- Herrera-Vásquez, A., Salinas, P., & Holuigue, L. 2015. Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in plant science*, 6, 171.
- Herzog, M., Striker, G.G., Colmer, T.D., & Pedersen, O. 2016. Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat—a review of root and shoot physiology. *Plant Cell Environment*, 39, 1068–1086.
- Hirabayashi, Y., Mahendran, R., Koirala, S., Konoshima, L., Yamazaki, D., Watanabe, S., Kim, H., & Kanae, S. 2013. Global flood risk under climate change. *Nature Climate Change*, 3, 816–821.
- Hofgen, R., & Willmtzer, L. 1988. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research*, 16, 9977.
- Horner, J. L., Bush, L. J., Adams, G. D., & Taliaferro, C. M. 1985. Comparative nutritional value of eastern gamagrass and alfalfa hay for dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 68(10), 2615-2620.
- Hussain, M.A., Naeem, A., Pitann, B., & Mühling, K.H. 2023. High Sulfur (S) Supplementation Imparts Waterlogging Tolerance to Oilseed rape (*Brassica napus* L.) Through Upregulating S Metabolism and Antioxidant Pathways. *Journal of Plant Growth Regulation*.
- Jackson, M. B. 2008. Ethylene-promoted elongation: an adaptation to submergence stress. *Annals of botany*, 101(2), 229-248.
- Jaime, C., Muchut, S.E., Reutemann, A.G., Gieco, J.O., & Dunger, G. 2020. Morphological changes, alteration of photosynthetic parameters and chlorophyll production induced by infection with *alfalfa dwarf virus* in *Medicago sativa* plants. *Plant Pathology*, 69, 393–402.
- Janda, T., Gondor, O. K., Yordanova, R., Szalai, G., & Pál, M. 2014. Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects. *Acta physiologiae plantarum*, 36, 2537-2546.
- Jarvis, P., Chen, L.J., Li, H., Peto, C.A., Fankhauser, C., & Chory, J. 1998. An *Arabidopsis* mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science*, 282, 100-103.

- Jáuregui, J. M., Ojeda, J. J., Berone, G. D., Lattanzi, F. A., Baudracco, J., Fariña, S. R., et al. 2022. Yield gaps of lucerne (*Medicago sativa* L.) in livestock systems of Argentina. *Ann. Appl. Biol.*
- Jenks, M. A., Ashworth, E. N., Janick, J. 1999. Plant epicuticular waxes: function, production, and genetics. *Hortic Rev*, 23, 1-54.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. (New York: McGraw-Hill).
- Jordán, M., & Casaretto, J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. *Fisiología vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
- Kang, Y., Han, Y., Torres-Jerez, I., Wang, M., Tang, Y., Monteros, M., & Udvardi, M. 2011. System responses to long-term drought and re-watering of two contrasting alfalfa varieties. *The Plant Journal*, 68(5), 871-889.
- Kavitha, K., George, S., Venkataraman, G., & Parida, A. 2010. A salt-inducible chloroplastic monodehydroascorbate reductase from halophyte *Avicennia marina* confers salt stress tolerance on transgenic plants. *Biochimie*, 92(10), 1321-1329.
- Kazan, K. 2015. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in plant science*, 20(4), 219-229.
- Khan, M. I. R., Trivellini, A., Chhillar, H., Chopra, P., Ferrante, A., Khan, N. A., & Ismail, A. M. 2020. The significance and functions of ethylene in flooding stress tolerance in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 179, 104188.
- Kim, H., Choi, D., & Suh, M. C. 2017. Cuticle ultrastructure, cuticular lipid composition, and gene expression in hypoxia-stressed *Arabidopsis* stems and leaves. *Plant cell reports*, 36, 815-827.
- Kipnis, T., Vaisman, I. and Granoth, I. 1989. Drought stress and alfalfa production in a Mediterranean environment. *Irrigation Science* 10: 113-125.

