



***Trifolium resupinatum* mantiene la floración y la eficiencia de la simbiosis micorrícica arbuscular bajo exceso hídrico**

YUDITH GARCÍA-RAMÍREZ¹; NOELIA COFRÉ² & ILEANA GARCÍA¹✉

¹Laboratorio de Nutrición Vegetal y Micorrizas Arbusculares, Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia (CONICET). Buenos Aires, Argentina. ²Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (CONICET, FCEfyN), Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

RESUMEN

1. La deficiencia de fósforo, el estrés hídrico y la presencia escasa de leguminosas en la cuenca del Río Salado (Buenos Aires) son factores que limitan la producción de forraje y, por lo tanto, la actividad ganadera regional. *Trifolium resupinatum* surge como una alternativa forrajera promisoría.
2. En este estudio se evaluó la respuesta adaptativa de *T. resupinatum* durante la floración ante condiciones de exceso hídrico, con énfasis en la movilización de fósforo en los tejidos y en la dinámica de su asociación con hongos micorrícicos arbusculares. Se realizó un ensayo en invernáculo con suelo Natracuol típico, comparando plantas adultas sometidas a exceso hídrico (nivel de agua 1 cm por encima del suelo) con un control (80% de capacidad de campo) durante 27 días.
3. El exceso hídrico redujo la biomasa aérea y radical en 34% y 29%, respectivamente, en relación con las plantas control. Las tasas de crecimiento relativo del vástago y de la raíz disminuyeron 25% y 33% respectivamente bajo dicho estrés, mientras que el largo radical específico aumentó 48%.
4. Se observó una disminución en el número de hojas por maceta y un aumento del 173% en la concentración de fósforo en las raíces de las plantas sometidas a exceso hídrico.
5. Los arbuscúlos disminuyeron 44%, mientras que las vesículas y las hifas aumentaron 53% y 35%, respectivamente, bajo exceso hídrico.
6. Implicancias. Estos resultados indican que *Trifolium resupinatum* desarrolla mecanismos adaptativos que le permiten tolerar condiciones de exceso hídrico en un Natracuol típico, posicionándola como una alternativa forrajera viable para la región de la cuenca del Río Salado.

[Palabras clave: trébol persa, estrés hídrico, absorción de fósforo, colonización micorrícica arbuscular]

Abstract. *Trifolium resupinatum* maintains the flowering and the efficiency of arbuscular mycorrhizal symbiosis under water excess

1. Phosphorus deficiency, water stress and the low frequency of legumes in the Salado River basin (Buenos Aires) affect forage production and, thus, livestock activity. *Trifolium resupinatum* L. may be considered a promising forage alternative.
2. This study evaluated the tolerance of *Trifolium resupinatum* at the flowering stage to water excess, focusing on phosphorus mobilization in plant tissues and on the dynamics of its association with arbuscular mycorrhizal fungi. A greenhouse trial was conducted in pots with typical Natracuol soil, comparing adult plants subjected to waterlogging (water level 1 cm above the soil surface) with a control (80% of field capacity) for 27 days.
3. Waterlogging reduced shoot and root biomass by 34% and 29%, respectively, compared to control plants. Relative shoot and root growth rates decreased by 25% and 33%, respectively, under this stress, while specific root length increased by 48%.
4. A decrease in the number of leaves per pot and a 173% increase in root phosphorus concentration were also observed under waterlogging.
5. Arbuscules decreased by 44%, while vesicles and hyphae increased by 53% and 35%, respectively, under waterlogging.
6. Implications. These results indicate that *Trifolium resupinatum* develops adaptive responses that allow it to tolerate water excess in typical Natracuol soils, positioning it as a viable forage alternative for the Salado River basin region.

[Keywords: persian clover, water stress, phosphorus uptake, arbuscular mycorrhizal colonization]

INTRODUCCIÓN

Los pastizales templados de la cuenca del Río Salado (Buenos Aires) están dominados por gramíneas y son una región clave para la cría de ganado bovino en el país. Los suelos presentan una deficiencia marcada de nutrientes —sobre todo, fósforo (P)—, problemas de salinidad o sodicidad y atraviesan períodos que alternan entre el exceso y el déficit hídrico. Estas condiciones limitan el crecimiento vegetal (Mendoza et al. 2016; Seguí 2020) y, por ende, la producción forrajera de la zona. Ante un escenario de cambio climático global, los períodos bajo estrés hídrico son cada vez más frecuentes y de mayor severidad. En estas situaciones, las plantas están sometidas a eventos extremos en diferentes estadios de su crecimiento. Además, la cuenca se caracteriza por una baja presencia de leguminosas, en parte como consecuencia de un pastoreo poco controlado (Jacobo et al. 2006), lo que afecta la calidad del forraje. Esta problemática es coincidente entre los pastizales templados a nivel mundial (Nguyen 2022; Smith et al. 2023). Por lo tanto, se necesita buscar nuevas especies de leguminosas que se adapten a las condiciones de estrés de la cuenca del Río Salado a fin de aumentar la producción forrajera en la zona. La bibliografía establece que *Trifolium resupinatum* L. —trébol persa— es una leguminosa adaptada a climas templados (Spara 2001). Esta especie posee un rápido crecimiento y calidad forrajera, y además presenta cierta capacidad de adaptación a suelos inundados (Gibberd and Cocks 1997; Gibberd et al. 2001). Dichas características convierten a *T. resupinatum* en una especie con posible potencial forrajero para la cuenca. Los estudios previos se centraron en evaluar la tolerancia de *T. resupinatum* en estadios tempranos del crecimiento (plántulas) o en estado vegetativo (Gibberd and Cocks 1997; Gibberd et al. 2001). Por esta razón, es necesario enfocar el estudio de la tolerancia de *T. resupinatum* ante exceso hídrico en suelos de la cuenca y en una etapa más avanzada del desarrollo, como, por ejemplo, la floración. En esta etapa, la planta ya no prioriza el crecimiento vegetativo, sino que ocurren cambios metabólicos y nutricionales destinados a la reproducción que podrían modificar la tolerancia de dicha especie, reduciendo así su capacidad de supervivencia ante estrés según lo descrito por Striker y Colmer (2017).

