

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

**TRABAJO FINAL PRESENTADO PARA OPTAR AL GRADO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**NIVELES ENDÓGENOS DE ÁCIDO ABCSÍCO EN  
PLÁNTULAS DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.)  
PROVENIENTES DE SEMILLAS OBTENIDAS DE PLANTAS  
CRECIDAS BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE  
HUMEDAD DEL SUELO**

**ALUMNA: VICTORIA GADEA  
DNI: 30.734.581**

**DIRECTOR: DRA. ANA VIGLIOCCO**

**RÍO CUARTO, CÓRDOBA, ARGENTINA**

**Mayo 2009**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

## CERTIFICADO DE APROBACIÓN

**Niveles endógenos de ácido abscísico en plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.)  
provenientes de semillas obtenidas de plantas crecidas bajo diferentes condiciones de  
humedad del suelo.**

Autor: Victoria Leonor Gadea

DNI: 30734581

Directora: Dra. Ana Edit Vigliocco

Aprobado y corregido de acuerdo a las sugerencias del Jurado Evaluador:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Fecha de Presentación: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Aprobado por la Secretaría Académica: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Secretario Académico

**AGRADECIMIENTOS**

A mi directora Ana Vigliocco, por su orientación y permanente disponibilidad;

A Sergio Alemanno por haberme dado la posibilidad de trabajar el tema elegido en la Cátedra de Fisiología Vegetal;

A Andrea Andrade, por su ayuda en las tareas de laboratorio;

A Leonor y Martín, por sus advertencias y correcciones;

A mis profesores, que guiaron mi acceso a nuevos conocimientos;

A mis amigos, con quienes comparto el camino de la vida y la formación;

A mi familia, fuente y sostén de todos mis aprendizajes.

## **ÍNDICE**

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b> .....	V
<b>SUMMARY</b> .....	VI
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
- Importancia del cultivo de Girasol. Caracterización y relación con el estrés hídrico.....	1
- Descripción del cultivo.....	2
- Fases fenológicas del cultivo.....	3
- El Acido Abscísico (ABA): Biosíntesis y Funciones.....	5
- Biosíntesis.....	5
- Funciones.....	7
- Efecto del Ambiente en que creció la planta madre: su incidencia en las características de la progenie.....	8
- Hipótesis.....	9
- Objetivo general.....	9
- Objetivos específicos.....	9
<b>MATERIALES, TÉCNICAS Y MÉTODOS</b> .....	10
- Material vegetal.....	10
- Condiciones de crecimiento de las plántulas.....	10
- Variables evaluadas.....	11
- Evaluación de energía y poder germinativo.....	11
- Determinación de peso fresco y peso seco .....	11
- Extracción y cuantificación de ácido abscísico.....	11
- Análisis estadístico.....	12
<b>RESULTADOS</b> .....	13
- Niveles endógenos de ABA.....	13
- Evaluación de energía y poder germinativo.....	14
- Evaluación de peso fresco y peso seco de las plántulas.....	17
<b>DISCUSIÓN</b> .....	20
<b>CONCLUSIONES</b> .....	22
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	23

## RESUMEN

El ácido abscísico (ABA) coordina el crecimiento y desarrollo de las plantas además de estar involucrado en las respuestas a factores de estrés ambiental. El objetivo de este trabajo fue analizar los niveles basales de ABA en plántulas de girasol de las líneas B59 (sensible a estrés hídrico) y B71 (tolerante a estrés hídrico) provenientes de semillas obtenidas de plantas madres cuyo proceso de crecimiento se desarrolló bajo condiciones de riego y sequía. La información obtenida fue correlacionada con la sensibilidad al estrés hídrico y las variables: energía y poder germinativo, peso fresco y seco y niveles de ABA. Se colocaron cincuenta semillas por repetición en bandejas de plástico sobre arena. El contenido hídrico del sustrato al momento de siembra fue 60% de la capacidad de campo y a partir del 4to día a capacidad de campo. Las plántulas fueron cosechadas a los 11 días de la siembra, se congelaron en N<sub>2</sub> y se conservaron a -80 °C. Los parámetros evaluados fueron: energía y poder germinativo, peso fresco y seco y niveles endógenos de ABA. Los resultados obtenidos fueron: plántulas de ambas líneas provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de sequía, presentaron mayores niveles endógenos de ABA que las crecidas en riego; semillas de la línea B59 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de sequía, presentaron mayor poder germinativo que las provenientes de riego; tanto en energía germinativa como en peso fresco y seco no se observaron diferencias significativas entre las líneas B59 y B71; el parámetro que permitió diferenciar ambas líneas fue el poder germinativo; una correlación positiva fue hallada entre peso seco y energía germinativa. Los resultados finales indican que ABA está involucrado en la tolerancia a estrés hídrico y las condiciones ambientales en que creció la planta madre, modifican los niveles endógenos de ABA en plántulas y el poder germinativo de las semillas de la progenie.

*Palabras claves:* Ácido abscísico, *Helianthus annuus* L., estrés hídrico, plántula, ambiente materno.

## SUMMARY

Abscisic acid (ABA) plays essential roll in plant growth and development, as well as it is involved in the responses to environmental stress. Objective of the present work was analysed the ABA endogenous level in sunflower seedlings from plants grown under irrigation and drought, in two lines with different sensitivity to drought condition, line B59 (sensitive) and B71 (tolerant). The information obtained, was correlated with stress drought sensitivity and the variables: germination energy, final count of germination, fresh and dry weight. Fifty seeds were placed in pots containing sand. The hydric content at sowing time was 60% of field capacity. At day 4 and until the end of experience the seedlings were watered at field capacity. The seedlings were harvested at day 11 after sowing, frozen in liquid nitrogen and stored at -80° C. The parameters evaluated were: fresh weight, dry weight, ABA endogenous level, germination energy and final count of germination. The results obtained were: seedlings of both lines grown under drought showed the highest ABA endogenous levels. B59 seeds obtained from plants grown under drought showed higher final count of germination than those from plants grown under irrigation. No differences significant were observed in germination energy, dry weight and fresh weight between both lines. The final count of germination was the parameter used to differentiate the lines. A positive correlation was found between dry weight and germination energy. Our results indicate that ABA plays a role in the tolerance to drought stress and the environmental conditions experienced by the mother plant altered ABA content of the progeny seedlings and final counts of germination of progeny seeds.

*Key words:* Abscisic acid, *Helianthus annuus* L., Drought stress, Seedlings, Mother environment.

## INTRODUCCIÓN

### **Importancia del cultivo de girasol. Caracterización y relación con el estrés hídrico**

El girasol (*Helianthus annuus* L.) tiene una antigüedad aproximada de 5.000 años y su evolución se produjo en el norte de México y en el centro-sur de EEUU.

En la segunda mitad del siglo XVI, la planta fue llevada a Europa y más allá de consideraciones botánicas, atrajo por sus enormes “flores” amarillas. Pedro “El Grande”, colaboró en su difusión fomentando la creación del primer gran polo productor de girasol del mundo. En la segunda mitad del siglo XIX, comenzaron en Rusia las experiencias para obtener madurez en menor tiempo y más aceite en las semillas (Andreani, 2004).

A fines del siglo XIX, el girasol llega a la Argentina en el equipaje de los inmigrantes que arribaron al puerto de Buenos Aires, dispuestos a colonizar las pampas.

A mediados de la década del '30, destacados técnicos argentinos comenzaron la tarea fitogenética, logrando variedades con mayor contenido y rinde aceiteros que las disponibles entonces.

En 1950, la exportación de 103.000 t de aceite, marcó un hito clave. Desde hacía tres años, en Manfredi (Pcia. de Córdoba) se trabajaba cruzando el girasol con especies silvestres emparentadas, a fin de lograr resistencia a enfermedades. En 1970, se logran en Argentina, variedades con 40% de aceite (Andreani, 2004).