- Kuai, J., Liu, Z., Wang, Y., Meng, Y., Chen, B., Zhao, W., Zhou, Z., & Oosterhuis, D.M. 2014. Waterlogging during flowering and boll forming stages affects sucrose metabolism in the leaves subtending the cotton boll and its relationship with boll weight. *Plant Science*, 223, 79–98.
- Kulkarni, K.P.; Tayade, R.; Asekova, S.; Song, J.T.; Shannon, J.G.; Lee, J.D. 2018. Harnessing the potential of forage legumes, alfalfa, soybean, and cowpea for sustainable agriculture and global food security. *Front. Plant Sci*, 9, 1314.
- Lal, R. 2009. Soil degradation as a reason for inadequate human nutrition. *Food Security*, 1, 45-57.
- Lesk, C., Rowhani, P., & Ramankutty, N. 2016. Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*, 529(7584), 84-87.
- Li, H., Wang, Z., Ke, Q., Ji, C. Y., Jeong, J. C., Lee, H. S., et al. 2014. Overexpression of codA gene confers enhanced tolerance to abiotic stresses in alfalfa. *Plant Physiol. Biochem.* 85, 31–40.
- Li, H., Liu, J.X., Wang, Y., & Zhuang, J. 2020. The ascorbate peroxidase 1 regulates ascorbic acid metabolism in fresh-cut leaves of tea plant during postharvest storage under light/dark conditions. *Plant Science*, 296, 110500, ISSN 0168-9452.
- Li, X., & Brummer, E. C. 2012. Applied genetics and genomics in alfalfa breeding. *Agronomy*, 2(1), 40-61.
- Liebthal, M., Maynard, D., & Dietz, K.F. 2018. Peroxiredoxins and Redox Signaling in Plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, 609-624.
- Lin, S., Norberg, S., & Combs, D. 2021. Genomics of Forage Quality in Alfalfa. *The Alfalfa Genome*, 129-143.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25, 402–8.
- Luque, R.; H.C. Sousa, & J.E. Kraus. 1996. *Acta bot. bras.* 10(2): 199 - 212.
- Lynch, J. 1995. Root architecture and plant productivity. *Plant physiology*, 109(1), 7.

Ma X., Xia H., Liu Y., Wei H., Zheng X., Song C., et al. 2016. Transcriptomic and metabolomic studies disclose key metabolism pathways contributing to well-maintained photosynthesis under the drought and the consequent drought-tolerance in rice. *Front. Plant Sci.* 7.

Ma Q., Xu X., Xie Y., Huang T., Wang W., Zhao L., et al. 2021. Comparative metabolomic analysis of the metabolism pathways under drought stress in alfalfa leaves. *Environ. Exp. Bot.* 183, 104329.

Mahmood, U., Hussain, H. A., Hussain, S., Ashraf, U., Khaliq, A., & Hussain, S. 2019. Submergence stress in rice: Physiological disorders, tolerance mechanisms, and management. In: *Plant abiotic stress tolerance* (pp. 173–189). Springer.

Mano, Y., Omori, F. 2007. Breeding for flooding tolerant maize using "teosinte" as a germplasm resource. *Plant Root*, 1, 17-21.

Mariani, ME & Fidelio, GD. 2019. Secretory Phospholipases A2 in Plants. *Front. Plant Sci.* 10:861.

Marković, J., Štrbanović, R., Cvetković, M., Anđelković, B., & Živković, B. 2009. Effects of growth stage on the mineral concentrations in alfalfa (*Medicago sativa* L.) leaf, stem and the whole plant. *Biotechnology in animal Husbandry*, 25(5-6-2), 1225-1231.

Marquez-Ortiz, J. J., Johnson, L. D., Barnes, D. K., & Basigalup, D. H. 1996. Crown morphology relationships among alfalfa plant introductions and cultivars. *Crop Science*, 36(3), 766-770.

