



Universidad Nacional de Luján

Respuesta de *Gleditsia triacanthos* L. a factores propios de las zonas ribereñas. Experimentos sobre condiciones de emergencia y supervivencia de renovales.



Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas

María Laura Cvitanich

Directora: Dra. Patricia Gantes
Codirector: Dr. Ezequiel Larraburu

2021

Índice

Resumen	I
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Introducción	2
1.2 Objetivos e hipótesis	4
Capítulo 2. Materiales y Métodos	
2.1 Módulos de inundación	6
2.2 Recolección y tratamiento de frutos	7
2.3 Tratamiento de semillas y proceso de siembra	8
2.4 Sustrato y contenido de humedad	9
2.5 Primer ensayo: Inundaciones breves en semillas	10
2.6 Segundo ensayo: Inundaciones breves en plántulas	11
2.7 Tercer ensayo: Inundaciones prolongadas en plántulas	14
2.8 Parámetros estimados y tratamiento de datos	15
Capítulo 3. Resultados	
3.1 Efectos de inundaciones breves en la germinación y emergencia de plántulas	19
3.2 Efectos de inundaciones breves en la supervivencia y desarrollo de plántulas	21
3.3 Efectos de inundaciones prolongadas en la supervivencia y desarrollo de plántulas	25
Capítulo 4. Discusión	
4.1 Germinación, emergencia y supervivencia de plántulas	31
4.2 Efectos de las inundaciones en el crecimiento y morfología de la parte aérea de las plántulas	32
4.3 Efectos de las inundaciones en el crecimiento y morfología de la parte subterránea de las plántulas	33
4.4 La situación de ribera	34
Capítulo 5. Conclusiones	
Conclusiones y consideraciones finales	37

Referencias bibliográficas	38
----------------------------	----

Anexos

Anexo I	Método de estimación de la humedad del sustrato	44
Anexo II	Contenido óptimo de humedad del sustrato para la germinación	46

Resumen

Los ecosistemas de ribera son propensos a la invasión de especies vegetales exóticas y cuando son invadidos, pueden alterarse su funcionamiento y los servicios ecosistémicos que brindan. Los eventos de inundación que se dan con frecuencia en estos ambientes, constituyen un factor determinante en el establecimiento y distribución de las especies vegetales. Durante una inundación las plantas experimentan dificultades para realizar el intercambio gaseoso y se enfrentan a la deficiencia de oxígeno, que pone en riesgo su desarrollo y supervivencia. La susceptibilidad que presentan las plantas al estrés por déficit de oxígeno depende de la edad de la planta, el estado de desarrollo, el momento del año y la intensidad de la inundación. *Gleditsia triacanthos* L., una especie leñosa de la familia Fabaceae también conocida como acacia negra, es considerada invasora en Argentina y ha invadido amplios sectores de ribera del río Luján, un río de llanura que sale de su cauce varias veces al año.

Para evaluar cómo las inundaciones frecuentes afectan la germinación y emergencia de plántulas y cuál es el impacto sobre las plántulas que son cubiertas completamente por el agua de inundación, se llevó a cabo una serie de experimentos en invernáculo. Los frutos se recolectaron en varios sitios de la ribera del río Luján entre las localidades de Luján y Pilar, luego fueron almacenados y las semillas se extrajeron al momento de realizar cada ensayo. Las semillas escarificadas mecánicamente se sembraron en sustrato de ribera previamente secado en estufa y tamizado. Para simular las inundaciones, se utilizaron potes plásticos de dos tamaños. Los potes de menor tamaño contuvieron el sustrato y fueron colocados dentro de los potes de mayor tamaño con agua de río por períodos de duración variable. Las inundaciones consistieron en inundaciones totales, sin recambio de agua ni oxigenación; previamente y posteriormente a los períodos de inundación, la humedad del sustrato se mantuvo al 75 % de su capacidad de retención. Se evaluó el efecto de inundaciones breves (24, 48 y 72 h) sobre la germinación y emergencia de plántulas, y el efecto de inundaciones breves (24, 48 y 72 h) e inundaciones prolongadas (seis y diez días) sobre la supervivencia de plántulas. Se midieron distintas variables morfológicas en las plántulas que sobrevivieron.

Las inundaciones breves favorecen el proceso de germinación de semillas y emergencia de plántulas, obteniéndose los máximos valores de emergencia de plántulas frente a inundaciones de 24 h. Todas las plántulas sobrevivieron a períodos de inundación breves, sólo 25 % sobrevivieron a las inundaciones de seis días y ninguna sobrevivió a diez días de inundación, como se observa en otros trabajos de especies leñosas, la supervivencia disminuye progresivamente con la prolongación del tiempo de inundación. Las plántulas que sobrevivieron a los períodos de inundación mostraron variadas respuestas a nivel morfológico, pero en todas se observó menor área foliar, indicando que

el estrés por inundación tiene un efecto negativo en el desarrollo de las plántulas. Las respuestas de las plántulas a las inundaciones y el desempeño que tengan posterior al estrés, son factores claves que determinan el éxito de una especie en la colonización de nuevos hábitats de ribera. Los resultados obtenidos sugieren que las inundaciones frecuentes que se dan en el río Luján favorecen la germinación y emergencia de plántulas de acacia negra, etapas claves en la colonización de un nuevo ambiente.

Capítulo 1

Introducción

1.1 Introducción

Las riberas de ríos y arroyos son zonas de transición entre el ambiente terrestre y acuático, son ecosistemas altamente heterogéneos, dinámicos y diversos, que cumplen importantes funciones en el mantenimiento de la integridad ecológica de las cuencas. Los ecosistemas de ribera proveen hábitat a una gran diversidad de especies, son corredores biológicos para el movimiento de animales y dispersión de plantas. A su vez estabilizan los márgenes, brindan protección frente a crecientes, retienen sedimentos y controlan el flujo de agua, materia orgánica, nutrientes y contaminantes hacia los cauces (Cummins, 1974; Light *et al.*, 2002; Naiman *et al.* 2005; Pollen-Bankhead y Simon, 2010).

Los ecosistemas de ribera son propensos a la invasión de especies vegetales exóticas. La dispersión de propágulos facilitada por los ríos, el aporte continuo de sedimentos ricos en nutrientes y la presencia de una capa freática superficial que puede ayudar a aliviar el estrés hídrico, generan condiciones favorables para el asentamiento de nuevas plantas (Castro-Díez *et al.* 2014). Los procesos de erosión, sedimentación, así como las crecidas de los ríos que destruyen parte de la vegetación, generan continuamente hábitats nuevos, dando la oportunidad de asentamiento a nuevas especies (Fridley, 2011; Castro-Díez *et al.*, 2014). Particularmente en estas condiciones son favorecidas las especies invasoras con alta disponibilidad de propágulos, el éxito en el establecimiento depende de sus características intrínsecas y también de que las condiciones ambientales a las que arriban las semillas sean adecuadas, permitiendo la germinación y supervivencia de plántulas (McAlpine y Jesson, 2008). Cuando las riberas son invadidas por plantas exóticas, cambia tanto la estructura de la vegetación como el funcionamiento y los servicios ecosistémicos que brindan (Richardson *et al.*, 2007; Castro-Díez *et al.*, 2014).

La vegetación de ribera forma un complejo mosaico que responde a gradientes de nutrientes, disturbios, humedad del sustrato y clima, pero dentro de una misma región biogeográfica los procesos fluviales e hidrológicos son los que tienen mayor impacto en los patrones de distribución (Richardson *et al.*, 2007). La frecuencia e intensidad de los eventos de inundación constituyen un factor determinante en el establecimiento y distribución de las especies vegetales (Ferreira y Stohlgren, 1999; Vervuren *et al.*, 2003). Dentro de la cuenca de un río, los eventos de inundación pueden visualizarse en un gradiente transversal, que va desde el curso de agua hacia las tierras más elevadas (Ward *et al.*, 2002). La frecuencia de inundación es máxima inmediatamente por encima del nivel de base del río y disminuye hasta ser casi nula en la terraza alta, que solamente se inunda ante crecientes extraordinarias, que se dan en intervalos de hasta varios años. En este mismo sentido disminuye el tiempo en que permanece el sustrato saturado.

Las inundaciones afectan las plantas de la ribera de dos maneras, por un lado, pueden ocasionarles daños físicos y por otro alterar su metabolismo (Richardson *et al.*, 2007). Cuando las plantas son cubiertas parcial o completamente por el agua de inundación,

experimentan dificultades para realizar el intercambio gaseoso y se enfrentan a la deficiencia de oxígeno, el metabolismo aeróbico se reduce ampliamente y la falta de energía pone en riesgo la supervivencia y el desarrollo (Crawford y Braendle, 1996). La mayoría de las especies leñosas que crecen en hábitats que se inundan frecuentemente, son tolerantes a las inundaciones, pero la susceptibilidad que presentan al estrés por déficit de oxígeno depende de la edad de la planta, el estado de desarrollo, el momento del año y la intensidad de la inundación (Kozlowski y Pallardy, 2002). Muchas de estas especies presentan una rápida y elevada germinación luego de la sumersión de sus semillas, pero si la inundación se prolonga, tanto la germinación como la emergencia de plántulas son afectadas negativamente (Kozlowski, 1997). Al mismo tiempo, el impacto de las inundaciones sobre plántulas suele ser mayor que en ejemplares adultos porque es más probable que sufran una sumersión total (Kabrick *et al.*, 2012).

Gleditsia triacanthos L. (Fabaceae, Caesalpinioideae) también conocida como acacia negra, es una especie arbórea nativa del centro y este de Estados Unidos donde habita zonas ribereñas, llanuras de inundación y fondos de valles. Para tener un buen desarrollo, en términos generales, requiere completa exposición solar, suelos con abundante contenido de humedad y profundos para poder desarrollar adecuadamente su extenso sistema radical. Sin embargo, también se adapta fácilmente a distintos suelos, resiste la sequía, soporta heladas y un amplio rango de climas (Blair, 1990; Benedetti *et al.*, 2000; Csurhes y Markula, 2010; Fernandez *et al.*, 2017). Se estima que se introdujo en Argentina hacia fines del siglo XVIII y fue utilizada como cerco natural, pero rápidamente se naturalizó y empezó a expandirse (Prieto *et al.*, 2004).

Hoy en día la acacia negra se considera una especie invasora en Uruguay y varias provincias del norte, centro y este de Argentina. Se ha establecido exitosamente en pastizales, bosques, zonas ribereñas, bordes de rutas y caminos, áreas periurbanas y campos agrícolas (Ghersa *et al.*, 2002; Kalesnik y Malvarez, 2003; Chaneton *et al.*, 2004; Nebel y Porcile, 2006; Giorgis y Tecco, 2014; Fernandez *et al.*, 2017). En la provincia de Buenos Aires, ha invadido amplios sectores de la cuenca del río Luján, principalmente las riberas del río y algunos arroyos (Cappello y de la Peña, 2007; Leggieri, 2010; Gantes *et al.*, 2011; Giorgi, 2014). Como especie pionera, probablemente se ha beneficiado de las perturbaciones que generan las inundaciones en estos ambientes y ha encontrado condiciones favorables para su establecimiento (Csurhes y Markula, 2010; Fernandez *et al.*, 2017).

La acacia negra ha sido categorizada como una especie moderadamente tolerante a la anegación del suelo, esto quiere decir que tanto las plántulas como los ejemplares adultos tienen la habilidad de sobrevivir en suelos inundados durante la época de crecimiento (Hook, 1984). Pero no se sabe con certeza cual es el efecto de las inundaciones en la germinación y emergencia de plántulas, etapas claves en la colonización de un nuevo hábitat. Ni tampoco cuál es el impacto de las inundaciones en

las plántulas que logran establecerse en la ribera, en sitios que de acuerdo a su distancia del cauce, se inundan frecuentemente y son cubiertas completamente por el agua de inundación.

El elevado valor ecológico de las riberas, junto a la vulnerabilidad que presentan a la invasión por plantas exóticas, obligan a poner foco en las especies que amenazan estos ecosistemas (Castro-Díez *et al.*, 2014). Se han investigado diversos aspectos de la invasión de acacia negra en Argentina, ecorregiones y ambientes invadidos, dinámicas de invasión, impactos sobre la flora, fauna y algunos procesos ecosistémicos (Fernandez *et al.*, 2017). Pero se desconocen aspectos importantes de su respuesta al principal factor de estrés en la ribera, las inundaciones. El presente estudio comprende una serie de experimentos que se realizaron en invernáculo, para evaluar el efecto de períodos de inundación de diferente duración sobre la germinación, emergencia, supervivencia y desarrollo de plántulas. El conocimiento de la respuesta de la acacia negra frente a estos eventos podría ser útil para identificar las zonas de la ribera más vulnerables a la invasión y poder mejorar las medidas de control de esta especie invasora.

1.2 Objetivos e hipótesis

Hipótesis de trabajo

- Inundaciones breves favorecen la germinación y emergencia de plántulas de acacia negra
- Las inundaciones breves no afectan la supervivencia y morfología de plántulas de acacia negra
- Las inundaciones prolongadas disminuyen la supervivencia y afectan la morfología de plántulas de acacia negra.

Objetivo general

Investigar por medio de experimentos en laboratorio la relación entre el tiempo que permanece el sustrato anegado y la germinación y supervivencia de plántulas de *Gleditsia triacanthos* L. (acacia negra).

Objetivos específicos

- Objetivo 1: Determinar la respuesta de la germinación de semillas de acacia negra y emergencia de plántulas a distintos períodos (24, 48 y 72 h) de saturación del sustrato.
- Objetivo 2: Determinar la supervivencia de plántulas sometidas a períodos breves (24, 48 y 72 h) de inundación.
- Objetivo 3: Determinar la supervivencia de plántulas sometidas a períodos prolongados (6 y 10 días) de inundación.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1 Módulos de inundación

Los módulos de inundación se diseñaron y crearon considerando la especie en estudio y sus requerimientos para la germinación y desarrollo de plántulas. A la vez se tuvo en cuenta que posibilitaran el uso de sustrato de ribera, permitieran el ingreso y egreso del agua de inundación, fueran sencillos para su manipulación y facilitaran una adecuada toma de datos.

Cada módulo de inundación consistió en un par de envases de distinto tamaño, el envase de menor tamaño es el que contuvo el sustrato y permitió la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas, el envase de mayor tamaño sólo se utilizó durante los eventos de inundación, alojó en su interior al pote de menor tamaño y contuvo el agua de inundación. Específicamente, los envases de mayor tamaño, denominados en lo que sigue “contenedores”, se elaboraron con botellas plásticas transparentes de 2,25 l a las cuales se les removió la parte superior. Los envases de menor tamaño, denominados “potes”, se elaboraron con vasos de polipropileno de 350 ml de capacidad, que fueron perforados en su totalidad con orificios de 2-3 mm de diámetro distantes 1-1,5 cm entre sí aproximadamente. Los pots se pintaron por fuera de color negro para recrear condiciones de oscuridad en el sustrato (figura 1).

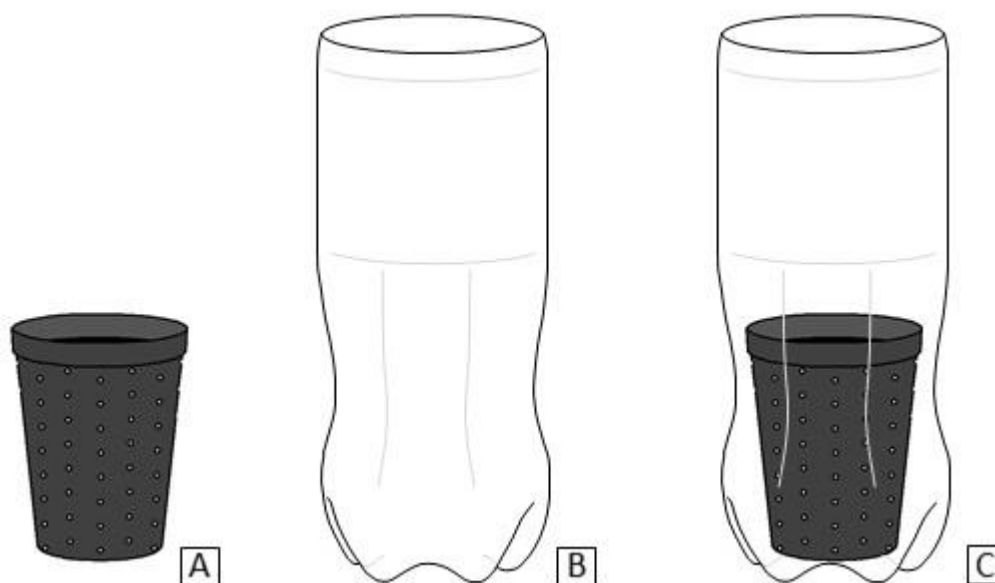


Figura 1. Imágenes a modo ilustrativo de un pote (A) y un contenedor (B). Durante los eventos de inundación, cada pote se colocó dentro de un contenedor constituyendo un módulo de inundación (C).