En la última década del siglo pasado, el crecimiento del complejo oleaginoso global debido a los altos precios internacionales, encontró en el girasol argentino su mejor ejemplo. En la campaña 1994/95, se sembraron poco más de tres millones de has., nivel que se sostuvo y aún trepó casi un 20% para la '97/98, antes del inédito registro de 4.200.000 de toneladas del ciclo siguiente, que permitió obtener una producción superior a 7.000.000 de toneladas. Argentina se convierte así en el primer exportador mundial de aceite de girasol, desarrollando una de las más competitivas industrias procesadoras de aceite (Andreani, 2004).

El momento vivido por estos commodities desde 1996 fue propicio para el crecimiento de su oferta global, lo que derivó en un exceso de existencia de aceites y en la caída de sus valores.

El siglo XXI comenzó pareciendo ser la “centuria de la soja”, lo que incidió negativamente en el crecimiento del cultivo del girasol. Su reemplazo por la soja en zonas tradicionales y de altos potenciales de rinde, empujó a dicho cultivo a otras áreas de inferiores perspectivas (Andriani, 2004).

El girasol es un cultivo que manifiesta un alto grado de plasticidad, tanto en sus aspectos vegetativos (tamaño de las hojas), como en los reproductivos (número de flores que darán

lugar a los granos), haciendo que pueda adaptarse a un amplio rango de ambientes. Como consecuencia de esa elevada plasticidad, la distribución del girasol es muy amplia en Argentina, abarcando zonas en las que las ofertas de recursos y la incidencia de adversidades son muy variadas.

El ambiente, su oferta de recursos y sus restricciones, imponen límites al rendimiento del cultivo. En el aspecto hídrico, tanto los excesos como las restricciones, constituyen situaciones de estrés para el girasol como para muchos otros cultivos. Generalmente, y en especial cuando estas situaciones se prolongan en el tiempo, determinan mermas muy importantes en el rendimiento (López Pereira y Trápani, 2004).

En Argentina, el área de cultivo de girasol se extiende desde el norte del Chaco hasta el sur de La Pampa. En estas zonas, la planta de girasol debe soportar frecuentes períodos de sequía, problemática que se acentúa hacia el oeste del país (Vázquez y Paoloni, 1991). El estrés hídrico, las bajas temperaturas y la salinidad, son algunos de los factores que afectan principalmente el crecimiento y la productividad de las plantas. Asimismo, las respuestas a factores de estrés por parte de las plantas, dependen de la intensidad y duración del mismo, así como de la especie y del estado de desarrollo de la misma (Chaves *et al.*, 2003). El estrés hídrico en girasol produce disminución en el crecimiento temprano del cultivo, afectando longitud de la raíz, longitud del tallo, área total de la hoja, peso fresco y seco, contenidos de clorofila a y b, clorofila total y carotenos (Manivannan *et al.*, 2007).

Por esta razón, se han desarrollado estrategias para reducir la disminución en los rendimientos de la producción agropecuaria, siendo una de ellas, la de obtener variedades tolerantes al estrés ambiental, como bajas temperaturas, sequía y salinidad (Dvorok y Ross, 1986; Fick y Miller, 1997). Para ésto, es necesario dilucidar los mecanismos que definen las respuestas morfológicas y bioquímicas de las plantas a estas fuentes de estrés y clarificar cómo se generan los mecanismos de ajuste.

### **Descripción del cultivo**

El girasol pertenece a la familia de las *Asteraceae*.

El tallo es el órgano de sostén de las hojas y el capítulo. En la etapa de floración puede medir de 1 a 3 m en los cultivares que se siembran actualmente en Argentina y el diámetro puede variar entre 1 a 5 cm dependiendo de las condiciones del cultivo.

El sistema radical del girasol se encuentra constituido por un eje central y por un conjunto de raíces laterales secundarias y terciarias. Bajo condiciones favorables, la raíz principal puede alcanzar profundidades mayores a los 2 m, sus ramificaciones (raíces secundarias y terciarias) son numerosas en cercanía al cuello de la planta, disminuyendo su densidad

drásticamente a 15 cm del mismo. La raíz es el primer órgano que atraviesa las cubiertas de la semilla en germinación.

Luego de la emergencia del cultivo, cuando los cotiledones se despliegan y quedan por encima de la superficie del suelo, comienza la emisión de hojas verdaderas. Las seis u ocho primeras hojas, nacen en pares y las restantes en forma alternada (Pedraza *et al.*, 2000).

En las hojas se encuentran los tejidos adaptados donde se realiza la mayor parte de la fotosíntesis. Sus hojas son fototrópicas, esta propiedad le permite incrementar la captación de los rayos solares y posibilitar así el proceso de fotosíntesis (Putman *et al.*, 1990).

Las flores en el girasol se reúnen en una inflorescencia. Comúnmente se la llama *cabeza* o *torta*, pero botánicamente se la denomina capítulo. La semilla del girasol (botánicamente, un fruto denominado cipsela), es un fruto seco, uniseminado, con pericarpio (*cáscara*) separado de la verdadera semilla o pepita. En el girasol, la pepita es la que contiene la mayor parte de la materia grasa o aceite (Aguirrezábal *et al.*, 2001).

### **Fases fenológicas del cultivo**

Durante el crecimiento y desarrollo de las plantas de girasol, se pueden distinguir varios cambios fisiológicos y morfológicos que se corresponden con estados relevantes del cultivo. Es decir, el desarrollo del cultivo supone la sucesión progresiva de cambios fisiológicos y morfológicos que van dando lugar a los distintos estados de las plantas. Se identifican así las fases de desarrollo y los estados fenológicos que constituyen hitos de separación entre las mismas.

Se pueden considerar cuatro fases fenológicas, que refieren a los cambios relevantes que sufren las plantas en cada una de ellas (Trápani y López Pereira, 2004).

A- SIEMBRA – EMERGENCIA: es la fase de establecimiento del cultivo en la que tienen lugar la imbibición de las semillas, la emergencia de la radícula, el crecimiento de la plántula y la emergencia de la misma. La temperatura es el factor más importante en el control de la germinación de semillas no dormidas, en suelos no compactados y con adecuada provisión hídrica. La temperatura óptima para la germinación es cercana a los 26°C, con temperaturas máximas de 40°C y mínimas en el rango de entre 3 y 6 °C (Connor y Hall, 1997). En situaciones sin limitaciones hídricas se puede predecir la fecha de emergencia de las plántulas de girasol, conociendo la profundidad de siembra y la temperatura (Villalobos *et al.*, 1994). El agua afecta la emergencia a través de múltiples vías. Directamente, actúa sobre la imbibición de la semilla y sobre el crecimiento posterior de la plántula e indirectamente, condicionando la temperatura y la presión parcial de oxígeno en la

fase gaseosa del suelo. Semillas y plántulas toleran en menor medida el estrés si las comparamos con la planta adulta; por lo tanto, la habilidad de las semillas para convertirse en una planta joven está fuertemente reducida por diferentes tipos de estrés.