Martínez Callejón, A. 2018. Implicaciones de las hormonas vegetales en respuesta al estrés abiótico.

Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*, 33(4),453-467.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., & Van Breusegem, F. 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, 16, 300–309.

- Miura, K., & Tada, Y. 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in plant science*, 5, 4.
- Mok, M. C. 2019. Cytokinins and plant development—an overview. *Cytokinins*, 155-166.
- Morales, M., & Munné-Bosch, S. 2016. Oxidative stress: a master regulator of plant trade-offs? *Trends in Plant Science*, 21, 996-999,
- Moran, J. F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R. V., and Aparicio-Tejo, P. 1994. Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* 194, 346–352.
- Moslemi, A., Ades, P. K., Groom, T., Nicolas, M. E., & Taylor, P. W. 2018. Influence of waterlogging on growth of pyrethrum plants infected by the crown and root rot pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium avenaceum* and *Paraphoma vinacea*. *Australasian Plant Pathology*, 47, 205-213.
- Munne-Bosch, S., & Peñuelas, J. 2003. Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta* 217, 758–766.
- Nishiuchi, S., Yamauchi, T., Takahashi, H., Kotula, L., & Nakazono, M. 2012. Mechanisms for coping with submergence and waterlogging in rice. *Rice*, 5, 1-14.
- Noctor, G., Veljovic-jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., & Foyer, C.H. 2002. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration?. *Annals of Botany*, 89(7), 841–850
- Odorizzi AS. 2015. Parámetros genéticos, rendimiento y calidad forrajera en alfalfas (*Medicago sativa* L) extremadamente sin reposo con expresión variable del carácter multifoliolado obtenidas por selección fenotípica recurrente. Tesis Doctoral. Argentina: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. 150 p.
- Oosterhuis DM, Scott HD, Hampton RE, Wullschleger SD. 1990. Physiological responses of two soybean (*Glycine max* (L.) Merr) cultivars to short-term flooding. *Environ. Exp. Bot.* 30:85-92.

- Ouyang, S.Q., He, S.J., Liu, P., Zhang, W.K., Zhang, J.S., Chen, S.Y., 2011. The role of tocopherol cyclase in salt stress tolerance of rice (*Oryza sativa*). *Sci. China Life Sci.* 54, 181–188.
- Pan, J., Sharif, R., Xu, X., & Chen, X. 2021. Mechanisms of waterlogging tolerance in plants: Research progress and prospects. *Frontiers in Plant Science*, 11, 627331.
- Pandey, P., Singh, J., Achary, V.M.M., & Reddy, M.K. 2015. Redox homeostasis via gene families of ascorbate-glutathione pathway. *Frontiers in Environmental Science*, 3, 25.
- Peleg, Z., & Blumwald, E. 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current opinion in plant biology*, 14(3), 290-295.
- Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E. J., & Voesenek, L. A. 2006. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in plant science*, 11(4), 176-183.
- Pucciariello, C., Parlanti, S., Banti, V., Novi, G., & Perata, P. 2012. Reactive oxygen species-driven transcription in *Arabidopsis* under oxygen deprivation. *Plant Physiology*, 159, 184–196.
- Richardson, A. D., Duigan, S. P., & Berlyn, G. P. 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New phytologist*, 153(1), 185-194.
- Rivas-San Vicente, M., Plasencia, J. 2011. Salicylic acid beyond defense: its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 62, 3321–3338.
- Rivero, R. M., Mittler, R., Blumwald, E., & Zandalinas, S. I. 2022. Developing climate-resilient crops: improving plant tolerance to stress combination. *The Plant Journal*, 109(2), 373-389.
- Rodríguez, N., & M. C. Spada. 2007. Morfología de la alfalfa. Pp. 29-43 en D. H. Basigalup (ed.). *El cultivo de alfalfa en Argentina*. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Rodríguez, N. E., Eroles, S. F., Basigalup, D. H., Kopp, M. 2022. Origen, difusión, morfología y fenología.
- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., ... & Zhang, K. 2019. Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2479.