Para medir el efecto de las inundaciones sobre la germinación y emergencia de plántulas, en lugar de pots negros simples, se emplearon pots dobles que encajaban uno dentro de otro. El pote del interior, color transparente, contuvo el sustrato y permitió la observación de las semillas y el eventual registro de la emisión de radícula y emergencia de hipocotile. El pote externo, color negro, evitó que la luz incidiera directamente sobre las

semillas o raíces (figura 2). Durante los eventos de inundación, cada pote doble se colocó dentro de un contenedor constituyendo un módulo de inundación.

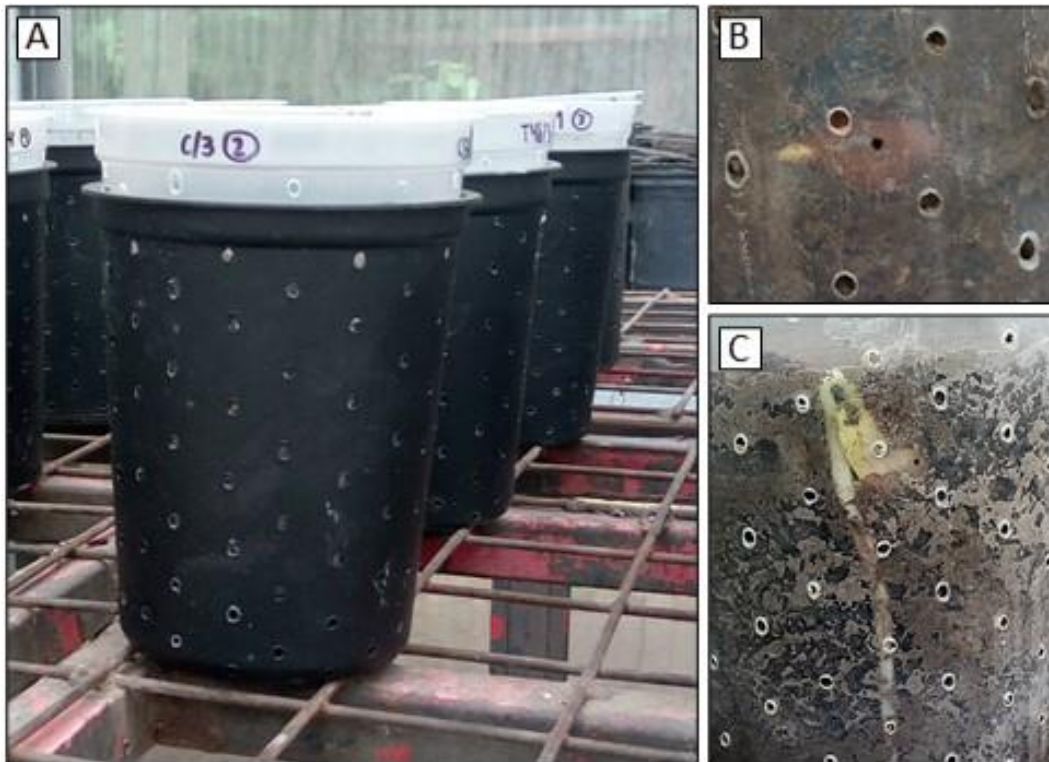


Figura 2. Potes dobles (A). Los pots transparentes se pueden extraer momentáneamente de los pots negros para observar las semillas y permiten registrar la germinación (B) o emergencia de plántulas (C).

2.2 Recolección y tratamiento de frutos

Para la obtención de semillas de acacia negra, en otoño de 2017 se realizó una cosecha de frutos, en cuatro sitios de la ribera del río Luján entre las localidades de Luján y Pilar (figura 3). Los frutos se tomaron de forma manual y usando una tijera de poda en altura cuando fue necesario. De inmediato se trasladaron al lugar de trabajo y se realizó el proceso de limpieza (Willan, 1991). Para completar el proceso de secado las vainas se almacenaron temporalmente en el invernáculo del Laboratorio de Ecología de la Universidad Nacional de Luján, un sitio protegido, ventilado y con buena iluminación. Las vainas, dispuestas en bandejas de cartón, se removieron a diario para facilitar un buen intercambio gaseoso y homogeneizar la incidencia de la luz solar. Las vainas secas se almacenaron en cajas de cartón en un lugar seco, fresco y oscuro.

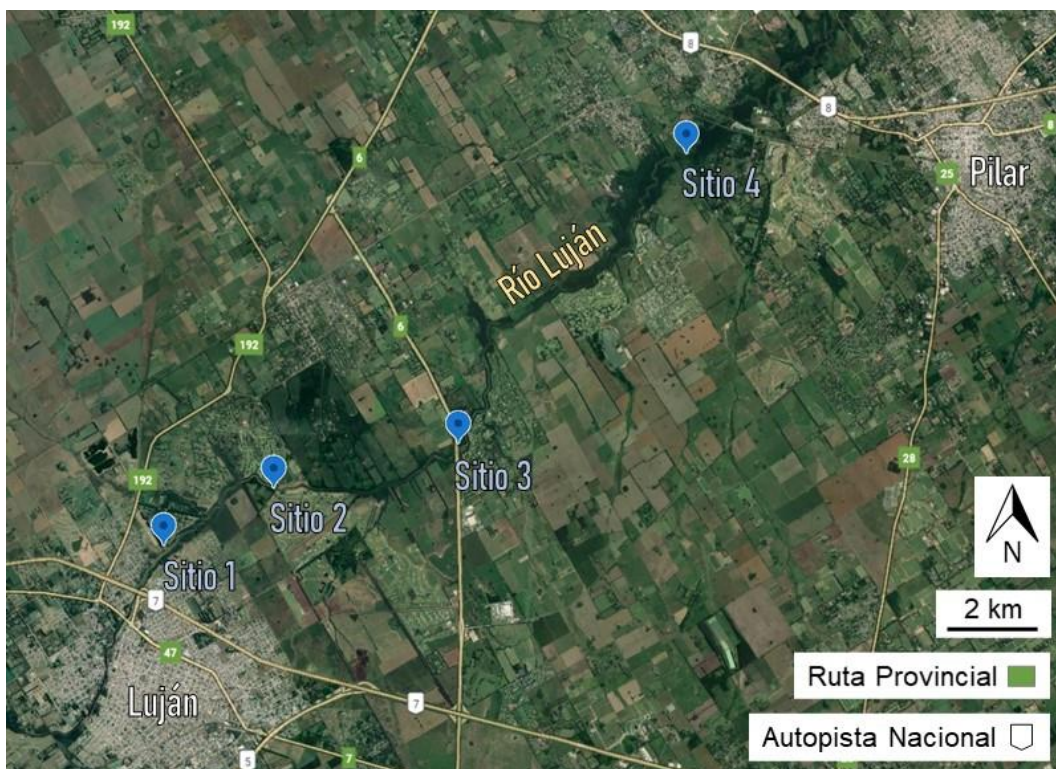


Figura 3. Sitios de recolección de frutos en la ribera del río Luján. Sitio 1 sobre la margen norte del río, 15 metros sobre el nivel del mar (msnm) ($34^{\circ} 32' S$, $59^{\circ} 06' O$); Sitio 2 sobre la margen sur del río, 14 msnm ($34^{\circ} 31' S$, $59^{\circ} 05' O$); Sitio 3, sobre la margen norte del río, 12 msnm ($34^{\circ} 31' S$, $59^{\circ} 02' O$); Sitio 4, sobre la margen sur del río, 10 msnm ($34^{\circ} 27' S$, $58^{\circ} 58' O$). Imagen satelital extraída de Google Earth, Maxar Technologies CNES/Airbus.

En Argentina, las semillas de acacia negra pueden ser severamente dañadas por invertebrados que desarrollan parte de su ciclo de vida en los frutos de esta especie (Di Iorio, 1995; Di Iorio, 2005). Durante los procesos de secado y almacenamiento de frutos se llevaron a cabo inspecciones periódicas en búsqueda de insectos y en caso de hallarse, se eliminaron manualmente para evitar reinfestaciones y así mantener una buena cantidad de semillas viables.

2.3 Tratamiento de semillas y proceso de siembra

Previo a la realización de cada ensayo, las semillas se extrajeron manualmente de las vainas almacenadas y se clasificaron de manera visual, siguiendo criterios de color, tamaño, forma y textura, para descartar semillas inviables y seleccionar las más homogéneas (figura 4).

Las semillas seleccionadas fueron sometidas a un proceso de escarificación mecánica artificial para romper la dormición física (Blair, 1990; Singh *et al.*, 1991). Cada semilla se perforó manualmente con martillo y clavo fino, creando un pequeño orificio en uno de los lados en la zona opuesta a la micrópila. Se procuró que la intensidad del golpe fuera siempre la misma, para romper sólo la testa y crear orificios de igual profundidad.

Las semillas escarificadas fueron sembradas inmediatamente. Se colocaron en el sustrato equidistantes entre sí, a medio centímetro de la superficie y próximas a la pared del recipiente.



Figura 4. Algunas de las semillas seleccionadas para los ensayos, de cubierta lisa, color marrón y similares en tamaño (A) y algunas de las semillas descartadas (B), por encontrarse malformadas (●), atacadas por hongos (▲) o dañadas por insectos (■).

2.4 Sustrato y contenido de humedad

El sustrato utilizado en todos los experimentos fue extraído de la ribera del río Luján en el Sitio 3 (figura 3), a un metro del curso de agua. El material recolectado se dejó secar en invernáculo. Una vez seco, se fraccionó con mortero y se pasó por tamiz de 5 mm de diámetro de poro, para obtener un sustrato homogéneo. El sustrato tamizado se secó en estufa a 60 °C hasta peso constante y se mantuvo allí hasta ser utilizado en los experimentos. Al momento de realizar los ensayos, se agregaron 280 g de sustrato seco a cada pote.

Mediante ensayos preliminares se determinó el método de estimación de la humedad del sustrato (Anexo I) y las condiciones óptimas para la germinación (Anexo II). Se utilizó como valor de referencia una humedad de sustrato del 75 % de la capacidad de retención. Al inicio de cada ensayo, se registró el peso de los potes y las semillas asignadas a cada uno y considerando que el sustrato húmedo al 75 % de su capacidad de retención pesaba 376 g, se estimó el peso que debía tener cada unidad experimental durante el ensayo. Luego las unidades experimentales se pesaron a diario, a excepción de cuando permanecieron inundadas, para verificar su peso. Cuando fue preciso, mediante riego por

goteo, se agregó la cantidad de agua necesaria para restablecer el peso fresco del sustrato y así mantener su humedad relativamente constante.

2.5 Primer ensayo: Inundaciones breves en semillas

Los tratamientos consistieron en inundaciones de distinta duración, 24, 48 y 72 h más un tratamiento control, que no fue inundado. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado, se utilizaron 16 potes dobles y se sembraron 4 semillas escarificadas en cada uno, paralelas a la pared del pote transparente para que sea posible su observación (Figura 5).

Los eventos de inundación comenzaron inmediatamente luego de la siembra (Figura 6). Cada pote doble se colocó dentro de un contenedor y se vertió agua colectada del río Luján hasta cubrirlo completamente y formar una columna de agua de 4 cm sobre el sustrato. El agua de inundación no tuvo aireación ni recambio.

Al concluir los períodos de inundación, los potes dobles se colocaron sobre la mesa de trabajo, permitiendo que el agua de inundación escurriese y en los siguientes 21 días, se controló la humedad del sustrato por el método preestablecido de pesaje y riego. A diario se cambió aleatoriamente la distribución de los potes dobles y se realizaron observaciones para registrar la germinación de semillas o emergencia de plántulas. Se consideró exitoso un suceso de germinación cuando en una semilla se observó la radícula atravesando los tejidos envolventes (figura 2-B). Se consideró exitoso un suceso de emergencia de plántula cuando se observó el hipocotilo traspasando la superficie del sustrato (figura 2-C).

El ensayo se desarrolló en el invernáculo del Laboratorio de Ecología en el verano del año 2017, bajo iluminación natural ($295 \mu\text{mol/s.m}^2$ máxima luz fotosintéticamente activa (PAR)) y registro diario de temperatura (mínima $11,7^\circ\text{C}$ y máxima $34,8^\circ\text{C}$).

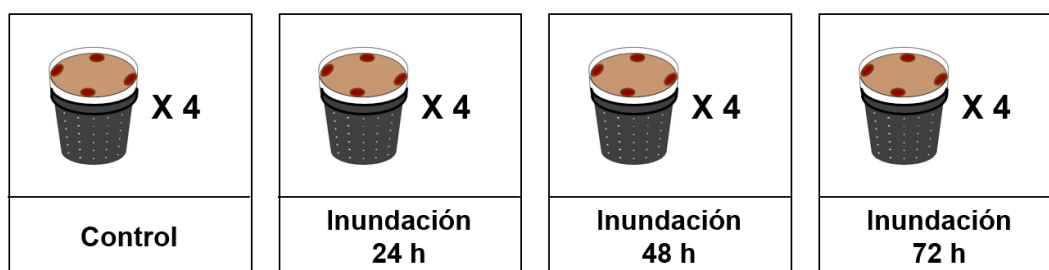


Figura 5. Representación ilustrativa de las unidades experimentales del primer ensayo. Se asignaron cuatro potes dobles a cada tratamiento generando número aleatorios.

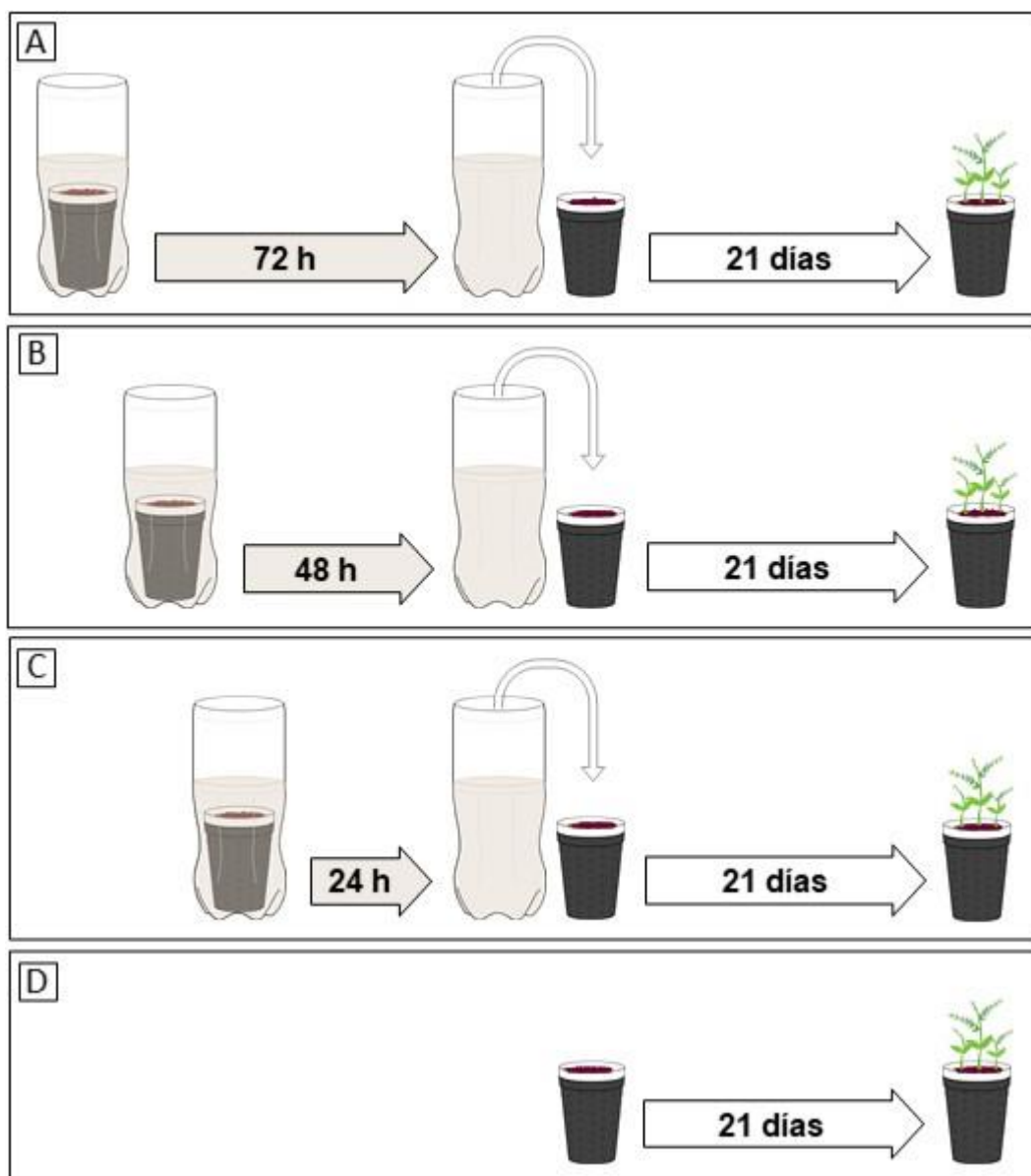


Figura 6. Los pots asignados a cada tratamiento de inundación se mantuvieron sumergidos 72 h (A), 48 h (B) y 24 h (C). Luego se extrajeron de los contenedores con agua y permanecieron 21 días más en invernáculo junto con los pots dobles del tratamiento control (D).