- B- EMERGENCIA-INICIACIÓN FLORAL: esta fase comienza con la emergencia de la plántula y finaliza cuando el ápice del vástago, productor de primordios foliares, cambia su forma y actividad, pasando a diferenciar la inflorescencia y sus flores. Durante esta fase, se define la capacidad potencial del cultivo en producir área foliar, pues queda fijado el número de hojas por planta. En paralelo, comienza el proceso de establecimiento del canopeo del cultivo, asociado a la expansión de las hojas emergidas. La duración de la fase emergencia - iniciación floral, depende principalmente del cultivar, la temperatura y el fotoperíodo. La duración de este período será generalmente menor con temperatura, radiación alta y días largos (Trápani y López Pereira, 2004).
- C- INICIACIÓN FLORAL – FLORACIÓN: la fase comienza con la aparición de los primeros primordios florales en el ápice y finaliza con el comienzo de la antesis de las flores de la periferia de la inflorescencia. Durante el primer tercio de esta fase se diferencian los primordios florales. Una vez finalizada la diferenciación floral y hasta la antesis, las flores crecen y adquieren funcionalidad: los estigmas adquieren receptividad y el polen viabilidad. La duración de la fase iniciación floral – floración dependen principalmente del cultivar, la temperatura y el fotoperíodo. La temperatura tiene efectos sobre la duración del período de diferenciación de flores y sobre la tasa de diferenciación de las mismas: a mayor temperatura, la tasa aumenta, pero se acorta el tiempo durante el cual se diferencian las flores. El rango de temperaturas apropiado para obtener el mayor número de flores que llegarán a dar granos, se extiende entre los 20 y los 30°C (Chimenti *et al.*, 2001).
- D- FLORACIÓN – MADUREZ FISIOLÓGICA: esta fase comienza con la antesis de las flores periféricas del capítulo y finaliza con la madurez fisiológica, cuando los granos alcanzan su máximo peso seco. Para definir madurez fisiológica en forma práctica (aunque menos precisa), se utilizan criterios que toman en cuenta los cambios de color del envés del capítulo (pasa de verdoso a amarillento) y de sus brácteas (se tornan marrones). La madurez comercial se determina según el contenido de humedad del fruto adecuado para la cosecha mecánica (13 a 15%) y teniendo en cuenta que la base para su comercialización es de 11%. La duración de la fase floración – madurez fisiológica depende principalmente del cultivar y de la temperatura. La sequía y las enfermedades puede generar un estrés severo que

acelere la pérdida de hojas, interrumpiendo el crecimiento de los granos, determinando así, una menor duración de esta fase (Trápani y López Pereira, 2004).

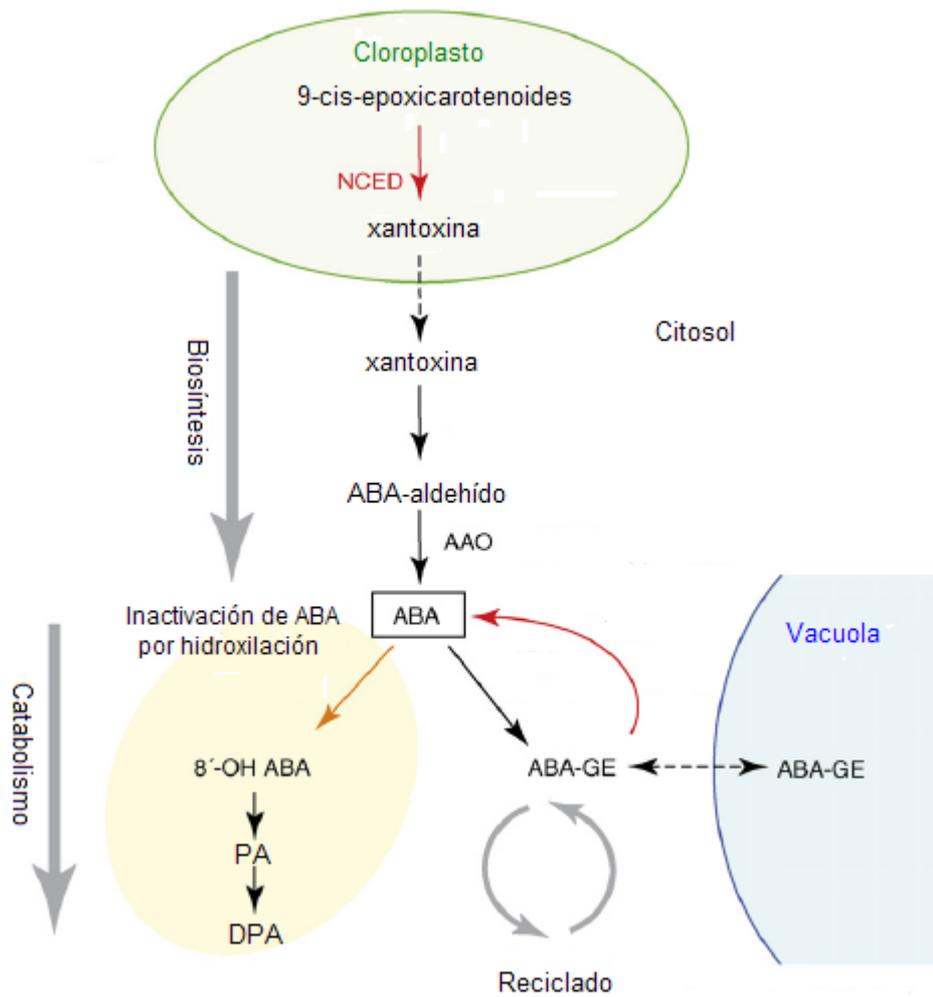
## **El ácido abscísico (ABA): biosíntesis y funciones**

### **Biosíntesis**

En plantas superiores, ABA es sintetizado a través de escisión oxidativa de un precursor carotenoides de 40C. El primer paso, la epoxidación de zeaxantina y anteraxantina a violaxantina, ocurre en plastidios y es catalizada por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP). Luego de una serie de modificaciones estructurales, violaxantina es convertida a 9-*cis*-neoxantina cuya escisión oxidativa por la acción de 9-*cis*-epoxicarotenoides dioxigenasa (NCED) produce un intermediario de 15C, xantoxina. Subsecuentemente, este compuesto es exportado hacia el citosol donde es convertido a ABA, vía ABA-aldehído, mediante dos reacciones enzimáticas catalizadas por ABA aldehído oxidasa (AAO) (Taylor *et al.*, 2000; Finkelstein *et al.*, 2002; Seo y Koshiba, 2002; Xiong y Zhu, 2003; Schwartz y Zeevaart, 2004). Respecto al catabolismo de ABA, se han aislado varios metabolitos de diversas especies vegetales. ABA puede ser metabolizado a través de dos vías principales: oxidación en diferentes posiciones y conjugación (Cutler y Krochko, 1999; Hirai, 1999; Xu *et al.*, 2002; Oritani y Kiyota, 2003). La preferencia por una u otra vía depende de la especie, el órgano particular, el estadio de desarrollo y de los procesos biológicos involucrados (Cutler y Krochko, 1999; Zeevaart, 1999; Oritani y Kiyota, 2003). En plantas, la vía oxidativa es predominante con respecto a la conjugación, y se inicia por hidroxilación en el C-8' para originar un intermediario inestable, 8'-hidroxi-ABA (8'-OH-ABA), el cual espontáneamente se isomeriza a ácido faseico (PA) (Cutler y Krochko, 1999; Todoroki *et al.*, 2000). Este compuesto posteriormente es reducido a ácido dihidrofaseico (DPA) y/o su epímero, ácido *epi*-dihidrofaseico (*epi*-DPA) (Zeevaart y Milborrow, 1976; Zeevaart y Creelman, 1988; Zeevaart *et al.*, 1991).

El ABA y sus productos oxidados pueden ser conjugados como ésteres, particularmente como glucosil ésteres (ABA-GE) o bien como glucósidos (Zeevaart, 1999; Oritani y Kiyota, 2003). El ABA-GE es uno de los metabolitos conjugados mayoritarios y probablemente desempeñaría un rol en el transporte de ABA (Sauter *et al.*, 2002). La abundancia de este compuesto es menor comparada con la de ABA y podría constituir una reacción de inactivación reversible utilizada para regenerar ABA libre. En algunos tejidos, la formación de glucosil-conjugados es la principal vía de inactivación de ABA (Zeevaart, 1999). En general, estos metabolitos se almacenan en la vacuola donde no están expuestos a hidrólisis.

Los niveles endógenos de ABA en los tejidos vegetales resultan entonces, de la combinación de procesos de biosíntesis, catabolismo o transporte (Fig.1).