- Rupngam, T., & Messiga, A. J. 2024. Unraveling the Interactions between Flooding Dynamics and Agricultural Productivity in a Changing Climate. *Sustainability*, 16(14), 6141.
- Ruzin, S.E. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press. New York: 336.
- Sachdev, S., Ansari, S.A., Ansari, M.I., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M. 2021. Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: Generation, Signalling, and Defense Mechanisms. *Antioxidants (Basel)*, 10(2), 277.
- Salehi-lisar SY, Motafakkerazad R, Hossain MM, Rahman IMM. 2012. Water stress in plants: causes, effects and responses, water stress. In: Ismail Md. Mofi zur Rahman, editor. *InTech*.
- Sambatti JBM, Caylor KK. 2007. When is breeding for drought tolerance optimal if drought is random? *New Phytologist*. 175: 70-80.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L. & Estelle, M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol* 5, 301–307.
- Sapeta H, Costa M, Lourenc T, Marocod J, Van der Linde P, Oliveiraa MM. 2013. Drought stress response in *Jatropha curcas* : growth and physiology. *Environ Exp Bot*. 85:76–84.
- Schreiber, L. 2010. Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in plant science*, 15(10), 546-553.
- Seethepalli, A., & York, L.M. 2020. RhizoVision Explorer - Interactive software for generalised root image analysis designed for everyone (Version 2.0.3). Zenodo.
- Seo, M., & Koshiba, T. 2002. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in plant science*, 7(1), 41-48.
- Sghaier, H., Aloui, A., Khadri, A., Aschi-Smiti, S., & Brouquisse, R. 2020. Effects of combined salt and flooding stresses on the growth and physiological behavior of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *African Journal of Agricultural Research*, 16(6), 758-764.

Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Manivannan P, Panneerselvam R, Shao MA. 2009. Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants - biotechnologically and sustainably improving agriculture and the ecoenvironment in arid regions of the globe. *Crit. Rev. Biotechnol.* 29(2): 131-151.

Sharp, R. E. 2002. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, cell & environment*, 25(2), 211-222.

Shepherd, T., & Wynne Griffiths, D. 2006. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 171(3), 469-499.

Shin, S.Y., Kim, I.S., Kim, Y.S., Lee, H., & Yoon, H.S. 2013. Ectopic expression of *Brassica rapa* L. MDHAR increased tolerance to freezing stress by enhancing antioxidant systems of host plants. *South African Journal of Botany*, 88, 388-400.

Smart, R.E., & Bingham, G.E. 1974. Rapid Estimates of Relative Water Content. *Plant Physiology*, 53, 258-260.

Sojka, R. E. 1992. Stomatal closure in oxygen-stressed plants. *Soil Science*, 154(4), 269-280.

Sonkar, K.S., Achary, V.M.M., Sahoo, S., & Reddy, M.K. 2023. Arockiasamy A. Biochemical and structural characterization of a robust and thermostable ascorbate recycling monodehydroascorbate reductase (MDHAR) from stress adapted pearl millet. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 662, 135-141.

Steffens, B., & Sauter, M. 2010. G proteins as regulators in ethylene-mediated hypoxia signaling. *Plant signaling & behavior*, 5(4), 375-378.

Steffens, B., Steffen-Heins, A., & Sauter, M. 2013. Reactive oxygen species mediate growth and death in submerged plants. *Frontiers in Plant Science*, 4, 179.

Striker, G. G. 2012. Flooding stress on plants: anatomical, morphological and physiological responses. *Botany*, 1(1), 3-28.

Striker, G. G., & Colmer, T. D. 2017. Flooding tolerance of forage legumes. *Journal of experimental botany*, 68(8), 1851-1872.