2.6 Segundo ensayo: Inundaciones breves en plántulas

Este ensayo se llevó a cabo para evaluar el efecto de inundaciones breves sobre la supervivencia y morfología de plántulas de acacia negra. Los tratamientos consistieron en inundaciones totales de 24, 48 y 72 h de inundación, más un tratamiento control, que no fue inundado.

Para la obtención de plántulas se siguió igual procedimiento que en el primer ensayo y se aplicó el tratamiento que arrojó mayor porcentaje de emergencia de plántulas (24 h de inundación). Se utilizaron 32 pots con sustrato y se sembraron en cada uno cuatro semillas, luego cada pote se colocó dentro de un contenedor y permaneció sumergido en

agua de río por 24 h. En los días posteriores se controló la humedad de sustrato por el método de pesaje y riego preestablecido.

A los 20 días desde la siembra, todos los potes tenían al menos dos plántulas y todas las plántulas eran muy similares entre sí en cuanto a altura y cantidad de hojas. Se seleccionaron 28 potes y dos plántulas por pote, el criterio de selección fue la altura de las plántulas, para que durante la inundación, todas las plántulas presentaran sobre ellas columnas de agua similares. La altura de las plántulas se midió con regla desde el sustrato hasta el ápice y se descartaron las plántulas que más se alejaban de la altura promedio ($9,7 \pm 1$ cm), escindiendo el tallo con bisturí a la altura del cuello. Los potes seleccionados fueron asignados a los tratamientos generando números aleatorios (figura 7).

Para dar comienzo a los tratamientos de inundación, cada pote se colocó dentro de un contenedor y se vertió agua colectada del río Luján hasta cubrir las plántulas completamente. Sobre el sustrato se mantuvo constante una columna de agua de 14 cm, sin aireación ni recambio de agua. Los potes del tratamiento control no se inundaron, la humedad del sustrato se mantuvo por el método de pesaje y riego preestablecido. Al finalizar cada tratamiento, los potes se retiraron de los contenedores y se volvieron a colocar sobre la mesa de trabajo, permitiendo que el agua de inundación escurriese (figura 8).

Desde la finalización de los períodos de inundación, las réplicas de cada tratamiento se mantuvieron en el invernáculo por 21 días más. A diario se cambió aleatoriamente la distribución de los potes y la humedad del sustrato se controló por el método de pesaje y riego preestablecido. Este ensayo tuvo lugar en el invernáculo del Laboratorio de Ecología de la Universidad Nacional de Luján hacia fines del verano del año 2017, bajo iluminación natural ($727,80 \mu\text{mol/s.m}^2$ máxima PAR) y registro diario de temperatura (mínima 9°C y máxima $33,7^\circ\text{C}$).

Al completarse los 21 días desde finalizado el evento de inundación, se analizaron las plántulas de cada tratamiento, las mismas se retiraron del sustrato, se lavaron las raíces y se le realizaron varias mediciones: Con calibre se registró la longitud del tallo desde el cuello hasta el extremo apical, diámetro del tallo y raíz a un centímetro del cuello, longitud del hipocotile desde el cuello hasta el nudo cotiledónico y longitud del epicotile, desde el nudo cotiledónico hasta el siguiente nudo. Con regla se midió la longitud de la raíz principal, desde el cuello hasta el extremo radical y se realizó un conteo de hojas. La raíz y hojas de cada plántula, fueron escaneados junto con una escala cuadrada de papel rojo de 4 cm^2 , se utilizó un escáner de escritorio modelo Epson XP-201. Por último, tanto la parte aérea como subterránea de la plántula, se colocaron en sobres de papel y se llevaron a estufa a 60°C hasta peso constante, para estimar peso seco aéreo, peso seco subterráneo y peso seco total de cada plántula.

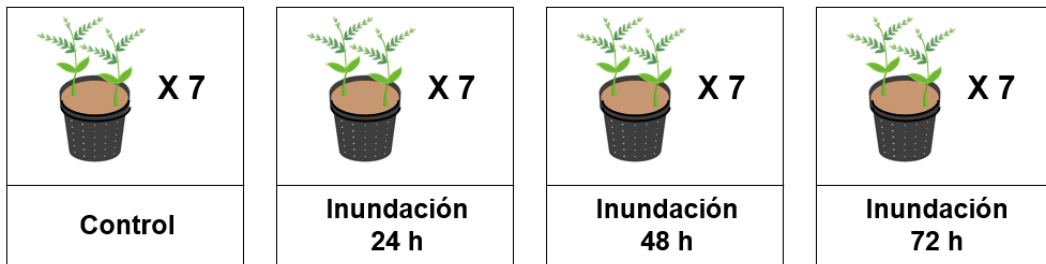


Figura 7. Representación ilustrativa de las unidades experimentales del segundo ensayo. Se asignaron siete potes con dos plántulas a cada tratamiento.

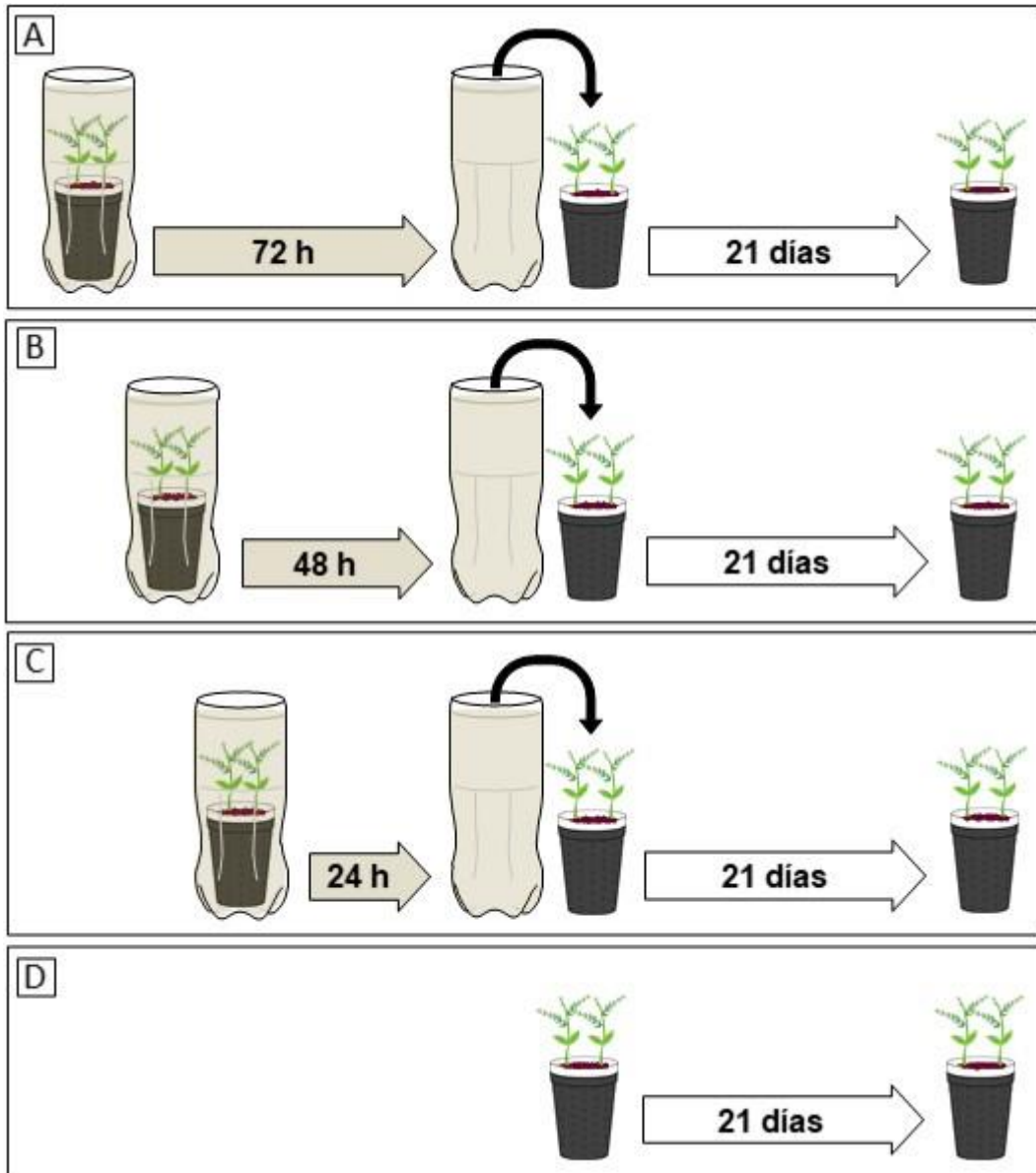


Figura 8. Representación ilustrativa del diseño experimental del segundo ensayo. Los potes asignados a cada tratamiento de inundación se mantuvieron sumergidos 72 h (A), 48 h (B) y 24 h (C). Luego se extrajeron de los contenedores con agua y permanecieron 21 días más en invernáculo junto con los potes del tratamiento control (D).

2.7 Tercer ensayo: Inundaciones prolongadas en plántulas

Este ensayo se llevó a cabo para evaluar el efecto de períodos prolongados de inundación, sobre la supervivencia y morfología de plántulas de acacia negra. Los tratamientos consistieron en inundaciones totales de seis y diez días de duración, más un tratamiento control, que no fue inundado.

Para la obtención de plántulas se siguió igual procedimiento que en el segundo ensayo. Se utilizaron 28 potes con sustrato y se sembraron en cada uno cuatro semillas, luego cada pote permaneció sumergido en agua de río por 24 h y en los días posteriores, se controló la humedad de sustrato por el método de pesaje y riego preestablecido.

A los 20 días desde la siembra, todos los potes tenían al menos cuatro plántulas y todas las plántulas eran muy similares entre sí en cuanto a altura y cantidad de hojas. Se seleccionaron 24 potes y dos plántulas por pote, el criterio de selección fue la altura de las plántulas, para que durante la inundación, todas las plántulas presentaran sobre ellas columnas de agua similares. La altura de las plántulas se midió con regla desde el sustrato hasta el ápice y se descartaron las plántulas que más se alejaban de la altura promedio ($8,2 \pm 1$ cm), escindiendo el tallo con bisturí a la altura del cuello. Los potes seleccionados fueron asignados a los tratamientos generando números aleatorios (figura 9).

Para los eventos de inundación, se siguió igual procedimiento que en el segundo ensayo. El agua de inundación no tuvo aireación ni recambio, cuando fue necesario se agregó agua de río para compensar la pérdida por evaporación y mantener constante la columna de agua de 14 cm sobre el sustrato (figura 10).

Luego de finalizar los tratamientos de inundación, las réplicas de cada tratamiento se mantuvieron en invernáculo por 30 días más. A diario se cambió aleatoriamente la distribución de los potes y la humedad del sustrato se mantuvo por el método de pesaje y riego preestablecido. Este ensayo se desarrolló en invernáculo en el verano del año 2018, bajo iluminación natural ($1306,7 \mu\text{mol/s.m}^2$ máxima PAR) y registro diario de temperatura (mínima $6,4$ °C y máxima $40,3$ °C).

Luego de los eventos de inundación, periódicamente se realizó un examen visual del estado de las plántulas, se tomaron fotografías y se llevó un control de la cantidad de hojas de cada plántula. Al finalizar el ensayo, las plántulas se extrajeron del sustrato y se estimaron las mismas variables que se estudiaron en el segundo ensayo y siguiendo los mismos procedimientos. Para confirmar la supervivencia de plántulas, se realizaron pruebas de tetrazolio (Parker, 1953; Ruiz, 2009) en cortes longitudinales de raíz principal, que se obtuvieron a un centímetro por debajo del cuello de la plántula. Se comprobó la tinción con solución de tetrazolio al 0,5 % durante un minuto.



Figura 9. Representación ilustrativa de las unidades experimentales del tercer ensayo. Se asignaron ocho potes con dos plántulas a cada tratamiento.

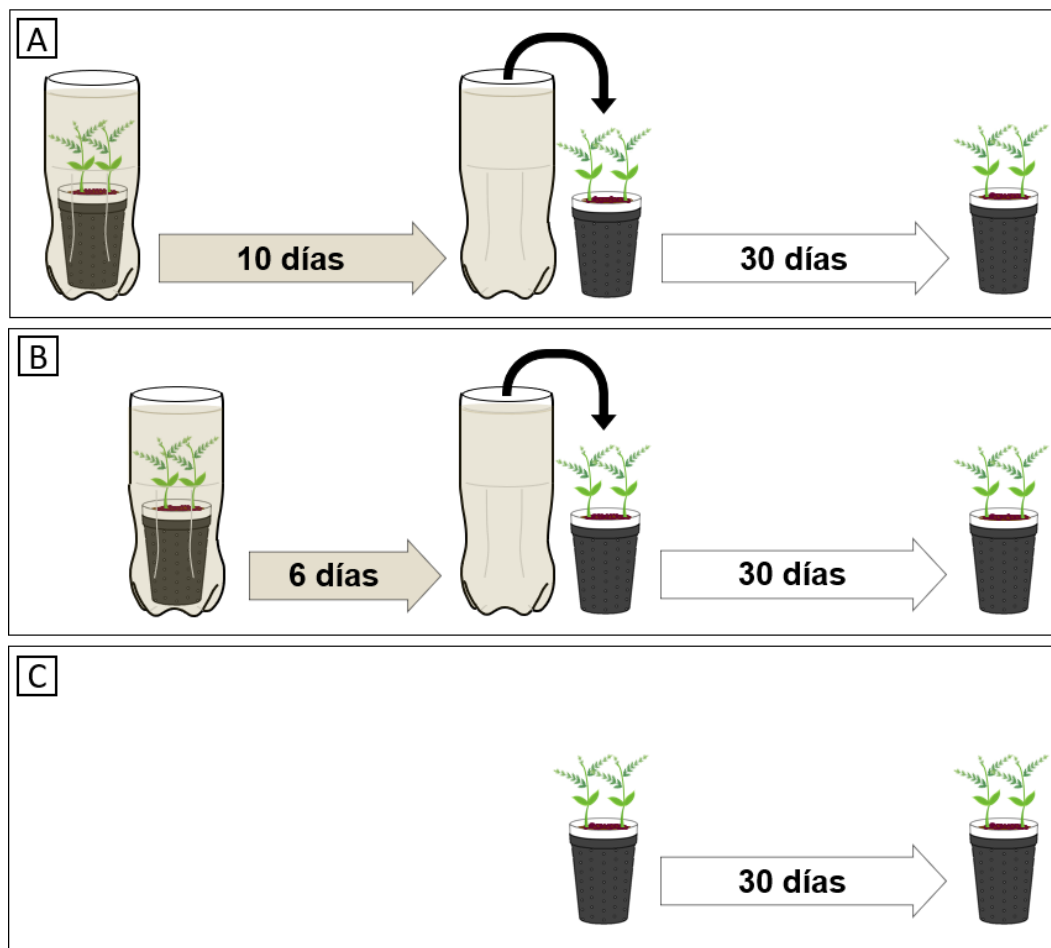


Figura 10. Representación ilustrativa del diseño experimental del tercer ensayo. Los potes asignados a cada tratamiento de inundación se mantuvieron sumergidos diez días (A) y seis días (B). Luego se extrajeron de los contenedores con agua y permanecieron 30 días más en invernáculo junto con los potes del tratamiento control (C).