Biosíntesis de ABA y metabolitos (Adaptado de Seki *et al.*, 2007 en Current Opinion in Plant Biology)

## Funciones

El ABA interviene en numerosos procesos celulares y regula diversas etapas del desarrollo de la planta, como maduración de la semilla, síntesis de proteínas y lípidos de reserva (Seo y Koshiha, 2002; Xiong y Zhu, 2003), promoción de la tolerancia a desecación de semillas y tejidos vegetativos (McCourt, 2001; Finkelstein *et al.*, 2002), inducción y mantenimiento de la dormición (Karszen *et al.*, 1983; Rock y Quatrano, 1995; Koornneef *et al.*, 2002; Kushiro *et al.*, 2004; Okasabe *et al.*, 2005), inhibición de la fase de transición embrionaria a crecimiento germinativo, y de crecimiento vegetativo a crecimiento reproductivo (Leung y Giraudat, 1998; Rock, 2000; Rohde *et al.*, 2000), polinización (Kovaleva y Zakharova, 2003) y senescencia (Hunter *et al.*, 2004). En el proceso de germinación de la semilla, ABA inhibe la imbibición inicial (dos primeras fases del proceso germinativo) necesaria para el comienzo del crecimiento embrionario, como así también impide la transición hacia la fase de crecimiento de la plántula, posterior a la emergencia de la radícula (López-Molina *et al.*, 2001).

En el crecimiento de las plantas ABA tiene una función compleja y dual, actuando como inhibidor o promotor del crecimiento, en presencia o ausencia de estrés, respectivamente (Cheng *et al.*, 2002; Finkelstein *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006).

Su función como inhibidor del crecimiento se observa cuando es acumulado en grandes cantidades bajo condiciones de estrés, ayudando a la planta a sobrevivir en estas condiciones mediante la inhibición de procesos tales como: apertura estomática y crecimiento del tallo (Gowing *et al.*, 1993; Zhang y Davies, 1990; Zhang *et al.*, 2006). Por otro lado, su función como promotor del crecimiento se manifiesta en condiciones de crecimiento “normales” cuando sus niveles endógenos son bajos. En estas situaciones se ha observado que es esencial para el crecimiento de varios órganos, por ej: crecimiento de raíz primaria (Sharp *et al.*, 2000; Spollen *et al.*, 2000) y desarrollo post- germinativo de la plántula (Cheng *et al.*, 2002).

Del mismo modo, ABA desempeña un rol primordial en la adaptación de las plantas a condiciones adversas tales como salinidad, sequía, bajas temperaturas y estrés osmótico (Leung y Giraudat, 1998; Zhu, 2002; Xiong y Zhu, 2003); además afecta la tolerancia de la planta a estrés por calor (Robertson *et al.*, 1994) y por patógenos (Mohr y Cahill, 2003).

Aumentos en los niveles endógenos de ABA han sido observados en diferentes especies, bajo diferentes condiciones ambientales que causan estrés hídrico (Chen *et al.*, 2002; Perales *et al.*, 2005). El rol que juega ABA en la tolerancia a sequía ha sido confirmado por Andrade *et al.* (2009) quienes observaron acumulación de ABA en semillas secas de girasol de las líneas B71 (tolerante a estrés hídrico) y B59 (sensible a estrés hídrico) provenientes de plantas crecidas en condiciones de sequía.

## **Efecto del ambiente en que creció la planta madre: Su incidencia en características de la progenie.**

Perturbaciones del ambiente externo pueden modificar el desarrollo de la progenie en algunas especies. El estrés hídrico durante la formación del grano modifican las propiedades de germinación y contenido hormonal de semillas de la progenie en sorgo (Benech Arnold *et al.*, 1991; Amzallag *et al.*, 1998). Por otro lado, condiciones ambientales como: temperatura, lluvia y humedad durante el desarrollo del grano de cebada afectaron la expresión de los genes de la biosíntesis (HNCED1) y catabolismo (*HvCYP707A1*) de ABA; lo cual resultó en diferencias en el contenido endógeno de ABA en el grano (Chono *et al.*, 2006).

Estudios realizados en semillas de girasol de las líneas B71 y B59 mostraron que en aquellas semillas provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de sequía los niveles endógenos de Jasmonatos fueron menores respecto de aquellas crecidas bajo condiciones de riego (Vigliocco *et al.*, 2007). Del mismo modo, el pericarpo de semillas secas provenientes de plantas madres crecidas en sequía presentó mayor contenido de ABA (Andrade *et al.*, 2009).

## **HIPÓTESIS**

1. El nivel endógeno de ácido abscísico es cuantitativamente diferente en plántulas de girasol provenientes de semillas obtenidas de plantas crecidas en condiciones de riego y sequía, con diferente sensibilidad a estrés hídrico. El nivel de ABA incide en el crecimiento temprano de las plántulas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar los niveles basales de ácido abscísico en plántulas de girasol de las líneas B59 (sensible a estrés hídrico) y B71 (tolerante a estrés hídrico) provenientes de semillas obtenidas de plantas madres crecidas en condiciones de riego y sequía correlacionándolos con la sensibilidad a estrés hídrico y las variables energía germinativa (EG), poder germinativo (PG), peso fresco (PF) y peso seco (PS).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar los niveles basales de ácido abscísico en plántulas de girasol de las líneas B59 (sensible a estrés hídrico) y B71 (tolerante a estrés hídrico) provenientes de semillas obtenidas de plantas madres crecidas en condiciones de riego y sequía.

2. Comparar el crecimiento temprano de las plántulas en relación a los niveles hormonales endógenos.

## MATERIALES, TÉCNICAS Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en la cátedra de Fisiología Vegetal en la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba. Argentina.

### Material Vegetal

Semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) de las líneas B59 (sensible a estrés hídrico) y B71 (tolerante a estrés hídrico) provenientes de plantas madres desarrolladas bajo condiciones de riego y sequía, se utilizaron para la realización de los ensayos programados, las cuales fueron provistas por EEA-INTA Manfredi. Los tratamientos de riego y sequía se aplicaron a plantas madres que alcanzaron el estado fenológico V4. Para el tratamiento de sequía, el suelo fue cubierto con polipropileno hasta el momento de la cosecha, mientras que en el tratamiento de riego las plantas fueron regadas cada vez que la capacidad de campo alcanzó un 60% hasta llegar al 100%.

### Condiciones de crecimiento de las plántulas

Los tratamientos llevados a cabo en esta experiencia fueron cuatro:

- A) Plántulas de la línea B71 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de riego.
- B) Plántulas de la línea B71 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de sequía.
- C) Plántulas de la línea B59 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de riego.
- D) Plántulas de la línea B59 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de sequía.

Cada tratamiento fue realizado por triplicado. Cincuenta semillas por repetición, se colocaron en bandejas de plástico sobre arena en una cámara de crecimiento, programada con 8 hs de oscuridad a 19°C y 60% HR y 16 hs con luz a 29°C y 65% HR. El contenido hídrico del sustrato al momento de la siembra fue del 60% de la capacidad de campo (C.C); realizándose posteriores riegos a capacidad de campo a los 4, 7 y 10 días de la siembra, utilizando el método de ascenso capilar de la solución al sustrato. Las plántulas fueron cosechadas a los 11 días de la siembra, se congelaron en N<sub>2</sub> y se conservaron a -80 °C.

## **Variables evaluadas**

Las variables que se evaluaron fueron: energía germinativa (EG), poder germinativo (PG), peso fresco (PF), peso seco (PS), y niveles endógenos de ácido abscísico (ABA).

## **Evaluación de energía y poder germinativo**

La energía germinativa se determinó a los 4 días de postsiembra, mientras que el poder germinativo se midió a los 11 días. Se consideraron germinadas las plántulas que alcanzaron por lo menos 0,5 cm longitud.

## **Determinación de peso fresco y peso seco**

El peso fresco (PF) y peso seco (PS) se determinó mediante una balanza analítica. Para la determinación del peso seco las plántulas fueron liofilizadas previamente a fin de llevarlas a sequedad.