Sultana, S., Khew, C.Y., Morshed, M.M., Namasivayam, P., Napis, S., & Ho, C.L. 2012. Overexpression of monodehydroascorbate reductase from a mangrove plant (AeMDHAR) confers salt tolerance on rice. *Journal of Plant Physiology*, 169(3), 311-318.

Summers, C. G., & Putnam, D. H. (Eds.). 2008. *Irrigated alfalfa management for Mediterranean and desert zones* (Vol. 3512). UCANR Publications.

Tang, L., Cai, H., Ji, W., Luo, X., Wang, Z., Wu, J., et al. 2013. Overexpression of GsZFP1 enhances salt and drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 71, 22–30.

Tian, L., Li, J., Bi, W., Zuo, S., Li, L., Li, W., & Sun, L. 2019. Effects of waterlogging stress at different growth stages on the photosynthetic characteristics and grain yield of spring maize (*Zea mays* L.) Under field conditions. *Agricultural Water Management*, 218, 250–258.

Truffault, V., Gest, N., Garchery, C., Florian, A., Fernie, A.R., Gautier, H., & Stevens, R.G. 2016. Reduction of MDHAR activity in cherry tomato suppresses growth and yield and MDHAR activity is correlated with sugar levels under high light. *Plant, Cell & Environment*, 39, 1279–1292.

van Veen, H., Akman, M., Jamar, D. C., Vreugdenhil, D., Kooiker, M., van Tienderen, P., et al. (2014). Group VII Ethylene response factor diversification and regulation in four species from flood-prone environments. *Plant Cell Environ.* 37, 2421–2432.

Vanwalleghem, T., Gómez, J. A., Amate, J. I., De Molina, M. G., Vanderlinden, K., Guzmán, G., ... & Giráldez, J. V. 2017. Impact of historical land use and soil management change on soil erosion and agricultural sustainability during the Anthropocene. *Anthropocene*, 17, 13-29.

Vanzant, E. S., & Cochran, R. C. 1994. Performance and forage utilization by beef cattle receiving increasing amounts of alfalfa hay as a supplement to low-quality, tallgrass-prairie forage. *Journal of Animal Science*, 72(4), 1059-1067.

Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology*, 16, 1-10.

Veronesi, F., Brummer, E. C., & Huyghe, C. 2010. Alfalfa. Fodder crops and amenity grasses, 395-437.

Viands D. R., P. Suan, D. K. Barnes, 1988. Pollination control: Mechanical and Sterility. In A.A. Hanson, D. K. Barnes & R. R. Hill, Jr. (ed) Alfalfa and Alfalfa Improvement, Chapter 30. Agronomy Series 29, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, USA, pp. 931-960.

Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. Annual review of phytopathology, 47(1), 177-206.

Voesenek, L. A. C. J., & Sasidharan, R. 2013. Ethylene–and oxygen signalling–drive plant survival during flooding. Plant Biology, 15(3), 426-435.

Voesenek, L. A., & Bailey-Serres, J. 2015. Flood adaptive traits and processes: an overview. New Phytologist, 206(1), 57-73.

Wang, L., Yang, J., Jia, R., Chen, Z., Wang, N., Wu, J., ... & Lin, K. 2024. Infection Process of Alfalfa Root Rot Caused by *Fusarium acuminatum*. Agronomy, 14(9), 2157.

Wang, Z., Ke, Q., Kim, M. D., Kim, S. H., Ji, C. Y., Jeong, J. C., ... & Kwak, S. S. 2015. Transgenic alfalfa plants expressing the sweetpotato *Orange* gene exhibit enhanced abiotic stress tolerance. PLoS One, 10(5), e0126050.

Wasternack, C., & Hause, B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. Annals of botany, 111(6), 1021-1058.

Watkins, J. E., Gray, F. A., & Anderson, B. 1996. Alfalfa crown and root rots and stand longevity. Cooperative Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska--Lincoln.

Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of plant physiology, 144, 307–13.