El exceso hídrico modifica las propiedades del suelo y, por lo tanto, altera el crecimiento

y la nutrición mineral de las plantas (Mendoza et al. 2005; Konnerup et al. 2018; Enkhbat et al. 2023). Uno de los principales efectos del exceso hídrico es la reducción del oxígeno en el suelo (Colmer and Voeselek 2009); en este caso, la raíz es el órgano más afectado (Striker and Colmer 2017; Konnerup et al. 2018; Dalle Carbonare et al. 2023). Otro de los efectos es reducir la absorción de nutrientes (Colmer and Greenway 2011). Sin embargo, algunas plantas tolerantes al exceso hídrico pueden incrementar el crecimiento del tallo y la absorción de nutrientes (García and Mendoza 2008; Colmer and Voeselek 2009), dependiendo si el nivel de fertilidad edáfica permite sustentar las demandas que genera el crecimiento. La disponibilidad de P suele aumentar en suelos inundados por la reducción de hierro y aluminio, que liberan el P previamente adsorbido (Tian et al. 2017; García et al. 2008; García 2021). Asimismo, frente a este estrés, las plantas adoptan diferentes estrategias anatómicas y morfológicas tanto en vástago como en raíces (Gibberd et al. 2001; Mendoza et al. 2005; Antonelli et al. 2019; Enkhbat et al. 2022). En leguminosas tolerantes se ha informado el aumento del largo radical específico y el desarrollo de raíces adventicias; estas estrategias favorecen la absorción de nutrientes y el crecimiento de la planta (García et al. 2008; Enkhbat et al. 2022; Basavaraj et al. 2024). Asimismo, la formación de aerénquima en las raíces es otra estrategia clave que facilita la difusión de gases entre los órganos de la planta y contribuye a su tolerancia (Striker and Colmer 2017; Konnerup et al. 2018).

El exceso hídrico también puede afectar la relación entre las leguminosas y los microorganismos del suelo asociados a sus raíces (Mendoza et al. 2005; García et al. 2008; Loo et al. 2022). En particular, la asociación de leguminosas con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) es interesante dada la importancia de este grupo fúngico en la nutrición vegetal —con énfasis en la nutrición fosforada—, así como su rol en la tolerancia ante diferentes condiciones de estrés (Smith and Read 2008; Chippiano et al. 2021; García 2025). Diversos estudios demostraron que el exceso hídrico puede reducir o inhibir de forma parcial la colonización de las raíces por HMA (Mendoza et al. 2005; Fougnes et al. 2007; García 2025). Esta respuesta varía según el nivel de colonización radical previo al inicio del estrés, la especie vegetal, las características químicas del suelo y la duración y la frecuencia del estrés hídrico al que están expuestas las

raíces de las plantas (Mendoza et al. 2005; Fournies et al. 2007; García and Mendoza 2014; Orchard et al. 2016).

La importancia de los HMA en el desarrollo, la nutrición y la adaptación de las plantas a diferentes condiciones ambientales hace indispensable estudiar el efecto del exceso hídrico sobre la simbiosis entre *T. resupinatum* y la comunidad de HMA específica de cada suelo. Aunque el exceso hídrico es un factor ambiental crítico que puede afectar negativamente la colonización micorrízica, hasta donde hemos podido investigar, no se reportaron estudios que analicen su impacto sobre la colonización radical de *T. resupinatum*.

Otro factor relevante y poco estudiado es el efecto del exceso hídrico sobre la nutrición fosforada en plantas de *T. resupinatum*. Comprender los efectos del exceso hídrico sobre el crecimiento de *T. resupinatum* —con énfasis en la etapa de floración—, la nutrición fosforada y la simbiosis con HMA es fundamental para evaluar la capacidad adaptativa de esta especie frente a un evento de estrés hídrico y de forma integral. Además, es clave para entender cómo podría verse afectada la formación de flores y el posterior desarrollo de semillas, aspectos primordiales en el estudio de la permanencia de la especie en un determinado ambiente.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la respuesta adaptativa de *T. resupinatum* en la etapa de floración ante el exceso hídrico, la movilización de P en tejidos y la dinámica de la asociación con HMA, con el fin de evaluar su tolerancia fisiológica ante estrés hídrico en una etapa del desarrollo de mayor susceptibilidad, y así generar pautas que permitan analizar la factibilidad de dicha especie como un nuevo recurso forrajero para la cuenca del Río Salado. Se proponen las siguientes hipótesis: 1) el exceso hídrico disminuye el crecimiento de *T. resupinatum* en la etapa reproductiva y conduce a cambios morfológicos en el vástago y en el sistema radical que facilitan la absorción de nutrientes, y afecta negativamente la formación de flores, y 2) la colonización por HMA disminuye en las raíces de *T. resupinatum* ante el exceso hídrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se recolectaron muestras de suelo de un pastizal natural en la cuenca del Río Salado