## **Extracción y cuantificación de ácido abscísico**

La extracción y purificación de ABA se llevó a cabo según protocolo modificado de Durgbanshi *et al.* (2005). 200 mg de peso seco de material vegetal se homogeneizó con N<sub>2</sub> líquido y 5 ml de agua deionizada como solvente de extracción. Como estándar interno se agregó 100 ng de [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ABA. Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 5000 rpm. Se recogió el sobrenadante ajustándose el pH a 2,8 con ácido acético 15%. Posteriormente se realizaron dos particiones con éter etílico, recolectándose las fases orgánicas las que se llevaron a sequedad. Los extractos secos se resuspendieron en 1 ml de metanol, se filtraron a través de un filtro de jeringa (velocidad de flujo menor a 1ml/minuto) y finalmente se secaron bajo vacío en SpeedVac.

Los extractos secos conteniendo ABA se resuspendieron con 100 µl de MeOH para la purificación y análisis mediante un cromatógrafo Alliance 2695 (Waters, Inc., California, USA) equipado con una bomba cuaternaria con auto inyector de muestra. Se utilizó una columna Resteck C<sub>18</sub> (Resteck USA, 2.1 x 100 mm, 5 µm) a 25° C, con un volumen de inyección de 10 µl. La elución se llevó a cabo en gradiente con un sistema de solvente binario: 0.2% HOAc en H<sub>2</sub>O (solvente B)/ MeOH (solvente A) a una velocidad de flujo de 200 µl min<sup>-1</sup>, procediendo con las siguientes proporciones (v/v) de solvente A: (t (minuto),

%A) :(0, 40), (25, 80). Al final de cada corrida se establecieron 7 minutos de equilibración del sistema y columna. La identificación y cuantificación de ABA se realizó mediante un espectrómetro de masa de doble cuadrupolo (Micromass Quatro Ultima<sup>tm</sup> PT, Manchester City, UK). Todos los análisis se realizaron utilizando la fuente de electrospray en modo de ionización negativo. La cuantificación se llevó a cabo por inyección de las muestras en modo Reacciones de monitoreo múltiple (MRM). La adquisición de datos por MRM se realizó por monitoreo de iones parentales y transiciones para ABA y <sup>2</sup>D<sub>6</sub>-ABA (estándar interno) respectivamente.

### **Análisis estadístico**

Las experiencias se realizaron utilizando un diseño totalmente aleatorizado con 3 repeticiones. Las diferencias significativas entre medias de las variables evaluadas en semilla (EG y PG) y plántulas (ABA endógeno, PF y PS) de las líneas B59 y B71 provenientes de plantas madres crecidas bajo condiciones de riego y sequía se realizaron mediante el uso de Análisis de la Varianza de una vía (ANOVA), utilizando a posteriori un test de Rangos Múltiples (LSD de Fisher) ( $p \leq 0.05$ ).

El coeficiente de correlación lineal de Pearson se usó para establecer el grado de asociación entre: niveles endógenos de ABA de las plántulas/energía germinativa, niveles endógenos de ABA de las plántulas/poder germinativo, niveles endógenos de ABA/peso fresco de las plántulas, niveles endógenos de ABA/peso seco de las plántulas. El software utilizado fue Statgraphics Plus, versión 3, Manugistics 1997.

## RESULTADOS

### Niveles endógenos de ABA

Ácido abscísico (ABA) fue detectado en plántulas de las líneas B71 y B59 provenientes de semillas obtenidas a partir de plantas crecidas bajo condiciones de riego y sequía.

Las líneas analizadas no mostraron diferencias significativas en los niveles endógenos de ABA ( $p < 0.05$ ) (Tabla 1). Sin embargo, las plántulas de la línea B71 provenientes de semillas obtenidas de plantas crecidas bajo condiciones de sequía presentaron 1.5 veces más ABA que las obtenidas a partir de plantas crecidas en riego. Por otro lado, en la línea B59, las plántulas provenientes de semillas desarrolladas a partir de plantas crecidas en sequía mostraron un aumento de tres veces respecto de las plántulas provenientes de semillas crecidas bajo riego (Fig. 2).

VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	p
ENTRE LAS LÍNEAS	7,8309E6	3	2,66	0,1193
DENTRO DE CADA LÍNEA	7,84545E6	8		
TOTAL	1,56764E7	11		

Tabla 1. Análisis de la varianza (ANOVA) de los niveles endógenos de ABA en plántulas de girasol de las líneas B71 y B59 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de riego y sequía ( $p < 0.05$ ).

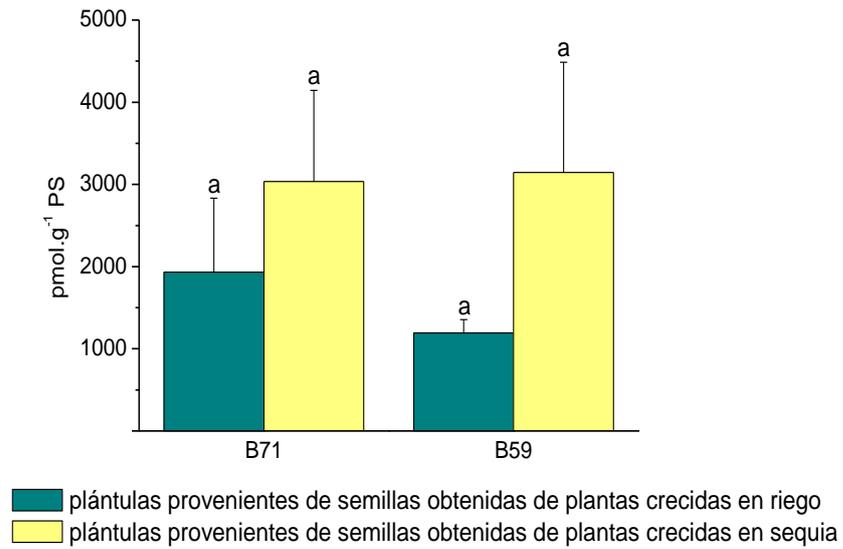


Fig. 2. Niveles endógenos de ABA (pmol.g<sup>-1</sup> PS) en plántulas de girasol de las líneas B71 y B59 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de riego y sequía (n=3 ± SE) p< 0.05

### Evaluación de energía y poder germinativo

La energía germinativa no mostró diferencias significativas entre las líneas B71 y B59 (p<0.05) (Tabla 2). Las semillas provenientes de plantas desarrolladas bajo condiciones de riego mostraron una disminución similar en la energía germinativa respecto de las semillas obtenidas bajo condiciones de sequía (Fig. 3).

VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	p
ENTRE LAS LÍNEAS	39,645	3	2,05	0,1605
DENTRO DE CADA LÍNEA	77,335	12		
TOTAL	116,98	15		

Tabla 2. Análisis de la varianza (ANOVA) de energía germinativa de semillas de girasol de las líneas B71 y B59 ( $p < 0.05$ ).

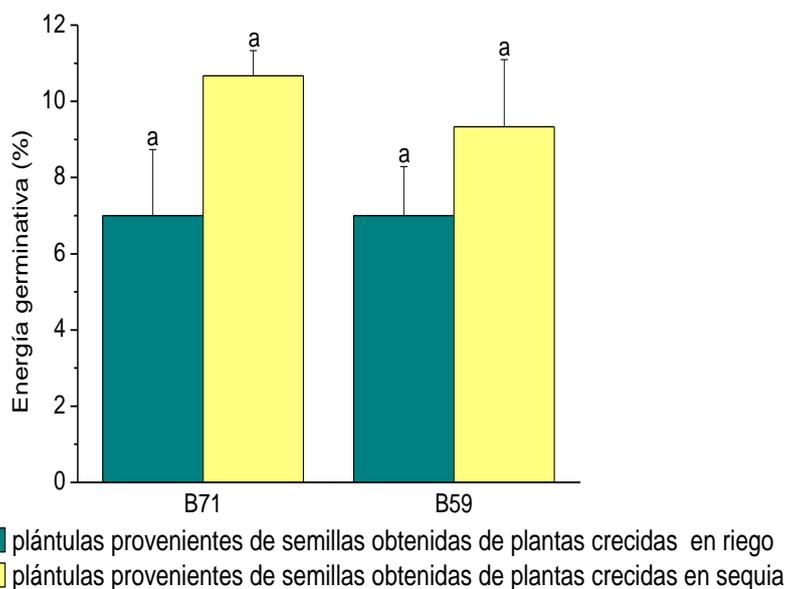


Fig. 3. Energía germinativa de semillas de girasol de las líneas B71 y B59 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de riego y sequía ( $n=3 \pm SE$ )  $p < 0.05$

El análisis del poder germinativo mostró diferencias significativas entre semillas de las líneas B71 y B59 ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3). Las semillas de la línea B71 mostraron mayor poder germinativo respecto de la línea B59. No se observaron diferencias significativas en el poder germinativo entre semillas de la línea B71 originadas de plantas crecidas bajo ambas condiciones hídricas del suelo. El poder germinativo de las semillas de la línea B59 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de sequía fue significativamente más alto respecto de aquellas obtenidas a partir de plantas desarrolladas bajo riego ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4).

VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	p
ENTRE LAS LÍNEAS	1125,19	3	17,74	0,0001
DENTRO DE CADA LÍNEA	253,668	12		
TOTAL	1378,76	15		

Tabla 3. Análisis de la varianza (ANOVA) del poder germinativo de semillas de girasol de las líneas B71 y B59 ( $p < 0.05$ ).

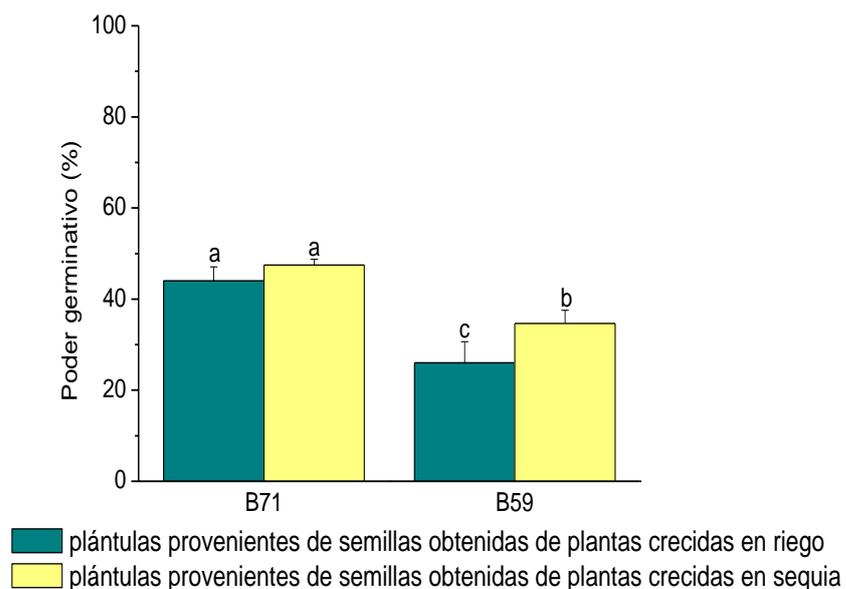


Fig. 4. Poder germinativo de semillas de girasol de las líneas B71 y B59 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de riego y sequía (n=3 ± SE) p< 0.05

#### Evaluación de peso fresco y peso seco de las plántulas

El peso fresco y peso seco de plántulas de las líneas B71 y B59 no mostraron diferencias significativas (p<0.05) (Tabla 4 y 5). (Figs. 5 y 6).

VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	p
ENTRE LAS LÍNEAS	0,006875	3	0,48	0,7033
DENTRO DE CADA LÍNEA	0,0575	12		
TOTAL	0,064375	15		

Tabla 4. Análisis de la varianza (ANOVA) de peso fresco de plántulas de girasol de las líneas B71 y B59 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de riego y sequía (p<0.05).

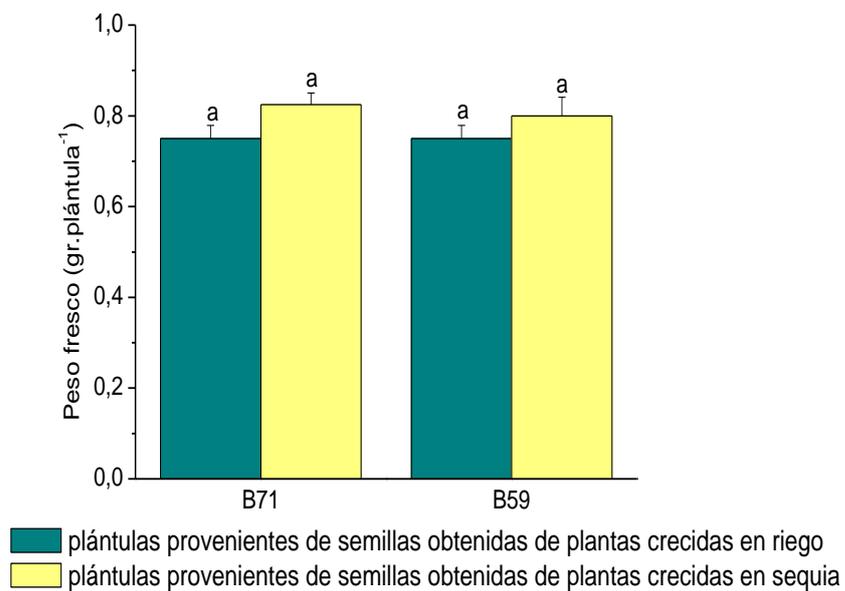


Fig. 5. Peso fresco por plántula de girasol de las líneas B71 y B59 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de riego y sequía ( $n=3 \pm SE$ )  $p < 0.05$

VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	p
ENTRE LAS LÍNEAS	0,00016875	3	0,37	0,7762
DENTRO DE CADA LÍNEA	0,001825	12		
TOTAL	0,00199375	15		

Tabla 5. Análisis de la varianza (ANOVA) de peso seco de plántulas de girasol de las líneas B71 y B59 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de riego y sequía ( $p < 0.05$ ).

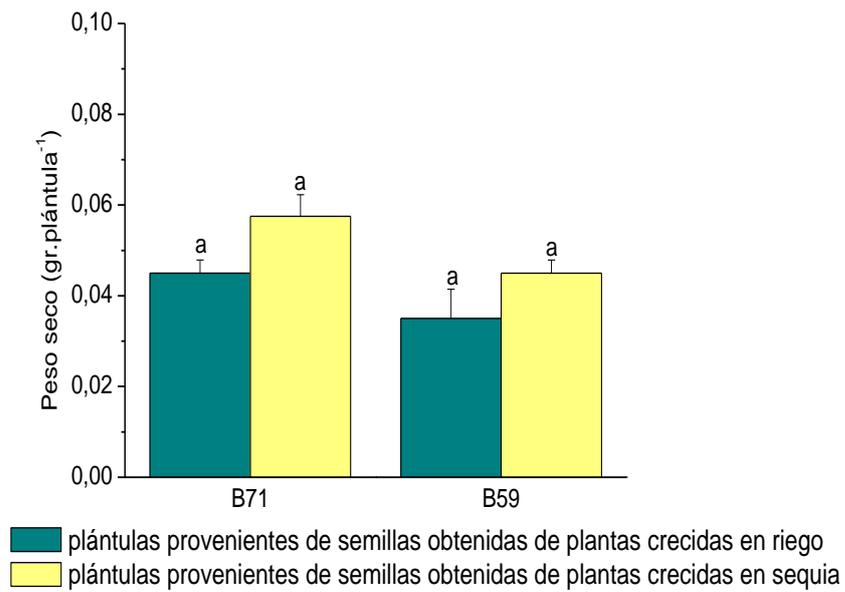


Fig. 6. Peso seco por plántula de girasol de las líneas B71 y B59 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de riego y sequía (n=3 ± SE) p< 0.05

Una correlación positiva fue hallada entre peso seco y energía germinativa (r: 0,43, p<0.10) (Tabla 6).