Westra, S., Alexander, L. V., & Zwiers, F. W. 2013. Global increasing trends in annual maximum daily precipitation. *Journal of climate*, 26(11), 3904-3918.

Wilcox, W. F., & Mircetich, S. M. 1985. Effects of flooding duration on the development of *Phytophthora* root and crown rots of cherry. *Phytopathology*, 75(12), 1451-1455.

Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863), 562-565.

Wilkinson, S., & Davies, W. J. 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, cell & environment*, 33(4), 510-525.

Wu X., Cai K., Zhang G., Zeng F. 2017. Metabolite profiling of barley grains subjected to water stress: To explain the genotypic difference in drought-induced impacts on malting quality. *Front. Plant Sci.* 8.

Xu, X., Wang, H., Qi, X., Xu, Q., & Chen, X. 2014. Waterlogging-induced increase in fermentation and related gene expression in the root of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Scientia Horticulturae*, 179, 388–395.

Xue, D., Zhang, X., Lu, X., Chen, G., & Chen, Z. H. 2017. Molecular and evolutionary mechanisms of cuticular wax for plant drought tolerance. *Frontiers in plant science*, 8, 258957.

Yamaguchi, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59(1), 225-251.

Yan, K., Zhao, S., Cui, M., Han, G., and Wen, P. 2018. Vulnerability of photosynthesis and photosystem I in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) exposed to waterlogging. *Plant Physiol. Biochem.* 125, 239–246.

Yan Z., Chen J., Li X. 2013. Methyl jasmonate as modulator of Cd toxicity in *Capsicum frutescens* var. *fasciculatum* seedlings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 98, pp. 203-209.

Yeh, H. L., Lin, T. H., Chen, C. C., Cheng, T. X., Chang, H. Y., Lee, T. M. 2019. Monodehydroascorbate reductase plays a role in the tolerance of *Chlamydomonas reinhardtii* to photooxidative stress. *Plant and Cell Physiology*, 60(10), 2167-2179.

Yoon J.Y., Hamayun M., Lee S.K., Lee I.J. 2009. Methyl jasmonate alleviated salinity stress in soybean. *J. Crop. Sci. Biotechnol.*, 12, pp. 63-68.

Zeng, N., Yang, Z., Zhang, Z., Hu, L., & Chen, L. 2019. Comparative Transcriptome Combined with Proteome Analyses Revealed Key Factors Involved in Alfalfa (*Medicago sativa*) Response to Waterlogging Stress. *International Journal of Molecular Science*, 20(6), 1359.

Zhang J., Broeckling C. D., Blancaflor E. B., Sledge M. K., Sumner L. W., Wang Z. 2005. Overexpression of WXP1, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant J.* 42, 689–707.

Zhang, P., Lyu, D., Jia, L., He, J., & Qin, S. 2017. Physiological and de novo transcriptome analysis of the fermentation mechanism of *Cerasus sachalinensis* roots in response to short-term waterlogging. *BMC Genomics*, 18, 649.

Zhang X., Zhang L., Dong F., Gao J., Galbraith D. W., & Song, C. P. 2001. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant physiology*, 126(4), 1438-1448.

Zhao, Y. 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*, 61(1), 49-64.

Zhengyuan Xu, Lingzhen Ye, Qiufang Shen, Guoping Zhang. 2023. Advances in studies on waterlogging tolerance in plants. *Journal of Integrative Agriculture*. ISSN 2095-3119.

Zhou, W., Chen, F., Meng, Y., Chandrasekaran, U., Luo, X., Yang, W., & Shu, K. 2020. Plant waterlogging/flooding stress responses: from seed germination to maturation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 228–236.

Zhu, L., Guo, J., Zhu, J., & Zhou, C. 2014. Enhanced expression of EsWAX1 improves drought tolerance with increased accumulation of cuticular wax and ascorbic acid in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 75, 24-35.