(Chascomús, Buenos Aires) entre 2 y 12 cm de profundidad, en julio de 2023. El suelo fue clasificado como Natracuol típico y presentaba las siguientes características: pH=9.4, conductividad eléctrica=3.5 dS/m, P disponible=4.7 mg/kg, C orgánico=1.60%, N orgánico=0.15% y porcentaje de sodio intercambiable=46.5%. Según la relación entre la conductividad eléctrica y el Na intercambiable, el suelo es clasificado como sódico-no salino. El suelo se secó al aire y luego se tamizó con una malla de 2 mm de diámetro de poro. Se llenaron un total de 15 macetas sin drenaje (0.8 L) con 740 g de suelo. En ellas se sembraron 5 semillas pre-germinadas de *T. resupinatum*. El ensayo comenzó el 16 de agosto de 2023. Las macetas se regaron a diario con agua desionizada a fin de mantener la humedad cercana a la capacidad de campo. Las mismas fueron ubicadas de manera aleatoria en mesadas móviles dentro del invernáculo, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura. La temperatura media diurna fue 30±4 °C; la nocturna, 19±3 °C; la humedad relativa promedio fue 65±15%; el fotoperíodo, 10-12 h y la intensidad lumínica fue 900-1300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (días soleados) y 400-700 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (días nublados) durante el período experimental.

Transcurridos 53 días de crecimiento luego de la siembra, se cosecharon 5 macetas iniciales (T0). Después, 5 de las 10 macetas restantes se inundaron con agua desionizada, manteniendo el nivel de agua 1 cm por encima de la superficie del suelo (tratamiento: exceso hídrico), mientras que las otras 5 macetas se mantuvieron cerca del 80% de la capacidad de campo (tratamiento: control). Las plantas de ambos tratamientos se cultivaron durante 27 días adicionales y luego se las cosechó (Tf). Las plantas control se encontraban en etapa de floración luego de 8 días de tratamiento hídrico; las plantas bajo exceso hídrico, luego de 14 días de iniciado el tratamiento hídrico.

Crecimiento y morfología vegetal

Las plantas se cosecharon separando vástago y raíz. En cada cosecha se cuantificaron las siguientes variables morfológicas: en vástago, el número de flores/maceta, el número de hojas/maceta y la altura del tallo principal (cm). En raíces se midió el largo radical (m).

Se determinó el largo y la superficie radical a través de imágenes escaneadas y procesadas con el programa ImagenJ. Se calculó el largo radical específico como los metros de raíz por

gramo de peso seco radical (Chippiano et al. 2020). La biomasa radical se separó en dos porciones: una se secó en estufa y la otra se destinó a la medición de la colonización por HMA. La biomasa de vástago y raíz remanente se secaron en estufa a 70 °C durante 48 h a fin de determinar el peso seco del vástago (PS vástago) y de la raíz (PS raíz) producido en cada tratamiento.

Se calcularon las tasas de crecimiento relativo de vástago (TCRv) y raíz (TCRr) de las plantas pertenecientes a los tratamientos control y exceso hídrico durante los 27 días de tratamiento. Dicho cálculo fue obtenido con la Ecuación 1, según Mendoza et al. (2005).

$$TCR_i = (\ln PS_{tf} - \ln PS_{t0}) / (tf - t0) \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde *i* representa la variable usada (PS de vástago o raíz), *tf* es el período total de crecimiento (días) desde la germinación (80 días), *t0* es el período inicial de crecimiento de 53 días en capacidad de campo. PS es el peso seco del vástago y la raíz, (*tf-t0*) es la diferencia entre el período total y el período inicial de crecimiento (27días). Para comparar los tratamientos, se asumió que la tasa de crecimiento diaria fue constante durante el período de 27 días del tratamiento.

Medición de P en tejido vegetal

El vástago y sistema radical se molieron por separado y se emplearon en la determinación de la concentración de P en tejido. Cada tejido se digirió en una mezcla de ácido nítrico-perclórico (3:2) para determinar la concentración de P (Jackson 1958). Se calculó el factor de translocación a partir de la Ecuación 2, descrita por Mendoza et al. (2015).

$$FT = \frac{\text{Concentración de P en el vástago}}{\text{Concentración de P en la raíz}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Se calcularon dos eficiencias de la nutrición fosforada entre tratamientos: a) contenido total de P por unidad de peso seco radical, y b) peso seco de vástago por el contenido total de P (García et al. 2008).

Colonización por HMA

La parte radical destinada a la medición de la colonización por HMA se tiñó siguiendo la metodología descrita por Phillips y Hayman (1970). Veinticinco fragmentos de raíces fueron montados en un portaobjeto a fin de medir

el largo radical colonizado de la muestra bajo microscopio óptico con un aumento de 200x (McGonigle et al. 1990). Las variables evaluadas fueron el porcentaje de colonización micorrízica arbuscular (CM%), y de las diferentes estructuras intra- e interradales, la colonización por arbusculos (CA%), por vesículas (CV%) e hifas (CH%). Dado que los arbusculos constituyen el principal sitio de intercambio de nutrientes entre la planta y los HMA, se determinó la eficiencia de la simbiosis micorrízica arbuscular mediante la relación contenido P vástago:%Arbusculos (Di Bella et al. 2019).

Índice de susceptibilidad (IS)

Para todas las variables medidas se estimó el índice de susceptibilidad (IS). Se calculó con la Ecuación 3, según Hilier et al. (1972).

$$IS = 1 - (\text{planta bajo estrés} / \text{planta control}) \quad (\text{Ecuación 3})$$

Si el valor del índice es positivo, el tratamiento produce una disminución en el valor de la variable evaluada con respecto a su valor control, indicando así un efecto negativo en la planta frente al tratamiento. Si el valor del índice es negativo, entonces el tratamiento produce un aumento en el valor de la variable evaluada con respecto a su valor control, indicando un efecto positivo frente al tratamiento.