2.8 Parámetros estimados y tratamiento de datos

Se estimó para cada semilla que germinó el tiempo de latencia (González-Zertuche y Orozco-Segovia, 1996), registrando los días que transcurrieron hasta la emergencia de la radícula. Para las semillas que permanecieron inundadas este tiempo se contabilizó desde el momento en que finalizaron los tratamientos de inundación. Luego se obtuvo el tiempo medio de latencia por réplica y se realizó la comparación entre tratamientos por la prueba

no paramétrica de Kruskal Wallis, dado que los datos no cumplían los supuestos de normalidad y homocedasticidad. *A posteriori* se realizó una comparación de a pares.

Se analizó el porcentaje final de germinación y emergencia de cada tratamiento. Estas variables provienen de un conteo, por lo tanto, se les realizó una transformación arcoseno (Scott *et al.*, 1984) (McDonald, 2014). Para transformar los datos se obtuvo el arcoseno de la raíz de la proporción ($\text{arcoseno}\sqrt{p}$), siendo p el valor proporcional de los datos originales. Se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los datos transformados y se llevó a cabo un Análisis de la Varianza (ANOVA) y prueba de Tukey.

Se elaboraron curvas de germinación acumulada, que describen el incremento de la germinación en el tiempo (González-Zertuche y Orozco-Segovia, 1996). Debido a la naturaleza binaria de la variable respuesta, se aplicó el modelo de regresión logística múltiple (Di Rienzo, 2011) para evaluar en qué medida los tratamientos de inundación junto con el tiempo de permanencia de las semillas en el sustrato, modifican la probabilidad de germinación de las semillas. Para llevar a cabo este análisis se decidió agrupar los datos sin hacer distinción de réplicas. Se utilizó el tiempo de permanencia en sustrato, como variable regresora cuantitativa y el tratamiento, como variable regresora categórica con cuatro niveles. Al incorporar una variable categórica el tratamiento control se tomó como categoría de referencia y se analizaron las razones de chances en relación a dicho tratamiento. Para la emergencia de plántulas, también se creó una curva de emergencia acumulada y se realizó un análisis de regresión logística múltiple, siguiendo el mismo tratamiento de datos.

Para analizar la supervivencia se calculó el porcentaje de supervivencia de cada réplica, luego se realizó una transformación arcoseno sobre los datos y se verificaron los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad. Al no cumplirse estos supuestos se realizó la prueba Kruskal Wallis para muestras independientes, seguido de una comparación de a pares.

Las imágenes escaneadas fueron analizadas con el programa ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) versión 1.52a. Para estimar las variables área foliar y superficie radical, primero se ajustó la escala en el programa utilizando como referencia el cuadrado rojo presente en la imagen de 2 cm de lado. Luego las imágenes se convirtieron a escala de grises (8-bit) y posteriormente a imágenes binarias, con color blanco de fondo y en negro los objetos. Con la herramienta *Analyse particles* se estimó el área de hojas y raíz. El área de raíz estimada con ImageJ es un área plana, también llamada área proyectada de la raíz, suponiendo raíces cilíndricas se multiplicó el área proyectada por π para estimar la superficie radical de cada plántula (Koppel *et al.*, 1988). Luego se estimó para cada plántula el área foliar promedio por hoja. Para obtener una estimación del grado de ramificación de las raíces, las imágenes escaneadas se observaron detenidamente y se realizó un conteo de ápices radicales, sin hacer distinción entre raíces de distinto orden, se contó el total de ápices radicales por sistema radical.

El análisis de las variables morfométricas se llevó a cabo considerando únicamente los datos de las plántulas vivas. Todas las variables que cumplieron con los supuestos de homogeneidad de varianza se analizaron mediante ANOVA. En los casos en que ANOVA arrojó diferencias significativas, se realizó un Test de Tukey. La variable diámetro de raíz del segundo ensayo, no cumplió con los supuestos de homocedasticidad ni normalidad; las variables peso seco aéreo y peso seco total del tercer ensayo tampoco cumplieron con la homogeneidad de varianzas, en todas estas variables se realizó la prueba Kruskal Wallis para muestras independientes.

Con los datos del segundo ensayo se llevó a cabo un Análisis Discriminante Lineal (ADL) con el fin de encontrar el subconjunto de variables que mejor explicara la variabilidad entre grupos. En el análisis sólo se incluyeron las variables con distribución normal y que cumplieran el supuesto de homogeneidad de matrices de covarianza. Se consideraron las observaciones del total de plántulas de cada tratamiento, sin hacer distinción entre réplicas. Se analizó la variabilidad explicada por cada función discriminante y la importancia relativa de cada variable en la discriminación de los grupos, evaluando los coeficientes de las funciones discriminantes estandarizadas por las covarianzas comunes.

Todos los análisis estadísticos, con nivel de significancia $\alpha=0,05$, y gráficos se llevaron a cabo en InfoStat (versión libre 2017) (Di Rienzo *et al.*, 2017). Para la elaboración de las figuras se utilizó Microsoft® PowerPoint® 2016.

Capítulo 3

Resultados

3.1 Efectos de inundaciones breves en la germinación y emergencia de plántulas

El inicio de la germinación se dio tempranamente en las semillas que permanecieron más tiempo inundadas. Las semillas expuestas a los tratamientos de 48 y 72 h de inundación presentaron menor tiempo de latencia y se diferenciaron significativamente del tratamiento control (figura 11).

Los tratamientos no se diferenciaron entre sí en el porcentaje final de germinación, pero sí en el porcentaje final de emergencia de plántulas. El tratamiento de 24 h de inundación fue el que alcanzó el mayor porcentaje final de emergencia de plántulas y presentó diferencias significativas con el tratamiento control (figura 12).

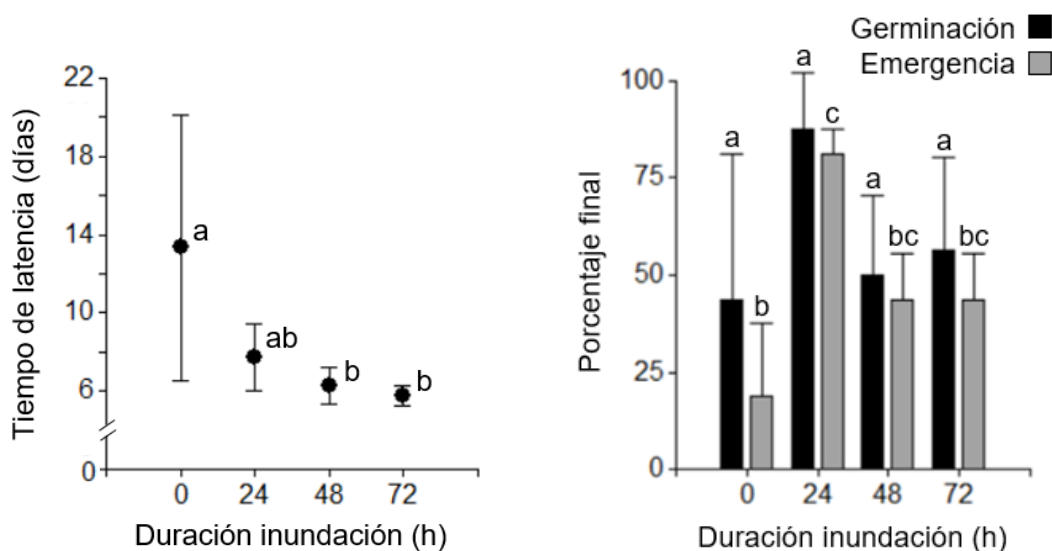


Figura 11. Tiempo de latencia medio. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$).

Figura 12. Porcentaje medio final de germinación y emergencia de plántulas. Las barras indican el desvío estándar. En cada variable, letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$).

Las semillas comenzaron a germinar entre el cuarto y sexto día. La inundación en períodos de 24 a 72 h indujo precocidad en la germinación y mayores valores respecto al tratamiento control (figura 13). En este sentido, las semillas sometidas a 24 h de inundación superaron el 80 % de germinación en el día 10 y alcanzaron los mayores valores para este parámetro. Aunque los tratamientos de 48 y 72 h de inundación incrementaron la germinación, alcanzaron menores valores de germinación y el porcentaje máximo se obtuvo al octavo día desde la finalización de la inundación con valores cercanos al 50 %. El tratamiento control también alcanzó un porcentaje final de germinación próximo al 50 % pero el incremento de la germinación en el tiempo es mucho más gradual.

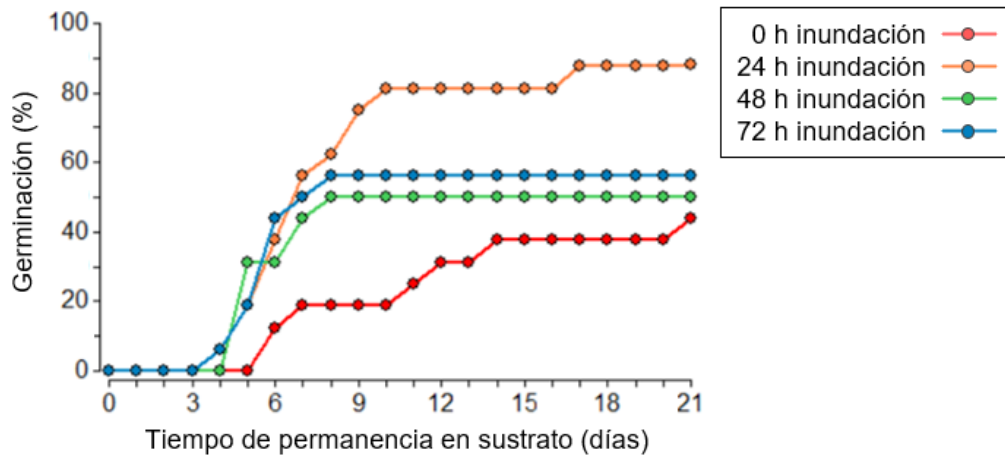


Figura 13. Germinación acumulada.
El tiempo 0 coincide con la culminación de los tratamientos de inundación.

Entre el día nueve y doce luego de finalizar los tratamientos de inundación, comenzó la emergencia de plántulas (figura 14). El tratamiento de 24 h de inundación alcanzó un 80 % de emergencia en el día 20 y es el tratamiento en el que emergieron más plántulas. Los tratamientos de 48 y 72 h de inundación alcanzan un porcentaje de emergencia próximo al 50 % y lo hacen en los días 13 y 14 respectivamente. En el tratamiento control emergieron pocas plántulas, cerca de un 20 % del total de semillas.

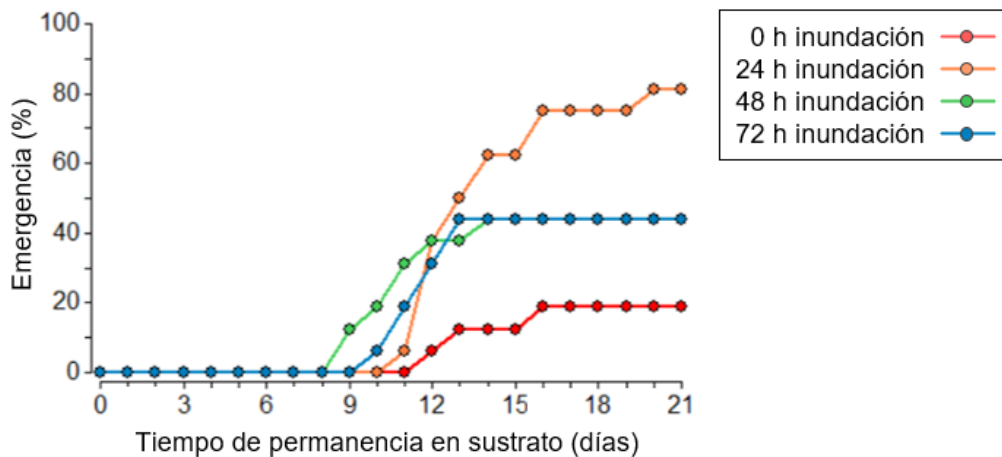


Figura 14. Emergencia acumulada de plántulas.
El tiempo 0 coincide con la culminación de los tratamientos de inundación.

El resultado del modelo de regresión logística múltiple para la variable respuesta “germinación” en función del tiempo postinundación (variable regresora cuantitativa) y el tratamiento (variable regresora categórica), permitió determinar que hubo un efecto estadísticamente significativo de las variables predictoras sobre la probabilidad de germinación. Exceptuando la estimación de la constante β_0 , todos los coeficientes del modelo fueron positivos e indicaron que la probabilidad de germinación aumentó con el tiempo de permanencia de las semillas en el sustrato y la exposición a períodos de inundación (tabla 1).

La razón de chances señala cuán importante es el efecto de las variables regresoras sobre la probabilidad de germinación. La chance de germinación de una semilla que permaneció 24 h inundada fue siete veces mayor respecto al control, al prolongar el período de inundación la razón de chances se reduce a menos de la mitad.

Tabla 1. Regresión logística múltiple con variable respuesta germinación

Predictor	Coefficiente de regresión	Error estándar	Razón de chances (RC)	Intervalo RC (95 %)
Constante	-3,2	0,21	0,04	0,03 - 0,06
24 h inundación	1,95	0,19	7,04	4,84 - 10,24
48 h inundación	0,88	0,19	2,4	1,66 - 3,46
72 h inundación	1,11	0,19	3,05	2,12 - 4,39
Tiempo en sustrato	0,16	0,01	1,17	1,15 - 1,2

Las pruebas estadísticas de todos los predictores son significativas, $p < 0,05$.

Un análisis similar aplicado a la emergencia de plántulas se resume en la tabla 2. Hay un efecto estadísticamente significativo de las variables predictoras sobre la probabilidad de emergencia de plántulas. Exceptuando la estimación de la constante β_0 , todos los demás coeficientes del modelo son positivos e indican que la probabilidad de emergencia de una plántula aumenta con el tiempo de permanencia de la semilla en el sustrato y la exposición a períodos de inundación.

La chance de emergencia de plántula a partir de una semilla que permaneció 24 h inundada es once veces mayor que el control, la chance de emergencia de plántula a partir de una semilla que permaneció 48 h inundada es cinco veces mayor que el control y la chance de emergencia de plántula a partir de una semilla que permaneció 72 h inundada es cinco veces mayor que el control.

Tabla 2. Regresión logística múltiple con variable respuesta emergencia de plántulas

Predictor	Coefficiente de regresión	Error estándar	Razón de chances (RC)	Intervalo RC (95 %)
Constante	-6,61	0,39	0	0 - 0
24 h inundación	2,36	0,27	10,58	6,20 - 18,05
48 h inundación	1,67	0,27	5,34	3,13 - 9,12
72 h inundación	1,53	0,27	4,62	2,7 - 7,9
Tiempo en sustrato	0,28	0,02	1,32	1,27 - 1,37

Las pruebas estadísticas de todos los predictores son significativas, $p < 0,05$.

3.2 Efectos de inundaciones breves en la supervivencia y desarrollo de plántulas

La supervivencia de plántulas fue del 100 %, desde la sumersión y hasta los 21 días posteriores a la finalización de los tratamientos. Sin embargo, las plántulas que permanecieron sumergidas presentaron menor peso seco que las plántulas control. Tanto el peso seco subterráneo como el aéreo disminuyeron a consecuencia de la sumersión

(figura 15). Con respecto al peso seco subterráneo, los tratamientos de 24 y 48 h de sumersión se diferenciaron significativamente del control, no así el tratamiento de 72 h.