Zook, D. M., Erwin, D. C., & Stolzy, L. H. 1986. Anatomical, morphological, and physiological responses of alfalfa to flooding. *Plant and Soil*, 96, 293-296.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

I) Composición de las soluciones utilizadas

FAA: (etanol absoluto, ácido acético glacial, formaldehído, agua desionizada, en proporción 50:5:10:35).

Solución de siembra de ADN y ARN en geles de agarosa: Azul de bromofenol 0,25% (p/v); Sacarosa 40% (p/v).

TAE 1X: Tris-acetato 40 mM (pH 8,0); EDTA 1 mM.

II) Oligonucleótidos utilizados en reacciones de PCR semi-cuantitativa y PCR en tiempo real (qPCR)

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	USO	CAPÍTULO
MsAOF	ACGTGCCCAACAA TAACTCG	q-PCR	1-2
MsAOR	AAATCCACAGCAG GGTTGAG	q-PCR	1-2
MsACCOF	GCATTGGAGGGAC ATCAATC	q-PCR	1-2
MsACCOR	TGGCATCATCCTT CTCTTCC	q-PCR	1-2
MsFA2F	TGATGTCTGCCTT CATCAGC	q-PCR	1-2
MsFA2R	AAGCTTGCTCTGC TCTTTCG	q-PCR	1-2
MsICSF	AGTGCTGCTGAGG AACCATC	q-PCR	1-2
MsICSR	ATGCGATCCTTGC	q-PCR	1-2

	TCCCATT		
MsMDHARF	CGATCTAGAAAAT GGCGGAACATTCA	PCR semicuantitativa	4
MsMDHARR	CGAGTCGACTTAC TGGCAAAAGTAAT	PCR semicuantitativa	4
q-MsMDHAR-F	GGGAGAAAGATTG CTCCAGAA	q-PCR	4
q-MsMDHAR-R	TGTTTCTCCTTTT GCACTAGTCAGA	q-PCR	4
q-AtACTIN-F	GGTAACATTGTGC TCAGTGGTGG	q-PCR	4
q-AtACTIN-R	AACGACCTTAATC TTCATGCTGC	q-PCR	4

III) Figura Suplementaria 1: aplicación del anegamiento.

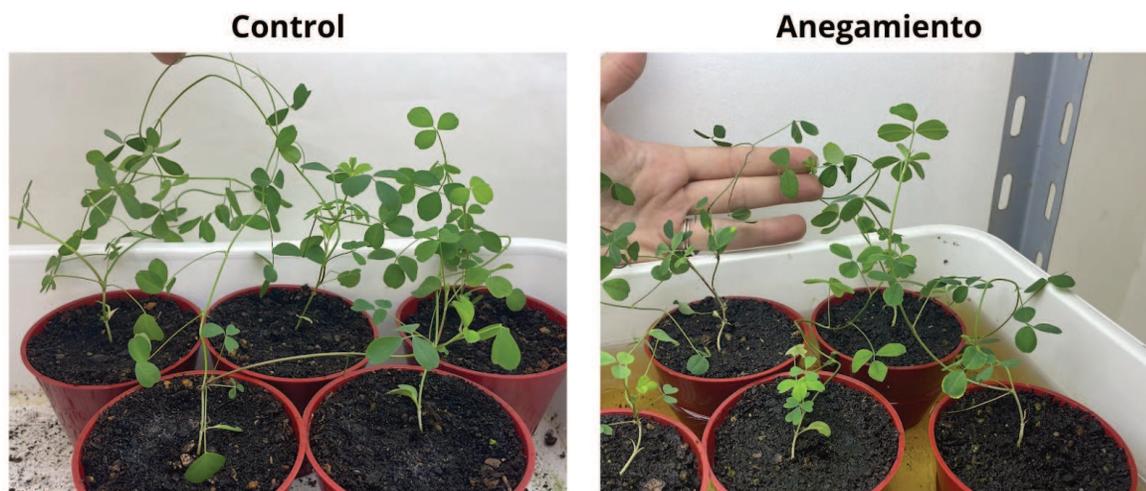


Figura Suplementaria 1. Imagen representativa del material vegetal y aplicación del anegamiento en plantas de alfalfa. Un total de 24 plantas de NK-Vaquera 9, 24 NK-Matrera 8 y 24 Monarca SP INTA 8 fueron cultivadas en cámara de cultivo vegetal con condiciones controladas y riego normal durante 4