Análisis estadístico

Las medias se compararon a través de la prueba t de Student ($P < 0.05$). Antes, se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson a fin de cuantificar la asociación entre variables. Para el análisis estadístico de los datos, se empleó el Programa INFOSAT versión 2019.

RESULTADOS

Crecimiento y morfología vegetal

El exceso hídrico provocó una disminución de 34% en el PS del vástago y 29% en la biomasa radical, en relación con las plantas control (Tabla 1). La relación vástago:raíz no evidenció diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Las TCR de vástago y raíz disminuyeron 25% y 33%, respectivamente, en las plantas bajo exceso hídrico, en comparación con las plantas control

Tabla 1. Efecto del exceso hídrico sobre el crecimiento y morfología de *Trifolium resupinatum* luego de 27 días de tratamiento. PS vástago: peso seco de vástago. PS raíz: peso seco de la raíz. TCRv: tasa de crecimiento relativo de vástago. TCRr: tasa de crecimiento relativo del sistema radical. IS: índice de susceptibilidad. Los valores corresponden a la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba t de Student (n=5) (P<0.05). IS=1-(plantas ante exceso hídrico/plantas control). ns: efecto no significativo (P>0.05).

Table 1. Effect of water excess on growth and morphology of *Trifolium resupinatum* under a 27-day period of treatment. PS vástago: shoot dry mass. PS raíz: root dry mass. TCRv: shoot relative growth rate. TCRr: root relative growth rate. IS: susceptibility index. The values correspond to the mean \pm standard error. Different letters indicate significant differences between treatments according to the Student t-test (n=5) (P<0.05). SI=1-(stressed plant/control plant). ns: non-significant effect (P>0.05).

Variables	Plantas control	Plantas con exceso hídrico	IS	Efecto del exceso hídrico	P
PS vástago (g)	1.63 \pm 0.09a	1.07 \pm 0.17b	0.34	-	0.02
PS raíz (g)	0.49 \pm 0.03a	0.34 \pm 0.04b	0.29	-	0.02
Vástago:raíz	2.92 \pm 0.53a	3.16 \pm 0.30a		ns	0.70
TCRv (1/día)	0.07 \pm 0.02a	0.05 \pm 0.01b	0.25	-	0.03
TCRr (1/día)	0.04 \pm 0.002a	0.03 \pm 0.003b	0.33	-	0.02
Largo radical (m)	51.79 \pm 3.38a	55.24 \pm 8.70a		ns	0.72
Largo radical específico (m/g)	106.53 \pm 5.06b	157.29 \pm 14.40a	-0.48	+	0.01
Superficie radical (cm ²)	42.89 \pm 5.17b	66.15 \pm 1.53a	-0.55	+	0.01
Número de flores/maceta	29.40 \pm 4.02a	24.00 \pm 0.55a		ns	0.25
Número de hojas/maceta	87.80 \pm 3.83a	54.60 \pm 4.18b	0.38	-	0.0004
Altura del tallo principal (cm)	28.76 \pm 2.91a	26.76 \pm 1.68a		ns	0.57

(Tabla 1). Sin embargo, se observó correlación positiva entre la TCR y el PS del vástago ($r=0.99$; $P=0.0001$), y negativa entre la TCR y el PS de la raíz ($r=0.99$; $P=0.0001$). El largo radical no mostró diferencias significativas entre los tratamientos estudiados. Sin embargo, el exceso hídrico aumentó 48% el largo radical específico y 55% la superficie radical, con respecto a las plantas control. La morfología de la planta fue afectada por el exceso hídrico en una de las tres variables analizadas. El número de hojas por maceta disminuyó 38% en las plantas bajo exceso hídrico, con respecto a las plantas control (Tabla 1). No

se observaron diferencias significativas en el número de flores por maceta y en la altura del tallo principal, entre los tratamientos analizados.

P en tejido vegetal

El exceso hídrico aumentó 173% la concentración de fósforo (P) en la raíz con respecto al tratamiento control (Tabla 2). No obstante, la concentración de P en la raíz correlacionó negativamente con el PS de la raíz ($r=-0.75$; $P=0.012$) y con la TCR de la raíz ($r=-0.75$; $P=0.012$). Por otro lado, la concentración de P en el vástago de las plantas sometidas

Tabla 2. Efecto del exceso hídrico sobre la absorción de fósforo (P) y la colonización por hongos micorrízicos arbusculares. CM: colonización micorrízica arbuscular, CA: colonización por arbusculos, CV: colonización por vesículas y CH: colonización por hifas en plantas de *Trifolium resupinatum* durante 27 días de tratamiento. FT: factor de translocación. IS: índice de susceptibilidad. Los valores corresponden a la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba t de Student (n=5) (P<0.05). IS = 1 - (plantas bajo exceso hídrico/plantas control). ns: efecto no significativo (P>0.05).

Table 2. Effect of water excess on phosphorus (P) uptake and arbuscular mycorrhizal fungi colonization. CM: arbuscular mycorrhizal colonization, CA: arbuscule colonization, CV: vesicle colonization, CH: hyphae colonization in *Trifolium resupinatum* plants under 27-day period of treatment. Translocation factor (FT) and susceptibility index (IS). The values correspond to the mean \pm standard error. Different letters indicate significant differences between treatments according to the Student t test (n=5) (P<0.05). IS = 1 - (stressed plant/control plant). ns: non-significant effect (P>0.05).