Las plántulas de todos los tratamientos presentaron similar cantidad de hojas, sin embargo, se hallaron diferencias significativas en el área foliar por hoja, que fue significativamente menor en las plántulas que permanecieron sumergidas. Las plántulas que pasaron 72 h bajo agua, presentaron las hojas más pequeñas (figura 16).

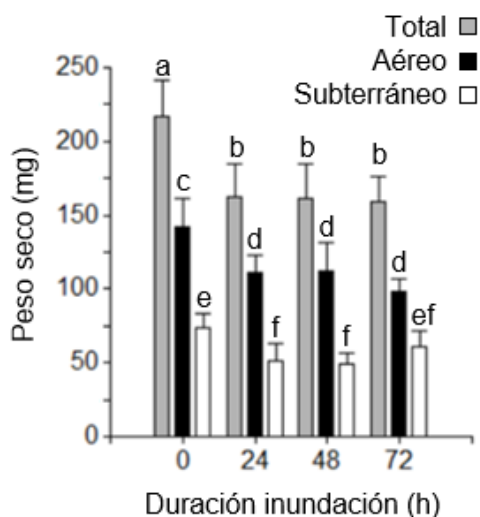


Figura 15. Peso seco medio aéreo, subterráneo y total. Las barras indican el desvío estándar. En cada variable, letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$)

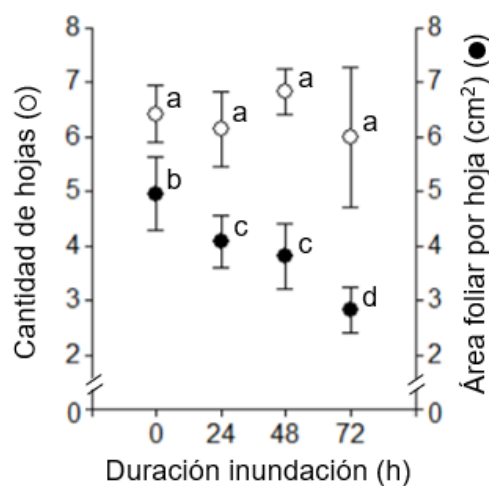


Figura 16. Cantidad de hojas media por plántula y Área foliar media por hoja. Las barras indican el desvío estándar. En cada variable, letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$)

Las plántulas de los distintos tratamientos no se diferenciaron en longitud del hipocotile, longitud del epicotile (tabla 3) ni en longitud del tallo. Pero sí se diferenciaron en la longitud de la raíz principal, que fue significativamente más corta en las plántulas sometidas a un periodo de 72 h de inundación (figura 17).

Tabla 3. Mediciones morfométricas del segundo ensayo

Variable	Duración inundación (h)			
	0	24	48	72
Longitud epicotile (cm)	3,46 ± 0,36* ¹ a* ²	3,54 ± 0,28 a	3,91 ± 0,28 a	3,68 ± 0,27 a
Longitud hipocotile (cm)	6,06 ± 0,46 a	6,34 ± 0,40 a	6,48 ± 0,45 a	6,24 ± 0,35 a

*¹ Media ± Desvío estándar

*² En cada variable, letras iguales señalan falta de diferencias significativas, $p < 0,05$.

El diámetro de tallo y diámetro de raíz varían entre tratamientos de manera similar, sin embargo, las diferencias entre tratamientos son significativas únicamente para la variable diámetro de tallo (figura 18). Las plántulas que permanecieron 24 h sumergidas desarrollaron tallos de mayor diámetro.

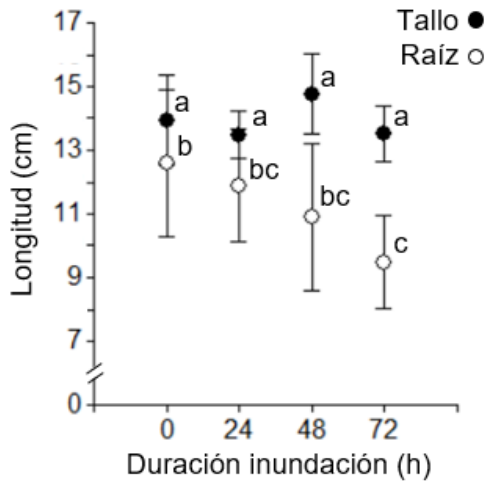


Figura 17. Longitudes medias de tallo y raíz. Las barras indican el desvío estándar. En cada variable, letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$)

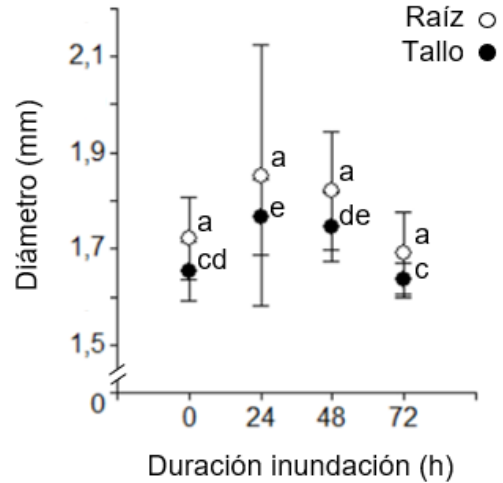


Figura 18. Diámetro medio de tallo y raíz. Las barras indican el desvío estándar. En cada variable, letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$)

Los tratamientos de inundación afectaron el desarrollo del sistema radical. En comparación con el tratamiento control, las plántulas que permanecieron inundadas presentaron menor superficie radical y menor cantidad de ápices radicales. Sin embargo, solamente las plántulas que permanecieron 24 h inundadas se diferenciaron estadísticamente del tratamiento control (figura 19 y figura 20).

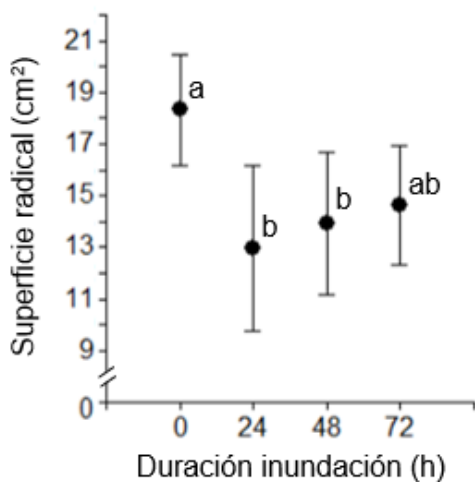


Figura 19. Superficie radical media por plántula. Las barras indican el desvío estándar. En cada variable, letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$)

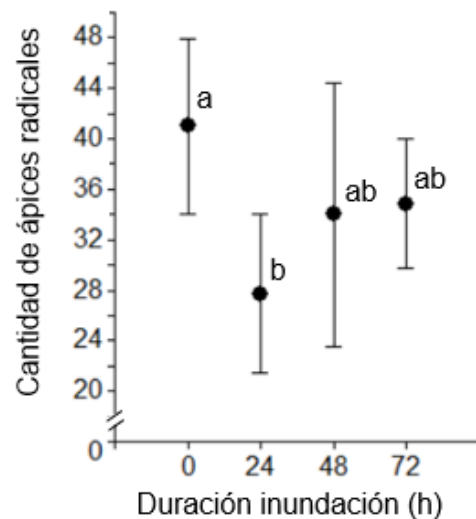


Figura 20. Cantidad media de ápices radicales por plántula. Las barras indican el desvío estándar. En cada variable, letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$)

Del ADL se desprende que el primer y segundo eje canónico explican 95,82 % de la variación total entre grupos, 63,11 % es explicado por el primer eje y 32,71 % es explicado por el segundo eje. Evaluando los coeficientes de las funciones discriminantes estandarizadas por las covarianzas comunes (tabla 4), se deduce que el peso seco aéreo es la variable más importante para la discriminación sobre el primer eje canónico. Sobre el segundo eje canónico, las variables más importantes para la discriminación entre grupos son el área foliar por hoja y la cantidad de ápices radicales.

Tabla 4. Coeficientes de las funciones discriminantes estandarizadas con las covarianzas comunes

Variable	Función discriminante	
	1	2
Longitud tallo	0,29	0,58
Longitud epicotile	0,22	0,09
Longitud hipocotile	0,52	-0,18
Longitud raíz	-0,20	0,28
Peso seco aéreo	-1,22	-0,44
Peso seco subterráneo	-0,15	-0,60
Área foliar por hoja	-0,44	0,77
Diámetro de tallo	0,32	0,66
Cantidad de ápices radicales	0,08	-0,70
Superficie radical	0,45	0,18

En el espacio discriminante conformado por el primer y segundo eje canónico, las observaciones con los mayores valores de peso seco aéreo se sitúan a la izquierda del gráfico de dispersión, ya que el coeficiente para esta variable es negativo. A su vez, las observaciones con mayor área foliar se distribuyen en la parte superior del gráfico porque el coeficiente es positivo mientras que las observaciones que presentan mayor cantidad de ápices radicales se ubican en la parte inferior del gráfico porque el coeficiente para dicha variable es negativo (figura 21).

El primer eje canónico permite discriminar entre el control y los tratamientos de inundación, las observaciones del tratamiento control presentan mayores valores de peso seco aéreo. Los tratamientos de 24 y 48 h de inundación se agrupan juntos, considerando el segundo eje canónico, presentan elevados valores de área foliar y menor cantidad de ápices radicales que el tratamiento de 72 h de inundación. Las observaciones del tratamiento de 72 h de inundación se ubican en la parte inferior derecha del gráfico de dispersión, se corresponden con valores pequeños de peso seco aéreo, menor área foliar y mayor cantidad de ápices radicales.

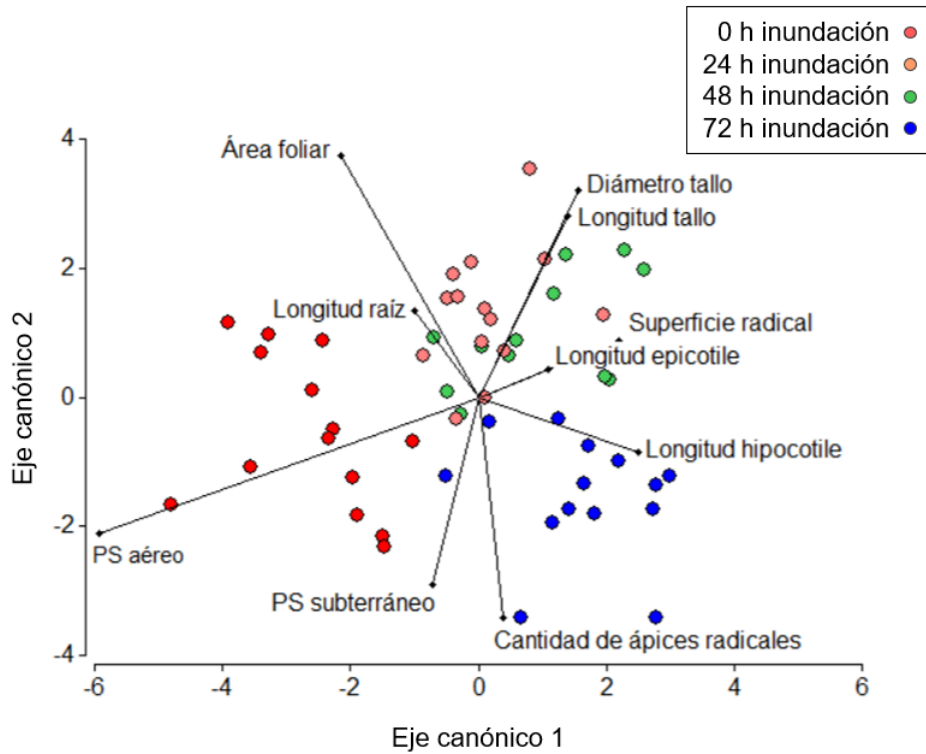


Figura 21. Espacio discriminante conformado por el primer y segundo eje canónico. Cada observación corresponde a una plántula.

3.3 Efectos de inundaciones prolongadas en la supervivencia y desarrollo de plántulas

Las plántulas control crecieron durante el ensayo y aumentaron progresivamente su cantidad de hojas, mientras que las plántulas expuestas a los tratamientos de inundación fueron perdiendo hojas progresivamente. A partir del día 15, en la curva correspondiente al tratamiento de seis días de inundación, se observa un incremento en la cantidad media de hojas por plántula, en cambio las plántulas sometidas a diez días de inundación mantuvieron la reducción foliar (figura 22).

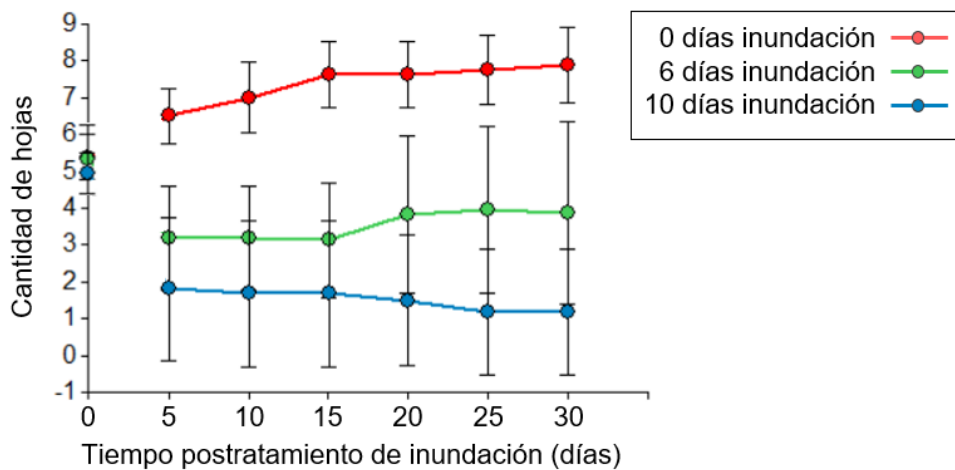


Figura 22. Cantidad de hojas media por plántula. La cantidad de hojas media por plántula antes de iniciar los tratamientos de inundación se indica en el tiempo 0. Las barras señalan el desvío estándar.

Durante los 30 días posteriores a los tratamientos de inundación, la mayoría de las plántulas además de perder hojas, disminuyeron su turgencia, senescieron y finalmente murieron. Solo parte de las plántulas del tratamiento de seis días de inundación sobrevivieron, se les secó únicamente el ápice y las hojas más apicales y luego continuaron con su crecimiento desarrollando las yemas axilares más próximas al ápice (figura 23).