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	p
REGRESIÓN	0,000373406	1	3,23	0,0941
RESIDUO	0,00162034	14		
TOTAL	0,00199375	15		

Tabla 6. Análisis de la varianza (ANOVA) para el coeficiente de correlación de entre energía germinativa y peso seco de plántulas de girasol de las líneas B71 y B59 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de riego y sequía (p<0.10).

r<sup>2</sup>: 0,18728

## DISCUSIÓN

La sequía es uno de los factores que en mayor grado limita la productividad de los cultivos en el mundo (Bohnert *et al.*, 1995; Boyer, 1982). La producción de girasol se está expandiendo a regiones áridas del mundo por lo que se ve afectada, tanto por la escasez de precipitaciones como así también por el uso de agua contaminada con sal para riego. La tolerancia de las plantas a factores de estrés hídrico está genéticamente determinada, con la participación de una amplia gama de procesos, los cuales se combinan tanto espacialmente como temporalmente (Yokota *et al.*, 2006).

El ácido abscísico juega un rol importante en la respuesta adaptativa de las plantas a sequía (Mahajan and Tuteja, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Asimismo, está involucrado en numerosos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas tales como: maduración y dormición de semillas, inhibición y/o promotor del crecimiento, apertura estomática (Zeevaart y Creelman, 1988; Finkelstein *et al.*, 2002; Raz *et al.*, 2001; Rohde *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2006).

La comparación entre cultivares tolerantes y sensibles a estrés ha mostrado mayores niveles de ABA en cultivares tolerantes. Sin embargo, se ha observado que el grado de tolerancia está en relación con la tasa de síntesis de ABA bajo condiciones de estrés (Perales *et al.*, 2005). En este sentido, los niveles de ABA tendieron a ser levemente superiores en plántulas de la líneas B59 (sensible) y B71 (tolerante) provenientes de semillas obtenidas de plantas madres crecidas en estrés hídrico, lo cual confirmaría la implicancia de ABA en la respuesta a sequía. En concordancia con esto, semillas de la línea B71 y B59 provenientes de plantas crecidas bajo condición de sequía también mostraron mayores niveles endógenos de ABA que aquellas provenientes de riego (Andrade *et al.*, 2009). De hecho, trabajos que comparan cultivares sensibles y tolerantes de diferentes especies mostraron que la tolerancia a estrés de una determinada línea bajo condiciones no estresantes, está relacionada no sólo con el contenido de ABA sino más bien con diferencias en su tasa de síntesis y catabolismo bajo condiciones de estrés (Zheng y Li, 2000; Chen *et al.*, 2002; Perales *et al.*, 2005).

La función del ABA en el crecimiento de las plantas es complejo y dual, como inhibidor o promotor del crecimiento, en presencia o ausencia de estrés, respectivamente (Cheng *et al.*, 2002; Finkelstein *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006). En este sentido, en este trabajo, los parámetros de crecimiento evaluados en plántulas de girasol no se correlacionan con los niveles endógenos de ABA; por lo que se podría sugerir que su acción sobre el crecimiento y desarrollo estaría en relación con las condiciones del medio ambiente en que las plántulas crezcan, como así también el estadio del desarrollo y el órgano analizado. De hecho, cambios en el contenido endógeno de ABA y las respuestas inducidas por el mismo han sido observadas en diferentes especies, estados del desarrollo o más aun en diferentes órganos y

tejidos de la misma especie (Finkelstein y Somerville, 1990; Finkelstein, 1994; Wang *et al.*, 2002; Hartung *et al.*, 2002).

Por otro lado, el hecho de que plántulas provenientes de semillas obtenidas de plantas madres crecidas en condiciones de sequía presentaron mayores niveles endógenos de ABA, estaría indicando que las condiciones ambientales en que la planta madre creció tiene influencia en las características de la progenie, como ha sido previamente reportado por Benech Arnold *et al.* (1991) y Amzallag *et al.* (1998). Estudios previos, han mostrado que semillas de girasol provenientes de plantas madres crecidas bajo condiciones de sequía acumulan mayores niveles de ABA y jasmonatos que semillas provenientes de plantas crecidas en riego (Vigliocco *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2009).

En el mismo sentido, el estrés hídrico impuesto a la planta madre modificó el poder germinativo de semillas de la línea B59; Benech Arnold *et al.* (1991) observaron en sorgo que la sequía sufrida por la planta durante la formación del grano modificó las propiedades germinativas de la progenie. Además, semillas de girasol de líneas endocriadas producidas en temperaturas frescas, germinaron más rápidamente que los de las mismas líneas producidas en condiciones más cálidas (Aguirrezábal *et al.*, 2001).

El análisis de los parámetros de germinación y crecimiento determinaron que el poder germinativo de las semillas de girasol es un indicador temprano que permite discriminar las líneas B59 y B71. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Bigo (2006) quien al caracterizar diferentes germoplasmas de girasol en condiciones de estrés hídrico observó que el recuento final de germinación en forma relativa al control permitió discriminar germoplasmas tolerantes a sequía en el estadio de plántula. En concordancia con este trabajo, las plantas de la línea B71 (tolerante) obtenidas a partir de semillas de plantas crecidas en sequía, presentaron un mayor porcentaje final de germinación que las plantas de la línea B59 (sensible). Las diferencias observadas en el poder germinativo entre las líneas sensible y tolerante indicarían diferencias en el establecimiento de las plantas de girasol y por lo tanto en su rendimiento (Bigo 2006). Asimismo, semillas de la línea B71, presentan una tendencia a ser mayores en energía germinativa lo que se correlacionaría con una mayor tasa de crecimiento de las plántulas expresada como peso seco e indicaría que la velocidad de germinación permite un mejor establecimiento del cultivo y por consiguiente mejor desarrollo de las plántulas. Lo mencionado se reflejaría en mayor producción de biomasa.

## CONCLUSIONES

- En el cultivo de girasol, el ABA podría estar implicado en la tolerancia a sequía, ya que sus niveles endógenos tendieron a ser levemente mayores en plántulas de las líneas B71 y B59 provenientes de plantas madres crecidas en condiciones de sequía.
- Las condiciones ambientales en que creció la planta madre, modifican los niveles endógenos de ABA en plántulas y el poder germinativo de las semillas de la progenie.
- El análisis de los parámetros de germinación (energía y poder germinativo) y crecimiento (peso fresco y seco) determinaron que el poder germinativo de las semillas de girasol es un indicador temprano que permite discriminar las líneas B71 (tolerante a estrés hídrico) y B59 (sensible a estrés hídrico).