Variables	Plantas control	Plantas con exceso hídrico	IS	Efecto del exceso hídrico	P
P vástago (%)	0.16 \pm 0.01a	0.14 \pm 0.03a		ns	0.46
P raíz (%)	0.11 \pm 0.01b	0.31 \pm 0.03a	-1.73	+	0.0002
FT	1.60 \pm 0.26a	0.43 \pm 0.09b	0.73	-	0.003
P total/PS raíz (mg/g)	6.76 \pm 0.64a	7.26 \pm 0.77a		ns	0.95
PS vástago/P total (g/mg)	0.50 \pm 0.02a	0.50 \pm 0.10a		ns	0.64
CM (%)	84.85 \pm 2.53a	90.23 \pm 1.58a		ns	0.11
CA (%)	50.89 \pm 2.01a	28.62 \pm 2.35b	0.44	-	0.0001
CV (%)	30.21 \pm 2.67b	46.17 \pm 1.19a	-0.53	+	0.0006
CH (%)	17.07 \pm 1.95b	23.09 \pm 1.54a	-0.35	+	0.04
Eficiencia de la simbiosis (mg P/arbúsculos)	0.05 \pm 0.03a	0.04 \pm 0.01a		ns	0.14

a exceso hídrico no presentó diferencias significativas en comparación con las plantas control (Tabla 2). El factor de translocación de P (FT) disminuyó 73% en las plantas bajo exceso hídrico. De igual manera, la cantidad total de P absorbido por unidad de biomasa radical (P total/PS radical) y la biomasa de vástago producida en función del P absorbido (PS vástago/P total) no reflejaron diferencias significativas entre los tratamientos estudiados (Tabla 2). Sí se observaron correlaciones del P total/PS radical y del PS vástago/P total con el largo radical ($r=-0.75$, $P=0.012$ y $r=0.63$, $P=0.05$, respectivamente).

Colonización por HMA

El exceso hídrico no afectó el porcentaje de colonización total, pero sí modificó el porcentaje de colonización de las estructuras intrarradicales analizadas (CA, CV y CH). El exceso hídrico disminuyó un 44% la colonización por arbuscúlos en relación con las plantas control. No obstante, los valores de CV y CH aumentaron ante el exceso hídrico un 53% y 35%, respectivamente, en comparación con las plantas control. En cambio, la eficiencia de la simbiosis no mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos estudiados (Tabla 2). Se encontró una correlación positiva entre la eficiencia de la simbiosis y la concentración P en el vástago ($r=0.73$; $P=0.017$).

DISCUSIÓN

Trifolium resupinatum en etapa de floración ha mostrado capacidad de adaptación ante un período de exceso hídrico de 27 días en un suelo sódico de la cuenca del Río Salado. Si bien la biomasa del vástago y de la raíz disminuyeron bajo dicho estrés, el órgano más afectado fue el vástago, a diferencia de lo establecido antes en la bibliografía (Mendoza et al. 2005; Striker and Colmer 2017; Konnerup et al. 2018). La disminución del tejido vegetal ante exceso hídrico se conlleva con una menor tasa de crecimiento relativo del vástago y del sistema radical; en ambos casos son tasas positivas, lo que indicaría que no hubo muerte de ambos tejidos —en especial, en el sistema radical— por anoxia en el ambiente edáfico. Este aspecto es de suma relevancia, dado que *T. resupinatum*, al encontrarse en floración, no priorizaría el crecimiento vegetativo, sino la asignación de recursos energéticos a reproducción, pudiendo así mantener el número de flores ante exceso hídrico.

En cuanto a las modificaciones en el sistema radical, *T. resupinatum* bajo exceso hídrico mantiene valores de largo radical semejantes a las plantas control. Sin embargo, dichas raíces presentan mayor largo radical específico y superficie radical. Se postula que las mencionadas modificaciones le permitirían a la planta aumentar la superficie de contacto con el suelo, pudiendo así incrementar la absorción de nutrientes ante estrés hídrico. Las modificaciones descritas en el sistema radical de *T. resupinatum* coinciden con resultados previos en diversas especies (García et al. 2008; Elzenga et al. 2010).

Las plantas control y las plantas bajo exceso hídrico alcanzaron valores semejantes de eficiencia tanto de producción de biomasa del vástago (PS vástago/P total) como de absorción de P (P total/PS radical). El incremento del largo específico y superficie radical en las plantas de *T. resupinatum* ante exceso hídrico consiste en una estrategia que les permitiría mantener la eficiencia de absorción de P, en comparación con las plantas control. En mayor medida, parte del P absorbido se concentra en el sistema radical, y en menor medida, es translocado hacia vástago, lo cual se asocia con un menor crecimiento (menor tasa de crecimiento relativo del vástago) bajo exceso hídrico. Más aun, ante dicho estrés, el incremento significativo de la concentración de P en el sistema radical resultaría de la combinación de una disminución en el crecimiento radical y del mantenimiento de la eficiencia de absorción de P en las plantas inundadas, así como el incremento de la disponibilidad del P registrado usualmente en suelos inundados (Mendoza et al. 2005; García et al. 2008; Tian et al. 2017). Este resultado coincide con trabajos previos de *Lotus tenuis* bajo inundación en suelos salino-sódicos (Mendoza et al. 2005; García et al. 2008; García 2021).