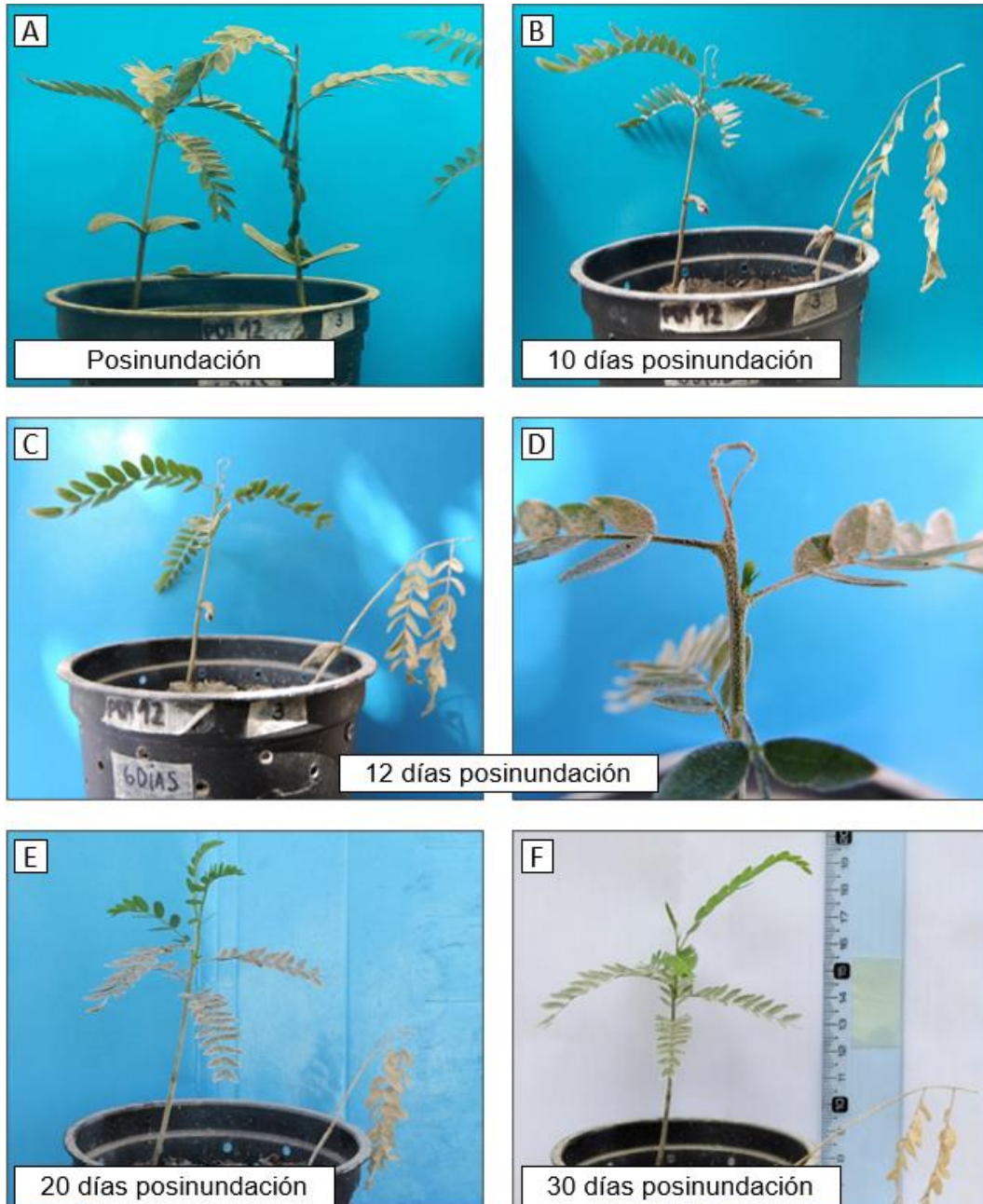


Figura 23. Evolución posinundación de una unidad experimental expuesta a 6 días de inundación.

Una de las plántulas entró en senescencia y la otra sobrevivió. Las fotografías fueron tomadas inmediatamente luego de finalizar el tratamiento de inundación (A), a los 10 días (B), 12 días (C) y (D), 20 días (E) y 30 días (F). En la imagen (D) se observa con mayor detalle el ápice de la plántula que sobrevivió y la yema en crecimiento.

La prueba de tetrazolio (figura 24) es una prueba bioquímica que permite determinar si un tejido está vivo o no en base a la actividad de las enzimas deshidrogenasas. En tejidos vivos, la actividad de estas enzimas provoca la liberación de iones hidrógeno, que reducen la solución de tetrazolio (2,3,5-Trifeniltetrazolio cloruro) incoloro a formazán (Trifenilformazán) color rojo (Ruiz, 2009). El resultado de esta prueba realizada al final del experimento confirmó que todas las plántulas del tratamiento control sobrevivieron (100 % de supervivencia), las plántulas que pasaron seis días inundadas al final del experimento sólo presentaron un 25 % de supervivencia y todas las plántulas que pasaron diez días inundadas murieron (0 % supervivencia). Las diferencias en el porcentaje de supervivencia del tratamiento control y los tratamientos de inundación fueron significativas ($p < 0,05$).



Figura 24. Prueba de tetrazolio.

Resultado de la aplicación de solución de tetrazolio sobre algunos de los cortes de raíz de plántula control (A), plántula que permaneció 10 días inundada (B), plántula que permaneció 6 días inundada y sobrevivió (C) y plántula que permaneció 6 días inundada y murió (D). La coloración rojiza indica actividad respiratoria en el tejido. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Nikon modelo Coolpix P600.

Al final del ensayo, no hubo diferencias significativas en el peso seco de las plántulas que sobrevivieron a los seis días de inundación y las plántulas control (figura 25), tampoco presentaron diferencias significativas en la cantidad de hojas. Sin embargo, sí se detectaron diferencias en el área foliar promedio por hoja, que fue significativamente menor en las plántulas que permanecieron inundadas (figura 26).

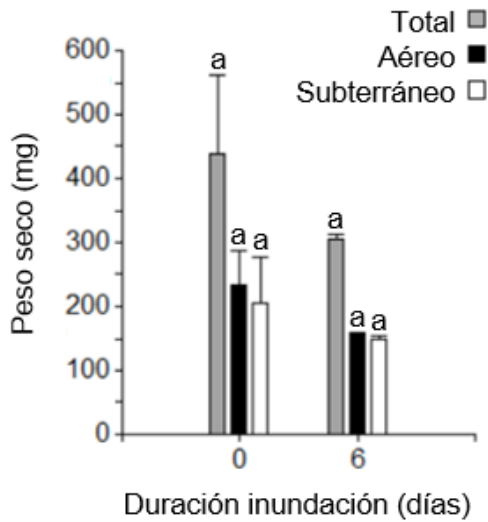


Figura 25. Peso seco medio aéreo, subterráneo y total. Las barras indican el desvío estándar. En cada variable, letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$)

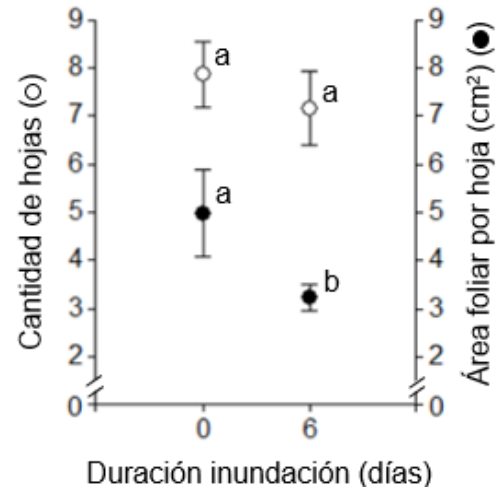


Figura 26. Cantidad de hojas media por plántula y Área foliar media por hoja. Las barras indican el desvío estándar. En cada variable, letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$)

No se detectaron diferencias significativas en la longitud de epicotile, longitud de hipocotile, longitud de tallo ni longitud de raíz (tabla 5), pero sí en el diámetro de tallo y diámetro de raíz principal. Las plántulas control desarrollaron tallos y raíces de mayor diámetro que las plántulas que permanecieron seis días inundadas (figura 27).

Tabla 5. Mediciones morfométricas del tercer ensayo

Variable	Duración inundación (días)	
	0	6
Longitud epicotile (cm)	2,61 ± 0,15*1 a*2	2,77 ± 0,29 a
Longitud hipocotile (cm)	3,94 ± 0,28 a	3,72 ± 0,37 a
Longitud tallo (cm)	11,11 ± 1,18 a	9,57 ± 0,86 a
Longitud raíz (cm)	8,3 ± 1,0 a	9,6 ± 1,7 a

*1 Media ± Desvío estándar

*2 En cada variable, letras iguales señalan falta de diferencias significativas, $p < 0,05$.

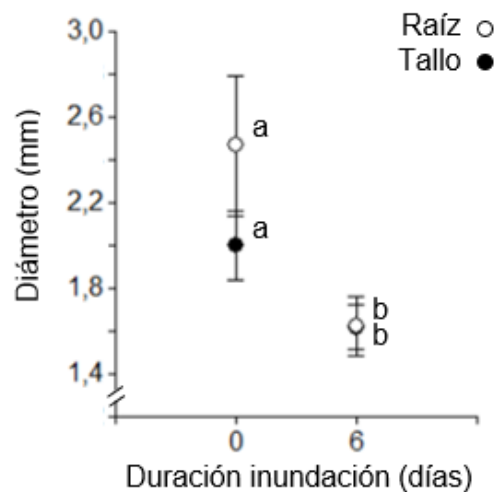


Figura 27. Diámetro medio de tallo y raíz. Las barras indican el desvío estándar. En cada variable, letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$)

En comparación con el tratamiento control, las plántulas que permanecieron seis inundadas presentaron menor superficie radical y menor cantidad de ápices radicales. Sin embargo, estas diferencias no son significativas estadísticamente (figura 28 y figura 29).

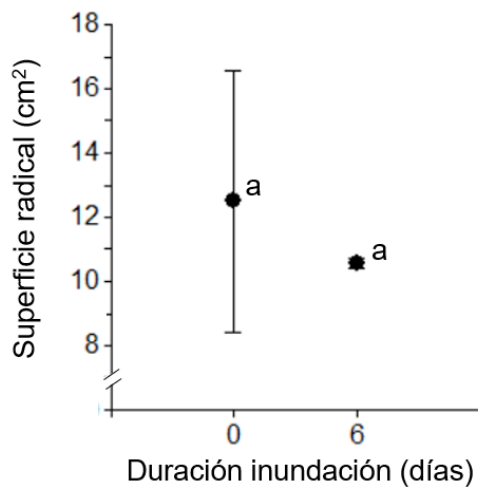


Figura 28. Superficie radical media por plántula. Las barras indican el desvío estándar. En cada variable, letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$)

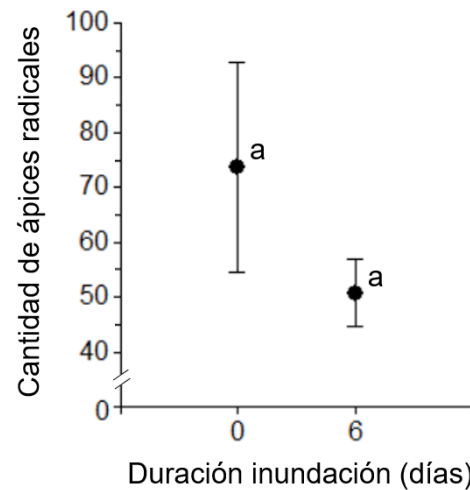


Figura 29. Cantidad media de ápices radicales por plántula. Las barras indican el desvío estándar. En cada variable, letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$)

Capítulo 4

Discusión

En este trabajo se propuso evaluar el efecto de inundaciones de distinta duración sobre la germinación, emergencia, supervivencia y desarrollo de plántulas de acacia negra. Siguiendo el mismo orden, a continuación, se discuten los resultados obtenidos.

4.1 Germinación, emergencia y supervivencia de plántulas

La imbibición es el proceso que da inicio a la germinación y consiste en el ingreso de agua a la semilla estimulando la activación de procesos celulares y enzimáticos. La duración de esta etapa depende de las características de la semilla y de las condiciones externas, tales como la temperatura, la composición del sustrato, el contenido de humedad de la semilla y del ambiente (Azcón-Bieto y Talón, 2013). Además, a pesar de contar con las condiciones óptimas de cultivo la semilla puede permanecer latente y este fenómeno se denomina “dormición”. La función que se ha descrito para la dormición está relacionada a evitar la germinación y prolongar el tiempo disponible para la dispersión de las semillas. La dormición puede involucrar diversos mecanismos mediante barreras físicas que evitan el ingreso de agua, inhibidores de la germinación que generalmente involucran compuestos como el ácido abscísico, o falta de desarrollo embrionario, entre otros (Azcón-Bieto y Talón, 2013).

Las semillas de acacia negra poseen una cubierta seminal gruesa e impermeable (Csurhes y Markula, 2010) que funciona como barrera física para el agua y dificulta la imbibición. Por este motivo fueron escarificadas mecánicamente para romper la dormición física y evitar de esta manera la interferencia que podría generar la dormición sobre los tratamientos. A partir de este procedimiento común para todas las semillas, se evaluó el efecto de los distintos tiempos de inundación.

En muchas especies leñosas la inmersión de sus semillas por periodos cortos de tiempo induce precocidad y altos porcentajes de germinación (Kozłowski, 1997). Los resultados de este trabajo son coincidentes, pues los eventos de inundación favorecieron la germinación de las semillas de acacia negra en menor tiempo, es decir, mostraron un menor tiempo de latencia; aunque solo se observaron diferencias significativas con 48 y 72 h de inundación respecto a las semillas control.

Mientras que la sumersión por breves períodos acelera la germinación de especies leñosas, la sumersión por períodos prolongados puede tener efectos negativos en la germinación y desarrollo de plántulas (Kozłowski, 1997). Burton y Bazzaz (1991) encontraron que en la acacia negra, la emergencia de plántulas es elevada frente a un amplio rango de temperatura y humedad, excepto en condiciones de sequía. En este trabajo las regresiones logísticas múltiples mostraron que las exposiciones a eventos de inundación aumentan la probabilidad de germinación y emergencia de plántulas de acacia negra, pero considerando la duración de los mismos, la mayor probabilidad de que una semilla germine y emerja una plántula se da con las inundaciones de 24 h. Cuando las inundaciones se prolongan, el embrión no llega a cubrir los elevados requerimientos de

oxígeno para la respiración y los procesos oxidativos que ocurren durante el crecimiento, disminuyendo la viabilidad de la semilla (Kozlowski y Pallardy, 1997; Pardos, 2004).

Durante una inundación, la principal dificultad que enfrentan las plantas terrestres, es el intercambio gaseoso con el medio, ya que la difusión del oxígeno en el agua es mucho menor que en el aire (Armstrong *et al.*, 1994). A medida que el oxígeno en el interior de la planta disminuye, el metabolismo aeróbico de la planta se dificulta y se acumulan especies reactivas de oxígeno (ROS). La acumulación excesiva de ROS en las plantas puede dañar sus tejidos u órganos, limitar su crecimiento o incluso provocarles la muerte (Voesenek, 2006; Chen y Xie, 2009, Jiménez *et al.*, 2012). Si bien algunas especies han desarrollado estrategias para tolerar o evitar la falta de oxígeno, la mayoría de las plantas terrestres no sobreviven largos períodos en condiciones de hipoxia o anoxia (Perata y Alpi, 1993). Generalmente, por su alto requerimiento energético y su actividad metabólica, las plántulas son severamente afectadas por la inundación (Kabrick *et al.*, 2012).

En las plántulas de acacia negra los períodos de inundación breves mostraron tendencia a reducir la emergencia a medida que se prolongaba el tiempo de inundación, aunque todos los tratamientos superaron al control y las diferencias no fueron significativas entre ellos. Además, se observó que seis días de inundación redujo la supervivencia un 75% y ninguna plántula sobrevivió al evento de inundación de diez días de duración. Estos resultados coinciden con lo descrito en otras especies donde la supervivencia de plántulas disminuye gradualmente a medida que se prolonga el tiempo de inmersión (Baumberger *et al.*, 2012; Higa *et al.*, 2012; Iwanaga *et al.*, 2015)

4.2 Efectos de las inundaciones en el crecimiento y morfología de la parte aérea de las plántulas

La inducción del metabolismo anaeróbico, los cambios bioquímicos y el aumento del sistema de defensa antioxidante de la planta, que se activa como respuesta al aumento de ROS, se consideran respuestas a corto plazo frente al estrés por inundación (Jiménez *et al.*, 2012). Cuando el estrés hídrico por inundación se prolonga, las plantas pueden presentar adicionalmente modificaciones anatómicas y morfológicas (Jiménez *et al.*, 2012). Entre las principales adaptaciones, algunas especies adoptaron la estrategia de elongar el tallo o los pecíolos de las hojas durante los eventos de inundación, para evitar la inmersión completa y poder restablecer el contacto con el aire (Blom *et al.*, 1990; Jackson, 2008). Los resultados de este trabajo indican que las plántulas de acacia negra no muestran esta adaptación, pues sometidas a cualquiera de los períodos de inundación no presentaron hipocotile ni epicotile más elongados que las plántulas control. Esta respuesta podría relacionarse con el hecho de que las plantas leñosas presentan un crecimiento relativo más lento que las plantas herbáceas y muchas especies tienen la estrategia de desacelerar el metabolismo no esencial y conservar los metabolitos para sobrevivir hasta que la inundación retroceda (Iwanaga *et al.*, 2015).