semanas, hasta estadio vegetativo temprano. En ese momento la mitad de las plantas fueron inundadas (derecha), mientras que la mitad restante continuó bajo riego normal y fue utilizada como control (izquierda).

IV) Figura Suplementaria 2: ciclo del Asorbato-Glutatión

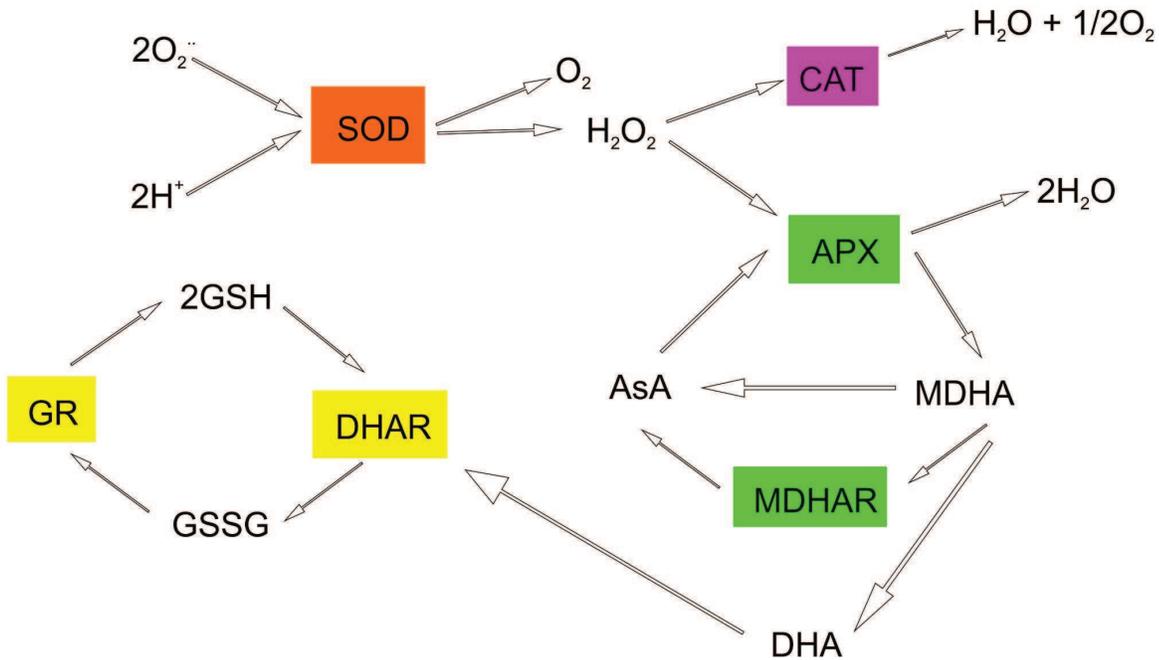


Figura Suplementaria 2. Esquema representativo del ciclo del Asorbato-Glutatión. Este ciclo es clave en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, manteniendo el equilibrio redox celular y la protección contra el estrés oxidativo. AsA: asorbato, APX: asorbato peroxidasa, MDHA: monodehidroascorbato, MDHAR: monodehidroascorbato reductasa, DHA: dehidroascorbato, DHAR: dehidroascorbato reductasa, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, GR: glutatión reductasa. SOD: superóxido dismutasa. CAT: catalasa.