Con relación al vástago, si bien en las plantas sometidas a exceso hídrico, el número de hojas por maceta disminuye y la altura del tallo principal es igual al registrado en las plantas control, el número de flores no muestra diferencias entre las plantas control y ante estrés hídrico. La estrategia de *T. resupinatum* ante exceso hídrico consistiría en aumentar la superficie radical de absorción de nutrientes y translocar dichos nutrientes y el carbono preferentemente hacia el vástago, a fin de poder sostener la etapa de floración. Este hallazgo se contrapone al efecto adverso de la inundación sobre la etapa de floración en

diversas leguminosas tales como *Medicago sativa*, *Vicia faba*, *Pisum sativum* y *Lupinus albus*, en las cuales se registró un cese de la floración o la muerte de flores recientemente abiertas (Barta 1980; Pampana et al. 2016). Sobre la base de los resultados obtenidos en el presente trabajo, la primera hipótesis propuesta se rechaza de manera parcial.

El exceso hídrico en el suelo conduce a condiciones de anoxia dadas por el desplazamiento del oxígeno por parte del agua (Konnerup et al. 2018). Específicamente en la zona radicular, el exceso de agua llena los poros del suelo y el intercambio de gases entre la atmósfera y el suelo se ve restringido (Colmer and Voesenek 2009); esto resulta en hipoxia (baja concentración de O₂) y posterior anoxia (ausencia de O₂) en las raíces de las plantas (Colmer and Voesenek 2009). Dichas condiciones afectan el crecimiento de las plantas y las relaciones simbióticas que pueden establecer con microorganismos del suelo (Smith and Read 2008). En el caso de los HMA, la colonización radical puede verse afectada de forma negativa por la inhibición de la germinación de las esporas en un ambiente edáfico anóxico. En consecuencia, la red miceliana es menor y, por ende, disminuye el contacto entre el sistema radical y la comunidad de HMA (Diagne et al. 2020). En particular, en el caso de *T. resupinatum*, la colonización total (CM%) no fue afectada en las raíces bajo exceso hídrico. Dicho hallazgo podría asociarse con un mantenimiento de la comunidad fúngica dentro de las raíces de *T. resupinatum*, a fin de evitar un ambiente edáfico anóxico. Resultados similares se registraron en *Lotus tenuis* en suelos salino-sódicos de la cuenca (García et al. 2008). Por otra parte, el desarrollo fúngico intraradical fue afectado por el exceso hídrico, incrementando tanto la colonización por vesículas (CV%) como por hifas (CH%). Las vesículas constituyen estructuras fúngicas asociadas con la resistencia y la supervivencia, y pueden soportar el crecimiento de hifas intercelulares cuando las condiciones ambientales resulten adecuadas para el crecimiento vegetal (Smith and Read 2008). En el presente trabajo, el incremento de la colonización por vesículas bajo exceso hídrico mostraría la tendencia de los HMA a invertir más energía en el desarrollo de estructuras de reserva necesarias para la supervivencia. En este sentido, el mantenimiento de la colonización radical (CM%) sería el resultado del incremento en la colonización por vesículas como por hifas, pudiendo

las raíces de *T. resupinatum* contribuir a la conservación de la comunidad de HMA ante un evento de inundación. Dichos resultados son coincidentes con registros previos en *Lotus tenuis* (García et al. 2008; García 2021). Los resultados obtenidos permiten rechazar la segunda hipótesis propuesta.

Otro aspecto para destacar del presente estudio es el mantenimiento de la eficiencia de la simbiosis (mg P/arbúsculos) bajo exceso hídrico, a pesar de la disminución de la colonización por arbúsculos. Los arbúsculos constituyen el sitio de intercambio por excelencia de nutrientes y carbono entre la comunidad de HMA y la planta (Smith and Read 2008). Por lo tanto, una disminución en la colonización por arbúsculos permitiría hipotetizar cambios en la funcionalidad de la simbiosis ante estrés hídrico. En nuestro estudio, las hifas intraradicales podrían actuar también como sitio de intercambio, según lo describieron Ryan et al. (2003), de forma tal que contribuirían a mantener la colonización y la funcionalidad de la simbiosis bajo estrés hídrico. Asimismo, la eficiencia de la simbiosis micorrízica arbuscular se encuentra asociada de manera positiva a la concentración de P en el vástago. Teniendo en cuenta la disminución de la colonización por arbúsculos y la no diferencia en la eficiencia de la simbiosis entre las plantas control y ante exceso hídrico, sería necesario llevar a cabo estudios específicos que permitan dilucidar el rol de la comunidad de HMA en el crecimiento y la nutrición fosforada de *T. resupinatum* en etapa reproductiva y ante exceso hídrico.

Trabajos previos reportaron que las raíces de *T. resupinatum* se encontraban noduladas ante condiciones de buen riego e inundadas (Gibberd et al. 2001; Denton et al. 2002). En el presente trabajo no se observaron nódulos en las raíces de *T. resupinatum* en ningún tratamiento. Esto permite hipotetizar que esta especie no logró establecer una relación simbiótica con los rizobios nativos presentes en el suelo ensayado. Será necesario plantear futuros ensayos en los cuales las semillas de *T. resupinatum* sean inoculadas previamente con bacterias fijadoras de nitrógeno, a fin de evaluar los posibles cambios en la nodulación ante exceso hídrico.

Trifolium resupinatum en etapa de floración tolera el exceso hídrico en condiciones controladas a partir de modificar el sistema radical. Esto le permite mantener la eficiencia de absorción de P y la producción de biomasa

aérea. Un aspecto clave es mantener la etapa de floración bajo inundación, lo cual le confiere una ventaja como posible recurso forrajero para la cuenca. Además, bajo estrés, esta especie mostró capacidad de albergar a la comunidad nativa de HMA en sus raíces, pudiendo también ser considerada como especie trampa de dicho grupo fúngico. Se destaca la necesidad de validar los resultados obtenidos en ensayos a campo a fin de evaluar

la adaptabilidad agronómica de *T. resupinatum* en escenarios productivos reales.