Las plántulas que fueron sometidas a períodos de inundación presentaron igual cantidad de hojas que las plántulas control, aunque el área foliar promedio por hoja disminuyó significativamente. Luego de un período de sumersión, en muchas especies se observa clorosis, necrosis o abscisión de hojas (Kozlowski, 1997; Gravatt y Kirby, 1998). En acacia negra, las hojas que aún no habían completado su expansión previamente a que fueran inundadas mostraron clorosis y necrosis, y en algunos casos, aunque se observó muerte del ápice caulinar posteriormente se desarrollaron a partir de una yema axilar igualando el número de hojas de las plántulas control pero con menor área foliar y en consecuencia menor biomasa.

Entre las múltiples respuestas de las plantas a la inundación del suelo, generalmente se observa una disminución en la acumulación de biomasa (Pezeshki, 2001). Las plántulas que permanecieron inundadas presentaron menor peso seco aéreo que las plántulas control, aunque solo fueron significativas las diferencias generadas por períodos breves. La disminución en peso seco podría tener varias causas. Por un lado, el daño en los tejidos y la disminución de crecimiento, que se vió reflejado en menor área foliar y podría ser consecuencia de daño oxidativo, por otro lado la disminución de tasa fotosintética (Kozlowski, 1997).

También se observó modificación del diámetro del tallo en función del periodo de inundación. En períodos de 24 h los tallos presentaron mayor diámetro y menor diámetro en las plántulas que permanecieron 6 días inundadas, mientras que los controles presentaron valores intermedios. En algunas especies tolerantes a la inundación, se ha observado un incremento en el diámetro del tallo luego del anegamiento del suelo, por el contrario, en muchas especies intolerantes a la inundación, disminuye el engrosamiento del tallo. El crecimiento del tallo en grosor, en varios casos se debe a un incremento en el número y engrosamiento de elementos xilemáticos, floemáticos o aumento de espacios intercelulares (Kozlowski, 1997). Otros autores plantean el engrosamiento del tallo en su zona basal como respuesta a la producción de etileno, que se induce en plantas inundadas o de suelos anegados (Pereira y Kozlowski, 1977; Jackson, 1990). Se necesitan estudios de carácter anatómico y/o fisiológico para dilucidar el efecto de períodos de inundación de distinta duración en el desarrollo del tallo de plántulas de acacia negra.

4.3 Efectos de las inundaciones en el crecimiento y morfología de la parte subterránea de las plántulas

Al comienzo de una inundación los espacios de aire presentes entre las partículas del suelo, son reemplazados por el agua de inundación y el oxígeno es consumido rápidamente en la respiración de las raíces y los microorganismos del suelo (Blom *et al.*, 1990; Jiménez *et al.*, 2012). A consecuencia del déficit de oxígeno, en las raíces de las plantas sumergidas ocurren los mismos cambios metabólicos y bioquímicos que se dan en la parte aérea, pero también hay que considerar que disminuye la disponibilidad de varios

nutrientes, a consecuencia de la caída del potencial redox del suelo y aumenta la concentración de iones tóxicos en el medio (Davy *et al.*, 1990; Jiménez *et al.*, 2012).

El principal cambio anatómico que se observa en plantas de humedales o de hábitats cuyos suelos se inundan frecuentemente, es la formación de aerénquima (Blom *et al.*, 1990; Kozłowski y Pallardy, 2002; Jiménez *et al.*, 2012), algunos autores relacionaron el desarrollo de aerénquima en la raíz con el aumento de su diámetro (Visser *et al.*, 2000; Pardos, 2004). En este trabajo, no se detectó un engrosamiento de la raíz principal en plántulas que permanecieron inundadas por períodos breves y en las plántulas que sobrevivieron a seis días de inundación el diámetro de la raíz principal fue significativamente menor que en las plántulas control. Se necesitan otros estudios para confirmar la ausencia o presencia de aerénquima y esclarecer qué cambios internos ocurren en las raíces de plántulas de acacia negra como efecto de las inundaciones.

Si bien la disponibilidad de oxígeno puede no ser crítica para la supervivencia de la raíz, sí lo es para su crecimiento (Armstrong *et al.*, 1994). En general, el crecimiento del sistema radical se ve más afectado que el crecimiento de las partes aéreas (Kozłowski, 1984). Muchos trabajos reportaron una disminución en la acumulación de biomasa subterránea, que generalmente, es mayor que la disminución de biomasa aérea (Pezeshki, 2001). Las plántulas de acacia negra que se sometieron a períodos de inundación de 24 y 48 h presentaron menor peso seco subterráneo que las plántulas control, sin embargo, las plántulas que permanecieron inundadas 72 h y seis días revirtieron dichas diferencias. Respuestas similares se observaron en otras variables como superficie radical, cantidad de ápices radicales y longitud de raíz principal. Estos hechos señalaron que las plántulas de acacia negra tienen una respuesta bifásica a la inundación. Períodos de inundación breves solamente activan la fase de alarma en la reacción al estrés (Azcón-Bieto y Talón, 2013), mientras que períodos más prolongados desencadenan algunos mecanismos de tolerancia que explicarían la reversión que se observa en varios caracteres morfológicos.

4.4 La situación de ribera

El río Luján es un río de llanura que sufre desbordes frecuentes, durante estos eventos las riberas donde crece la acacia negra, permanecen anegadas algunos días. De acuerdo a los registros de la Red Hidrométrica UNLu, en la intersección del río con la Ruta 6 (<https://redhidro.unlu.edu.ar/index>), entre 2018 y 2020, el agua estuvo por encima de 1m de altura (nivel de base aproximado del río: 0,6m) 136 días, de los cuales en ocho ocasiones la inundación sólo duró un día, cuatro veces duró dos y nueve veces tres días, siendo la frecuencia menor para períodos de mayor duración. De modo que los tratamientos de los experimentos que se llevaron a cabo en este trabajo, remiten a períodos que se observan con regularidad en el río Luján.

Las inundaciones facilitan la dispersión de propágulos, aclaran la vegetación de ribera y depositan una capa de sedimentos sobre el suelo que puede facilitar el establecimiento

de nuevas poblaciones (Pardos, 2004; Castro Díez *et al.* 2014), el éxito en la colonización dependerá de las características intrínsecas de cada especie y la respuesta que presenten frente a las condiciones ambientales a las que arriban (McAlpine y Jesson, 2008). Según los resultados obtenidos en este trabajo, las inundaciones breves que se dan con frecuencia en el río Luján, aumentarían la probabilidad de germinación y emergencia de plántulas de acacia negra, favoreciendo la colonización de estos nuevos ambientes.

En su hábitat de origen, la acacia negra ha sido categorizada como una especie moderadamente tolerante al anegamiento del suelo (Hook, 1984), sin embargo, cuando las plantas se encuentran en estado juvenil, las inundaciones suelen cubrirlas completamente. En condiciones de laboratorio, las plántulas de acacia negra sobrevivieron a períodos de inundación breves por lo que podría esperarse que sobrevivan a las inundaciones frecuentes que se dan en el río Luján, aunque se necesitan otros estudios para confirmar este supuesto dado que los eventos de inundación simulados fueron inundaciones estáticas, sin oxigenación ni recambio de agua, condiciones diferentes a las que se dan en el campo cuando el río sale de su cauce.

Luego de las inundaciones, la capacidad que tengan las plántulas que sobreviven para evitar el daño oxidativo y reanudar el crecimiento, puede ser un factor clave en determinar el resultado de la competencia con otras especies (Lopez y Kursar, 1999). Según este trabajo, todas las plántulas de acacia negra que permanecieron sumergidas por inundaciones de distinta duración al finalizar los ensayos redujeron el área foliar y algunas también el desarrollo radical. Si bien el hecho de presentar hojas de menor tamaño y sistemas radicales menos desarrollados, afecta la tasa fotosintética de una planta y su crecimiento, es más grave la situación que se observa en otras plantas cuando la inundación afecta principalmente el sistema radical y luego este no logra abastecer la demanda de la transpiración, provocando la desecación de toda la planta (Kozlowski, 1984). La reversión que se observó en algunos caracteres morfológicos indicaría que las plántulas de acacia negra que sobreviven al estrés por inundación luego pueden recuperarse exitosamente.

Capítulo 5

Conclusiones

Conclusiones y consideraciones finales

Los tratamientos de inundación aumentan la probabilidad de germinación de las semillas de acacia negra y disminuyen el tiempo de latencia, favoreciendo el proceso de germinación, aunque no se hayan observado efectos en la proporción de semillas que germinaron. Los períodos breves de inundación incrementan la probabilidad de emergencia de plántulas, considerando la duración de los mismos, la inundación por 24 h arrojó los máximos valores.

La supervivencia de plántulas de acacia negra disminuye gradualmente a medida que se prolonga el tiempo de inundación. Todas las plántulas sobrevivieron a períodos de inundación breves, solamente un 25 % sobrevivió a seis días de inundación y ninguna sobrevivió a inundaciones de diez días de duración.

Todas las plántulas de acacia negra que sobrevivieron a los períodos de inundación, presentaron menor área foliar, señalando que el estrés por inundación tiene un efecto negativo en el desarrollo de las plántulas. Considerando otros órganos de las plántulas y los efectos que se observaron según la duración de los períodos de inundación, las respuestas fueron variadas y se necesitan otros estudios de carácter anatómico y fisiológico para determinar cuáles procesos están involucrados.

Los resultados obtenidos contribuyen a explicar los mecanismos que permiten el establecimiento de esta especie invasora en las riberas del río Luján. Las inundaciones frecuentes que se dan en las riberas del río beneficiarían la emergencia de plántulas de acacia negra y no afectarían la supervivencia de plántulas que queden sumergidas por pocas horas o días.

Referencias bibliográficas

- Armstrong, W., Brändle, R., y Jackson, M. B. 1994. Mechanisms of flood tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica*, 43(4):307-358.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 2013. Fundamentos de fisiología vegetal. Editorial McGraw-Hill, España.
- Baumberger, T., Mesléard, F., Croze, T., y Affre, L. 2012. Effects of experimental submersion on survival, growth, and dry biomass allocation of the rare salt marsh plant *Limonium girardianum*. *Aquatic botany*, 102(2012):65-70.
- Benedetti R., S., Cáceres, G., V., Delard R., C., y González O., M. 2000. Monografía de árbol de las tres espinas *Gleditsia triacanthos*. Instituto Forestal, Instituto de Desarrollo Agropecuario y Fundación para la Innovación Agraria. LOM Ediciones Ltda., Santiago de Chile.
- Blair, R. M. 1990. *Gleditsia triacanthos* L. honeylocust. En: Burns, R. M. y Honkala, B. H. (eds) *Silvics of North America, Vol. 2—Hardwoods, Agricultural Handbook No. 654* (pp. 358-364). Forest Service, United States Department of Agriculture, Washington, DC.
- Blom, C. W. P. M., Bögemann, G. M., Laan, P., Van der Sman, A. J. M., Van de Steeg, H. M. y Voeselek, L. A. C. J. 1990. Adaptations to flooding in plants from river areas. *Aquatic Botany*, 38(1):29-47.
- Bonner F. T., Karrfalt, R. P. 2008. The woody plant seed manual, Agriculture handbook 727. United States Department of Agriculture, Forest Service.
- Burton, P. J., y Bazzaz, F. A. 1991. Tree seedling emergence on interactive temperature and moisture gradients and in patches of old-field vegetation. *American Journal of Botany*, 78(1):131-149.
- Cappello, V. y de la Peña, C. 2007. Propuesta de manejo de acacia negra (*Gleditsia triacanthos*) en la cuenca del río Luján. Dirección provincial de preservación de la biodiversidad. Secretaría de Política Ambiental. Gobierno de la Provincia de Buenos Aires.
- Castro Díez, P., González Muñoz, N., y Alonso Fernández, Á. 2014. Los árboles exóticos de las riberas españolas ¿Una amenaza para estos ecosistemas? Servicio de Publicaciones de la Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid.
- Castro-Díez, P., Alonso, A., Gutiérrez-López, M., de las Heras, P., Medina-Villar, S., Pérez-Corona, E., Trigo, D., Vázquez de Aldana, B. R. 2015. Integración de impactos ecológicos causados por plantas exóticas invasoras: propuesta metodológica. *Ecosistemas*, 24(1): 12-17.
- Chaneton E. J., Mazia C. N., Machera M., Uchitel A., Ghera C. M. 2004. Establishment of honey locust (*Gleditsia triacanthos*) in burned pampean grasslands. *Weed Technol*, 18:1325-1329.
- Chen, F. Q. y Xie, Z. Q. 2009. Survival and growth responses of *Myricaria laxiflora* seedlings to summer flooding. *Aquatic Botany*, 90(4):333-338.
- Crawford, R. M. M. y Braendle, R. 1996. Oxygen deprivation stress in a changing environment. *Journal of experimental botany*, 47(2):145-159.
- Csurhes S., Markula, A. 2010. Weed risk assessment: Honey locust tree (*Gleditsia triacanthos*). Department of Employment, Economic Development and Innovation, Queensland.
- Cummins, K. W. 1974. Structure and function of stream ecosystems. *BioScience*, 24:631-641.
- Davy, A. J., Noble, S. M. y Oliver, R. P. 1990. Genetic variation and adaptation to flooding in plants. *Aquatic Botany*, 38(1):91-108.

- Di Iorio, O. R. 1995. *Lophopoeum timbouvae* Lameere, 1884 and *L. bruchi* Monné & Martins, 1976 (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae: Acanthocinini): their relation to fruits of Leguminosae. *Giornale italiano di Entomologia*, 7(39):231-245.
- Di Iorio, O. R. 2005. Una especie asiática de Bruchinae (Coleoptera: Chrysomelidae) que se desarrolla en las semillas de *Gleditsia triacanthos* L. (Caesalpiniaceae) en la Argentina. *Agrociencia*, 39(3):327-337.
- Di Rienzo, J. A. 2011. Análisis de regresión logística. Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Córdoba
- Di Rienzo, J. A., Balzarini, M. G., González, L., Casanoves, F., Tablada, M., y Robledo, C. W. 2017. InfoStat versión libre 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <https://www.infostat.com.ar>
- Esau, K. 1985. Anatomía vegetal. 3era edición. Ediciones Omega, Barcelona.
- Fernandez, R. D., Ceballos, S. J., Malizia, A. y Aragón, R. 2017. *Gleditsia triacanthos* (Fabaceae) in Argentina: a review of its invasion. *Australian Journal of Botany*, 65(3):203-213.
- Ferreira, L. V. y Stohlgren, T. J. 1999. Effects of river level fluctuation on plant species richness, diversity, and distribution in a floodplain forest in Central Amazonia. *Oecologia*, 120(4):582-587.
- Fridley J. D. 2011. Invasibility of communities and ecosystems. En: Simberloff D., Rejmánek R. (eds) *Encyclopedia of biological invasions* (pp. 356-360). University of California Press, Berkeley.
- Gantes P., Marano A. y Rigacci L. 2011. Changes in the decomposition process associated with the invasion of *Gleditsia triacanthos* (honey locust) in pampean streams (Buenos Aires, Argentina). *Journal of Freshwater Ecology*, 26(4):481-494.
- Ghera C. M., de la Fuente E., Suarez S., León R J. C. 2002. Woody species invasion in the Rolling Pampa grasslands, Argentina. *Agric Ecosyst Environ*, 88(3):271-278.
- Giorgi, A., Vilches C., Rodríguez Castro M., Zunino E., Debandi J., Kravetz S. y Torremorell A. 2014. Efecto de la invasión de acacia negra (*Gleditsia triacanthos* L. (Fabaceae)) sobre la temperatura, luz y metabolismo de un arroyo pampeano. *Acta Biológica Colombiana*, 19(1):99-106.
- Giorgis, M. A. y Tecco, P. A. 2014. Árboles y arbustos invasores de la provincia de Córdoba (Argentina): una contribución a la sistematización de bases de datos globales. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 49(4):681-603.
- González-Zertuche L. y Orozco-Segovia A. 1996. Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda brachystachya*. *Bol. Soc. Bot. Mex.*, 58:15-30.
- Gravatt, D. A. y Kirby, C. J. 1998. Patterns of photosynthesis and starch allocation in seedlings of four bottomland hardwood tree species subjected to flooding. *Tree physiology*, 18(6), 411-417.
- Higa, M., Moriyama, T., y Ishikawa, S. 2012. Effects of complete submergence on seedling growth and survival of five riparian tree species in the warm-temperate regions of Japan. *Journal of forest research*, 17(2):129-136.
- Hook, D. D. 1984. Waterlogging tolerance of lowland tree species of the south. *Southern Journal of Applied Forestry*, 8(3):136-149.
- Iwanaga, F., Tanaka, K., Nakazato, I., y Yamamoto, F. 2015. Effects of submergence on growth and survival of saplings of three wetland trees differing in adaptive mechanisms for flood tolerance. *Forest systems*, 24(1):1-9.

- Jackson, M. B. 1990. Hormones and developmental change in plants subjected to submergence or soil waterlogging. *Aquatic Botany*, 38(1):49-72.
- Jackson, M. B., Ishizawa, K. y Ito, O. 2009. Evolution and mechanisms of plant tolerance to flooding stress. *Annals of Botany*, 103(2):137-142.
- Jiménez S., J. de la C., Moreno F., L. P. y Magnitskiy, S. 2012. Respuesta de las plantas a estrés por inundación. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 6(1):96-109.
- Kabrick, J. M., Dey, D. C., Van Sambeek, J. W., Coggeshall, M. V., & Jacobs, D. F. 2012. Quantifying flooding effects on hardwood seedling survival and growth for bottomland restoration. *New Forests*, 43:695-710.
- Kalesnik, F., Malvárez, A. I. 2003. Las especies invasoras exóticas en los sistemas de Humedales. El caso del Delta Inferior del Río Paraná. *Miscelánea*, 12:5-12.
- Koppel, A., Jaenes, A., y Lôhmus, K. 1988. Bead method for measuring the root surface area in conifers. *Plant and soil*, 112(2):201-203.
- Kozłowski, T. T. 1984. Plant responses to flooding of soil. *BioScience*, 34(3):162-167.
- Kozłowski, T. T. 1997. Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree physiology Monograph No. 1*, 1-29.
- Kozłowski, T. T. y Pallardy, S. G. 2002. Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *The botanical review*, 68(2):270-334.
- Leggieri, L. 2010. Invasión de *Gleditsia triacanthos* en los corredores de los sistemas fluviales de la Pampa Ondulada y su efecto sobre la distribución de *Myocastor coypus*. *Ecología Austral*, 20:201-208.
- Light, H. M., Darst, M. R., Lewis, L. J. y Howell, D. A. 2002. Hydrology, vegetation, and soils of riverine and tidal floodplain forests of the lower Suwannee River, Florida, and potential impacts of flow reductions (No. 1656). US Geological Survey.
- Lopez, O. R. y Kursar, T. A. 1999. Flood tolerance of four tropical tree species. *Tree Physiology*, 19(14):925-932.
- Mazía, C. N., Chaneton, E. J., Machera, M., Uchitel, A., Feler, M.V. y Ghera, C. M. 2010. Antagonistic effects of large- and small-scale disturbances on exotic tree invasion in a native tussock grassland relict. *Biol. Invasions*, 12:3109-3122.
- McAlpine, K. G. y Jesson, L. K. 2008. Linking seed dispersal, germination and seedling recruitment in the invasive species *Berberis darwinii* (Darwin's barberry). *Plant Ecology*, 197(1):119-129.
- McDonald J. H. 2014. Handbook of biological statistics. 3rd ed. Sparky house Publishing, Baltimore.
- Naiman, R. J., Décamps, H., McClain M. E. y Likens, G. E. 2005. Riparia. Ecology, Conservation, and Management of Streamside Communities. Elsevier.
- Natale, E. y Reinoso, H. 2016. The importance of flood events on the establishment of seedlings and cuttings of saltcedar (*Tamarix ramosissima*). *Ecología Austral*, 26:001-006.
- Nebel, J. P., y Porcile, J. F. 2006. La contaminación del bosque nativo por especies arbóreas y arbustivas exóticas. Departamento de bosque nativo, manejo y protección forestal, Uruguay.
- Nilsson C. y Svedmark M. 2002. Basic principles and ecological consequences of changing water regimes: riparian plant communities. *Environ. Manage.*, 30:468-480.
- Pardos, J. A. 2004. Respuestas de las plantas al anegamiento del suelo. *Invest. Agrar.: Sist. Recur. For.*, 13(4):101-107.

- Parker, J. (1953). Some applications and limitations of tetrazolium chloride. *Science*, 118(3055):77-79.
- Perata, P., y Alpi, A. 1993. Plant responses to anaerobiosis. *Plant science*, 93(1993):1-17.
- Pereira, J. S. y Kozlowski, T. T. 1977. Variations among woody angiosperms in response to flooding. *Physiol. Plant.*, 41(3):184-192.
- Pezeshki, S. R. 2001. Wetland plant responses to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, 46(3), 299-312.
- Pollen-Bankhead, N. y Simon, A. 2010. Hydrologic and hydraulic effects of riparian root networks on streambank stability: Is mechanical root-reinforcement the whole story? *Geomorphology*, 116(2010):353-362.
- Prieto, A. R., Blasi, A. M., De Francesco, C. G., y Fernández, C. 2004. Environmental history since 11,000 14C yr B.P. of the northeastern Pampas, Argentina, from alluvial sequences of the Luján River. *Quaternary Research*, 62(2004):146-161.
- Retuerto, R., Rodríguez Roiloa, S., Fernández Lema, B. y Obeso, J. R. 2003. Respuestas compensatorias de plantas en situaciones de estrés. *Ecosistemas*, 12(1).
- Richardson D. M., Holmes, P. M., Esler, K. J., Galatowitsch, S. M., Stromberg, J. C., Kirkman, S. P., Pysek P., Hobbs, R. J. 2007. Riparian vegetation: degradation, alien plant invasions, and restoration prospects. *Divers Distrib.* 13:126–139.
- Rodríguez Quilón, I., Adam, G., y Durán, J. M. 2008. Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. *Agricultura: Revista Agropecuaria*, 78(912), 836-842.
- Ruiz, M. A. 2009. El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: Cebadilla chaqueña. Publicación técnica No. 77. E.E.A. INTA Anguil.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. y Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7):671-675,
- Scott, S. J., Jones, R. A., y Williams, W. 1984. Review of data analysis methods for seed germination. *Crop science*, 24(6):1192-1199.
- Singh, D. P., Hooda, M. S., y Bonner, F. T. 1991. An evaluation of scarification methods for seeds of two leguminous trees. *New forests*, 5(2):139-145.
- Sosa, B., Caballero, N., Carvajales, A., Fernández, G., Mello, A. L., Achkar, M. 2015. Control de *Gleditsia triacanthos* en el Parque Nacional Esteros de Farrapos e islas del río Uruguay. *Ecología Austral*, 25:250-254.
- Vervuren, P. J. A., Blom, C. W. P. M. y De Kroon, H. 2003. Extreme flooding events on the Rhine and the survival and distribution of riparian plant species. *Journal of ecology*, 91(1):135-146.
- Visser, E. J. W., Bögemann, G. M., Van de Steeg, H. M., Pierik, R. y Blom, C. W. P. M. 2000. Flooding tolerance of *Carex* species in relation to field distribution and aerenchyma formation. *New Phytologist*, 148(1):93-103.
- Voesenek, L. A. C. J., Colmer, T. D., Pierik, R., Millenaar, F. F., y Peeters, A. J. M. 2006. How plants cope with complete submergence. *New phytologist*, 170(2):213-226.
- Ward J. V., Tockner K., Arscott D. B., Claret C. 2002. Riverine landscape diversity. *Freshwater biology*, 47: 517-539.
- Ward, J.V., Malard, F. y Tockner, K. 2002. Landscape ecology: a framework for integrating pattern and process in river corridors. *Landscape Ecology*, 17:35-45.
- Willan, R. L. 1991. Guía para la manipulación de semillas forestales con especial referencia a los trópicos (No. Fe 20/2). FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.

Anexos

Anexo I: Método de estimación de la humedad del sustrato

Para establecer la relación entre el peso fresco y el porcentaje de humedad del sustrato, primeramente, se determinó cuanto pesaba el sustrato de las unidades experimentales cuando retenía la máxima cantidad de agua posible. Se secó sustrato en estufa a 60 °C hasta peso constante y se agregaron 280 g de sustrato seco a tres potes de peso conocido. El sustrato se humedeció por goteo, hasta observar que el exceso de agua drenara fuera del pote, se utilizó una pipeta para registrar los mililitros de agua usados. Este procedimiento se realizó lentamente en 24 h, dejando que el sistema repose luego de cada adición de agua. Durante todo el proceso los potes se mantuvieron en laboratorio, en un sitio fresco, oscuro y tapados para evitar pérdidas de agua por evaporación. Al finalizar, se registró el peso de los potes con el sustrato húmedo y se obtuvo el peso del sustrato en su máxima capacidad de retención de agua.

La máxima cantidad de agua que el sustrato de las unidades experimentales pudo retener, se consideró como 100 % de la capacidad de retención del sustrato. Se calculó la cantidad de agua que debía contener el sustrato para presentar 25, 50 y 75 % de la capacidad de retención. Para cada porcentaje de capacidad de retención se utilizaron 3 potes de peso conocido con 280 g de sustrato seco cada uno y se siguió el mismo procedimiento para humedecer el sustrato por goteo, hasta aportar la cantidad de agua necesaria para obtener sustratos con 25, 50 y 100 % de capacidad de retención. Otros tres potes con sustrato seco se destinaron al tratamiento control, a estos no se les agregó agua. Al finalizar se registró el peso de los potes con el sustrato húmedo y descartando el peso de cada pote, se obtuvo el peso del sustrato para cada porcentaje de capacidad de retención por triplicado.

Se hizo una regresión lineal entre las variables Capacidad de retención (%) y Agua de riego (ml) (figura 30), la ecuación del modelo ajustado permitió predecir la cantidad de agua que requería el sustrato seco para llevarlo a un determinado nivel de humedad. Se hizo otra regresión lineal entre la Capacidad de retención (%) y el Peso fresco del sustrato (g) (figura 31), el modelo ajustado posibilitó mantener el sustrato próximo a una determinada humedad controlando su peso y ajustando su valor mediante riego cuando era necesario. Ambos análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa InfoStat (versión libre 2017) (Di Rienzo *et al.*, 2017) y los gráficos de las figuras se realizaron en Excel, Microsoft Office 2016.

Tener presente que las relaciones establecidas entre variables, sólo son válidas y pueden aplicarse cuando el sustrato utilizado sea de las mismas características y cantidad que el empleado en estos ensayos, al igual que los potes.

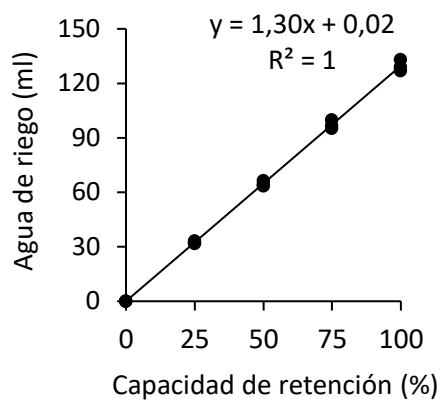


Figura 30. Relación lineal positiva entre la capacidad de retención del sustrato y el agua de riego aportada (n=15, $p < 0,001$).

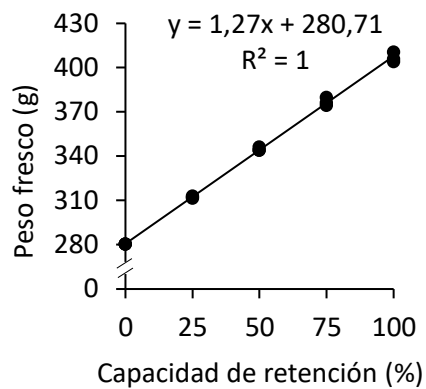


Figura 31. Relación lineal positiva entre el peso fresco del sustrato y su capacidad de retención (n=15, $p < 0,001$).

Anexo II: Contenido óptimo de humedad del sustrato para la germinación

Se llevó a cabo un ensayo preliminar para determinar un nivel óptimo de humedad de sustrato para la germinación y desarrollo de plántulas de *G. triacanthos*. Los tratamientos consistieron en cuatro niveles de humedad, 25, 50, 75 y 100 % de la capacidad de retención del sustrato, más un tratamiento control que no recibió aporte de agua. Para lograr los distintos tratamientos, utilizando la ecuación de la función lineal estimada previamente (figura 30), se calculó la cantidad de agua que se debía agregar a los potes con 280 g de sustrato seco. El sustrato se humedeció por goteo, siguiendo el procedimiento detallado en el Anexo I. Se empleó un diseño completamente aleatorizado, con tres réplicas por tratamiento.

Se utilizaron potes dobles (Figura 2) y se sembraron 4 semillas escarificadas en cada uno, paralelas a la pared del pote transparente, para que fueran posibles las observaciones durante la experiencia. Los potes dobles de todos los tratamientos se dispusieron sobre una mesa de trabajo en invernáculo y a diario se cambió aleatoriamente su posición, para disminuir efectos de borde. Para compensar la pérdida de agua del sustrato por evaporación, los potes se pesaron diariamente y cuando fue necesario, mediante riego por goteo, se aportó agua para restablecer el peso fresco inicial del sustrato.

Durante los 21 días que duró la experiencia, periódicamente se realizaron observaciones de las semillas para registrar los eventos de emisión de radícula y emergencia de plántulas y al finalizar la experiencia se estimó para cada réplica el porcentaje final de germinación (figura 32) y emergencia (figura 33). A estas variables se les realizó la transformación arcoseno (McDonald, 2014) y al no cumplir con los supuestos para analizarlas mediante ANOVA, se llevó a cabo un análisis no paramétrico, prueba Kruskal-Wallis para muestras independientes y *a posteriori* una prueba de Tukey para la comparación entre grupos. Se utilizó el programa estadístico IBM® SPSS® Statistics (versión 21) y los gráficos de las figuras se realizaron en InfoStat (versión libre 2017) (Di Rienzo *et al.*, 2017).

El porcentaje de germinación y emergencia de plántulas fue nulo para el tratamiento control y para la humedad de sustrato de 25 % de la capacidad de retención. Estos tratamientos se diferenciaron significativamente de los demás niveles de humedad. Pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos 50, 75 y 100 % de la capacidad de retención del sustrato.

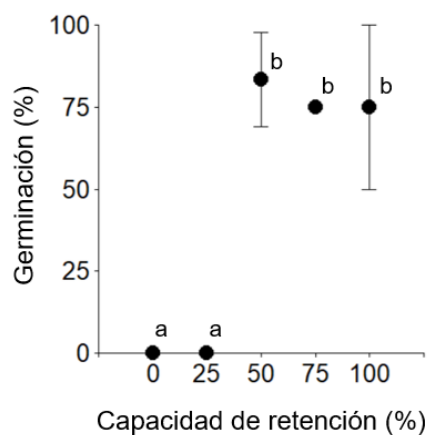


Figura 32. Porcentajes medios de germinación. Las barras representan el desvío estándar. Letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

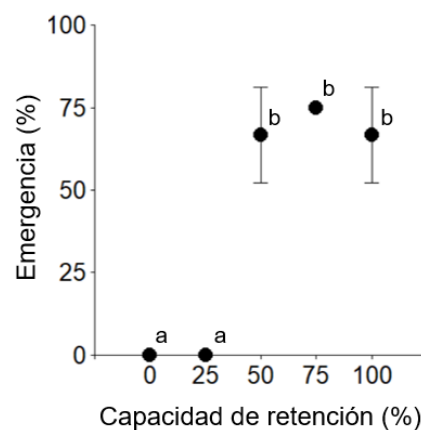


Figura 33. Porcentajes medios de emergencia. Las barras representan el desvío estándar. Letras diferentes señalan diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

En base a los resultados de este ensayo preliminar, el nivel de humedad de sustrato de 25 % de la capacidad de retención se descarta para utilizar en ensayos futuros, porque en las condiciones evaluadas no sería una humedad de sustrato apropiada para que las semillas de *G. triacanthos* germinen y se desarrollen.

Varios autores sostienen que para la realización de ensayos de germinación el sustrato debe encontrarse lo suficientemente húmedo para aportar a la semilla el agua que necesite, pero asimismo el exceso de humedad es perjudicial al reducir la aireación. Dado que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de 50, 75 y 100 % de la capacidad de retención, se decidió realizar los ensayos con una humedad de sustrato del 75 % de la capacidad de retención, el valor intermedio de dicho rango.