AGRADECIMIENTOS. Este trabajo fue subsidiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina (PICT 2020-01901) y por CONICET (PIP 0670). Asimismo, agradecemos a Ana Deluca por su valiosa colaboración en el mantenimiento del ensayo.

REFERENCIAS

- Antonelli, C. J., P. I. Calzadilla, J. M. Vilas, M. P. Campestre, F. J. Escaray, and O. A. Ruiz. 2019. Physiological and anatomical traits associated with tolerance to long-term partial submergence stress in the *Lotus* genus: Responses of forage species, a model and an interspecific hybrid. *Journal of Agronomy and Crop Science* 205:65-76. <https://doi.org/10.1111/jac.12303>.
- Barta, A. L. 1980. Regrowth and alcohol dehydrogenase activity in waterlogged alfalfa and birdsfoot trefoil 1. *Agronomy Journal* 72:1017-1020. <https://doi.org/10.2134/agronj1980.00021962007200060036x>.
- Basavaraj, P. S., K. K. Jangid, R. Babar, V. M. Gangana Gowdra, A. Gangurde, S. Shinde, and M. Prabhakar. 2024. Adventitious root formation confers waterlogging tolerance in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Frontiers in Sustainable Food Systems* 8:1373183. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2024.1373183>.
- Chippano, T., I. García, N. Cofré, and R. Mendoza. 2020. Forage biomass yield and arbuscular mycorrhizal symbiosis in a legume and C3 and C4 grasses under increasing soil phosphorus availability. *Crop and Pasture Science* 71:907-915. <https://doi.org/10.1071/cp20030>.
- Chippano, T., R. Mendoza, N. Cofré, and I. García. 2021. Divergent root P uptake strategies of three temperate grassland forage species. *Rhizosphere* 17:100312. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100312>.
- Colmer, T. D., and L. A. C. J. Voesenek. 2009. Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Functional Plant Biology* 36:665-681. <https://doi.org/10.1071/FP09144>.
- Dalle Carbonare, L., J. D. L. C. Jimenez, S. Lichtenauer, and H. van Veen. 2023. Plant responses to limited aeration: advances and future challenges. *Plant Direct* 7:e488. <https://doi.org/10.1002/pld3.488>.
- Denton, M. D., D. R. Coventry, P. J. Murphy, J. G. Howieson, and W. D. Bellotti. 2002. Competition between inoculant and naturalised *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* for nodulation of annual clovers in alkaline soils. *Australian Journal of Agricultural Research* 53:1019-1026. <https://doi.org/10.1071/AR01138>.
- Di Bella, C. E., P. A. García-Parisi, F. A. Lattanzi, M. Druille, H. Schnyder, and A. A. Grimoldi. 2019. Grass to legume facilitation in saline-sodic steppes: influence of vegetation seasonality and root symbionts. *Plant and Soil* 443:509-523. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04247-y>.
- Diagne, N., M. Ngom, P. I. Djighaly, D. Fall, V. Hocher, and S. Svistoonoff. 2020. Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and performance: importance in biotic and abiotic stressed regulation. *Diversity* 12:370. <https://doi.org/10.3390/d12100370>.
- Elzenga, J. T. M., and H. van Veen. 2010. Waterlogging and plant nutrient uptake. Pp. 23-35 en S. Mancuso and S. Shabala (eds.). *Waterlogging signalling and tolerance in plants*. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-10305-6_2.
- Enkhbat, G., M. H. Ryan, P. G. Nichols, K. J. Foster, Y. Inukai, and W. Erskine. 2022. Petiole length reduction is an indicator of waterlogging stress for *Trifolium subterraneum* ssp. *yanninicum*. *Plant and Soil* 475:645-667. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05404-6>.
- Enkhbat, G., Y. Inukai, P. G. Nichols, J. Pang, W. Erskine, K. J. Foster, and M. H. Ryan. 2023. Response to water-deficit following waterlogging varies among ecotypes of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* ssp. *yanninicum*), a waterlogging-tolerant annual pasture legume. *Annals of Applied Biology* 183:287-301. <https://doi.org/10.1111/aab.12856>.
- Fougnies, L., S. Renciot, F. Muller, C. Plenchette, Y. Prin, S. M. De Faria, and A. M. Bâ. 2007. Arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation improve flooding tolerance in *Pterocarpus officinalis* Jacq. seedlings. *Mycorrhiza* 17:159-166. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0085-2>.
- García, I. 2025. *Lotus tenuis* in association with arbuscular mycorrhizal fungi is more tolerant to partial submergence than to high-intensity defoliation. *International Journal of Plant Biology* 16:47. <https://doi.org/10.3390/ijpb16020047>.
- García, I. V. 2021. *Lotus tenuis* and *Schedonorus arundinaceus* co-culture exposed to defoliation and water stress. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo* 53:100-108. <https://doi.org/10.48162/rev.39.044>.
- García, I., and R. Mendoza. 2014. *Lotus tenuis* seedlings subjected to drought or waterlogging in a saline sodic soil. *Environmental and Experimental Botany* 98:47-55. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.10.002>.
- García, I., R. Mendoza, and M. C. Pomar. 2008. Deficit and excess of soil water impact on plant growth of *Lotus tenuis* by affecting nutrient uptake and arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* 304:117-131. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9526-8>.
- Gibberd, M. R., and P. S. Cocks. 1997. Effect of waterlogging and soil pH on the micro-distribution of naturalised annual

- legumes. *Australian Journal of Agricultural Research* 48:223-230. <https://doi.org/10.1071/A96074>.
- Gibberd, M. R., J. D. Gray, P. S. Cocks, and T. D. Colmer. 2001. Waterlogging tolerance among a diverse range of *Trifolium* accessions is related to root porosity, lateral root formation and 'aerotropic rooting'. *Annals of Botany* 88: 579-589. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1506>.
- Hiler, E. A., C. H. M. Van Babel, M. M. Hossain, and W. R. Jordan. 1972. Sensitivity of Southern peas to plant water deficit at three growth stages. *Agronomy Journal* 64:60-64. <https://doi.org/10.2134/agronj1972.00021962006400010020x>.
- Jackson, M. L. 1958. Soil chemical analysis. Pp. 80 en C. A. Black, D. D. Evans, J. R. White, G. E. Ensminger and F. E. Clarck (eds.). *Method of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- Jacobo, E. J., Rodríguez, A. M., Bartoloni, N., and V. A. Deregibus. 2006. Rotational grazing effects on rangeland vegetation at a farm scale. *Rangeland Ecology and Management* 59(3):249-257. <https://doi.org/10.2111/05-129R1.1>.
- Konnerup, D., G. Toro, O. Pedersen, and T. D. Colmer. 2018. Waterlogging tolerance, tissue nitrogen and oxygen transport in the forage legume *Melilotus siculus*: a comparison of nodulated and nitrate-fed plants. *Annals of Botany* 121:699-709. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx202>.
- Loo, W. T., K. O. Chua, P. Mazumdar, A. Cheng, N. Osman, and J. A. Harikrishna. 2022. Arbuscular mycorrhizal symbiosis: a strategy for mitigating the impacts of climate change on tropical legume crops. *Plants* 11:2875. <https://doi.org/10.3390/plants11212875>.
- McGonigle, T. P., M. H. Miller, D. G. Evans, G. L. Fairchild, and J. A. Swan. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115:495-501. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x>.
- Mendoza, R. E., I. V. García, L. de Cabo, C. F. Weigandt, and A. F. de Iorio. 2015. The interaction of heavy metals and nutrients present in soil and native plants with arbuscular mycorrhizae on the riverside in the Matanza-Riachuelo River Basin (Argentina). *Science of the Total Environment* 505:555-564. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.105>.
- Mendoza, R., M. Bailleres, I. García, and O. Ruiz. 2016. Phosphorus fertilization of a grass-legume mixture: effect on plant growth, nutrients acquisition and symbiotic associations with soil microorganisms. *Journal of Plant Nutrition* 39:691-701. <https://doi.org/10.1080/01904167.2015.1087032>.
- Mendoza, R., V. Escudero, and I. García. 2005. Plant growth, nutrient acquisition and mycorrhizal symbioses of a waterlogging tolerant legume (*Lotus glaber* Mill.) in a saline-sodic soil. *Plant and Soil* 275:305-315. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-2501-3>.
- Nguyen, T. T., S. Navarrete, D. J. Horne, D. J. Donaghy, and P. D. Kemp. 2022. Incorporating plantain with perennial ryegrass-white clover in a dairy grazing system: dry matter yield, botanical composition, and nutritive value response to sowing rate, plantain content and season. *Agronomy* 12:2789. <https://doi.org/10.3390/agronomy12112789>.
- Orchard, S., R. J. Standish, D. Nicol, V. V. S. R. Gupta, and M. H. Ryan. 2016. The response of fine root endophyte (*Glomus tenue*) to waterlogging is dependent on host plant species and soil type. *Plant and Soil* 403:305-315. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2804-6>.
- Pampana, S., A. Masoni, and I. Arduini. 2016. Response of cool-season grain legumes to waterlogging at flowering. *Canadian Journal of Plant Science* 96:597-603. <https://doi.org/10.1139/cjps-2015-0268>.
- Phillips, J. M., and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-181. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3).
- Ryan, M. H., M. E. McCully, and C. X. Huang. 2003. Location and quantification of phosphorus and other elements in fully hydrated, soil-grown arbuscular mycorrhizas: a cryo-analytical scanning electron microscopy study. *New Phytologist* 160:429-441. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1611-7>.
- Seguí, M. 2020. Evaluación de la respuesta a la fertilización otoñal en la Estepa de Halófitas de un pastizal de la Cuenca del Salado. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata. Pp. 4-6.
- Smith, J. T., B. W. Allred, C. S. Boyd, K. W. Davies, A. R. Kleinhesselink, S. L. Morford, and D. E. Naugle. 2023. Fire needs annual grasses more than annual grasses need fire. *Biological Conservation* 286:110299. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2023.110299>.
- Smith, S. E., and D. J. Read. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press.
- Spara, A. F. 2001. Evaluación agronómica de tres especies del género *Trifolium* de reciente introducción en la Argentina. I: Determinación de la producción de forraje. II: Estimación de la capacidad simbiótica. Ingeniero Agrónomo (tesis doctoral). Universidad Nacional de Luján. Pp. 5-6.
- Striker, G. G., and T. D. Colmer. 2017. Flooding tolerance of forage legumes. *Journal of Experimental Botany* 68:1851-1872. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw239>.
- Tian, J., G. Boitt, A. Black, S. Wakelin, L. M. Condron, and L. Chen. 2017. Accumulation and distribution of phosphorus in the soil profile under fertilized grazed pasture. *Agriculture Ecosystems and Environment* 239:228-235. <https://doi.org/10.3390/biology10020158>.
- Tian, J., G. Dong, R. Karthikeyan, L. Li, and R. D. Harmel. 2017. Phosphorus dynamics in long-term flooded, drained, and reflooded soils. *Water* 9(7):531. <https://doi.org/10.3390/w9070531>.