## BIBLIOGRAFÍA

- ANDREANI, P. 2004 Mercado de Girasol **En: El cultivo de Girasol en Siembra Directa**. Ed. Gustavo Duarte, B. Aires, pp. 16-26.
- AGUIRREZÁBAL, L.A.N., G.A. ORIOLI, L.F. HERNÁNDEZ, V.R. PEREYRA y J.P. MIRAVE 2001 **Girasol. Aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento**. Ed. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Argentina.
- AMZALLAG, G.N., A. NACHMIAS y H.R., LERNER 1998 Influence of the mode of salinization on reproductive traits of field-grown progeny in *Sorghum bicolor*. **Isr. J. Plant Sci.** 46: 9-16.
- ANDRADE, A., A. VIGLIOCCO, S. ALEMANO, D. ALVAREZ y G. ABDALA 2009 Environmental conditions during sunflower mother plants growth modified abscisic acid and metabolites profile in seeds progeny. Enviado a Seed Sci. Res.
- BENECH ARNOLD, R.L., M. FENNER y P.J. EDWARDS 1991 Changes in germinability, ABA content and ABA embryonic sensitivity in developing seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. induced by water stress during grain filling. **New Phytol.** 118: 339-347.
- BIGO, V.N. 2006 **Caracterización de germoplasma de girasol (*Helianthus annuus* L.), en condiciones de estrés hídrico**. Tesis. Fac. de Ciencias Exactas, Físico-Química y Naturales, Univ. Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.
- BOHNERT, H.J., D.E. NELSON y R.G. JENSEN 1995 Adaptations to Environmental Stresses. **Plant Cell** 7: 1099-1111.
- BOYER, J.S. 1982 Plant productivity and environmental. **Science** 218: 443-448.
- CHAVES, M.M., J.P. MAROCO y J.S. PEREIRA 2003 Understanding plant response s to drought-from genes to the whole plant. **Funt. Plant Biol.** 30: 239-264.
- CHEN, S., J. LI, T. WANG, A. POLLE y A. HÜTTERMANN 2002 Osmotic stress and ion-specific affects on xylem abscisic acid and the relevance to salinity tolerance in poplar. **J. Plant Growth Regul.** 21: 224-233.
- CHENG, W.-H., A. ENDO, L. ZHOU, J. PENNY, H.-C. CHEN, A. ARROYO, P. LEON, E. NAMBARA, T. ASAMI, M. SEO, T. KOSHIBA y J. SHEEN 2002 A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis glucose* signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. **Plant Cell** 14: 2723-2743.
- CHIMENTI, C.A., A.J. HALL y M.S. LOPEZ 2001 Embryo-growth rate and duration in sunflower as affected by temperature. **Field Crops Res.** 69: 81-88.
- CHONO, M., I. HONDA, S. SHINODA, T. KUSHIRO, Y. KAMIYA, E. NAMBARA, N. KAWAKAMI, S. KANEKO y Y. WATANABE 2006 Fields studies on the regulation of abscisic acid content and germinability during grain development of barley: molecular and chemical analysis of pre-harvest sprouting. **J. Exp. Bot.** 57: 2421-2434.

- CONNOR, D.J. y A.J. HALL 1997 **Sunflower Technology and Production**. Agronomy Monograph N° 35. American Society of Agronomy, Science Society of America, pp. 113-181.
- CUTLER, A.J. y J.E. KROCHKO 1999 Formation and breakdown of ABA. **Trends Plant Sci.** 4: 472-478.
- DURGBANSHI, A., V. ARBONA, O. POZO, O. MIERSCH, J.V. SANCHO y A. GÓMEZ CADENAS 2005 Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.** 53: 8437-8442.
- DVORAK, J. y K. ROSS 1986 Expression of tolerance of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>+</sup> and SO<sub>4</sub><sup>+2</sup> ions and sea water in the amphiploid of *Triticum aestivum* x *Elytrigia pónica*. **Crop Sci.** 26: 658-660.
- FICK, G.N. y J.F. MILLER 1997 **Sunflower Technology and Production**. Ed. A.A. Schneiter. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wis. pp. 395-439.
- FINKELSTEIN, R. y C.R. SOMERVILLE 1990 Three classes of abscisic acid (ABA)-insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of ABA responses. **Plant Physiol.** 94: 1172-1179.
- FINKELSTEIN, R., S. GAMPALA y C. ROCK 2002 Abscisic acid signalling in seeds and seedlings. **Plant Cell** 14: S15-S45.
- FINKELSTIEN, R. 1994 Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. **Plant J.** 5: 765-771.
- GOWING, D.J.G., H.G. JONES y W.J. DAVIES 1993 Xylem-transported abscisic acid: the relative importance of its mass and its concentration in the control of stomatal aperture. **Plant Cell Environ.** 16: 453-459.
- HARTUNG, W., A. SAUTER y E. HOSE 2002 Abscisic acid in xylem: where does it come from, where does it go? **J. Exp. Bot.** 53: 27-33.
- HIRAI, N. 1999 **Comprehensive Natural Product Chemistry**. Eds. Barton D., Nakanishi K., Meth-Cohn O. Pergamon, Oxford, pp. 2-91.
- HUNTER, D.A., A. FERRANTE, P. VERNIERI y M.S. REID 2004 Role of abscisic acid in perianth senescence of daffodil (*Narcissus pseudonarcissus* "Dutch Master"). **Physiol. Plant.** 121: 313-321.
- KARSSSEN, C., D. BRINKHORST-VAN DER SWAN, A. BREEKLAND y M. KOORNNEEF 1983 Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: Studies of abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Planta** 157: 158-165.

- KOORNNEEF, M., L. BENTSINK y H. HILHORST 2002 Seed dormancy and germination. **Curr. Opin. Plant Biol.** 5: 33-36.
- KOVALEVA, L.V. y E.V. ZAKHAROVA 2003 Hormonal status of the pollen-pistil system at the programic phase of fertilization after compatible and incompatible pollination in *Petunia hybrida* (L.). **Sex Plant Reprod.** 16: 191-196.
- KUSHIRO, T., M. OKAMOTO, K. NAKABAYASHI, K. YAMAGISHI, S. KIMATURA, T. ASAMI, N. HIRAI, T. KOSHIBA, Y. KAMIYA y E. NAMBARA 2004 The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. **Embo J.** 23: 1647-1656.
- LEUNG, J. y J. GIRAUDAT 1998 Absciscic acid signal transduction. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 49: 199-222.
- LÓPEZ-MOLINA, L., S. MONGRAND y N.H. CHUA 2001 A post-germination developmental arrest checkpoint is mediated by absciscic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 98: 4782-4787.
- LOPEZ PEREIRA, M. y L. TRAPANI 2004 Importancia e identificación de factores abióticos que limitan el rendimiento y la calidad del Girasol. **En: El cultivo de Girasol en Siembra Directa.** Ed. Gustavo Duarte, B. Aires, Argentina, pp. 41-53.
- MAHAJAN, S. y N. TUTEJA 2005 Cold, salinity and drought stresses: An Overview. **Arch. Biochem. Biophys.** 444: 139-158.
- MANIVANNAN, P., C. ABDUL JALEEL, B. SANKAR, A. KISHOREKUMAR, R. SOMASUNDARAM, G.M.A. LASSHMANAN y R. PANNEERSELVAM 2007 Growth, biochemical modification and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. **Colloids Surf. B: Biointerf.** 59: 141-149.
- MCCOURT, P. 2001 Plant hormone signalling: Getting the message out. **Mol. Cell** 8: 1157-1158.
- MOHR, P. y D. CAHILL 2003 Absciscic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. Tomato and *Peronospora parasitica*. **Funct. Plant Biol.** 30: 461-469.
- OKASABE, Y., K. MARUYAMA, M. SEKI, M. SATOU, K. SHINOZAKI y K. YAMAGUCHI-SHINOZAKI 2005 Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of Absciscic acid early signaling in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 17: 1105-1119.
- ORITANI, T. y H. KIYOTA 2003 Biosynthesis and metabolism of absciscic acid and related compounds. **Nat. Prod. Rep.** 20: 414-425.

- PEDRAZA, M.V., V.R. PEREYRA, L.A.N. AGUIRREZÁBAL y A. LAURLUND 2000. **Manual de estimación de pérdidas de rendimiento en girasol: Efectos de reducciones en el área foliar, en la densidad de plantas y en el número de capítulos.** Ed. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Argentina.
- PERALES, L., B. ARBONA, A. GÓMEZ-CADENAS, M.J. CORNEJO y A. SANZ 2005 A relationship between tolerance to dehydration of rice lines and ability for ABA synthesis under stress. **Plant Physiol. Biochem.** 43: 786-792.
- PUTNAM, D.H., E.S. OPLINGER, D.R. HICKS, B.R. DURGAN, D.M. NOETZEL, R.A. MERONUCK, J.D. DOLL y E.E. SCHULTE 1990 Sunflower. **Alternative Field Crops Manual.** En: [www.hort.purdue.edu/newcrop](http://www.hort.purdue.edu/newcrop). Consultado: 31-03-09.
- RAZ, V., J.H.W. BERGEVOET y M. KOORNNEEF 2001 Sequential steps for developmental arrest in Arabidopsis seeds. **Development** 128: 243-252.
- ROBERTSON, A.J., M. ISHIKAWA, L.V. GUSTA y S.L. MACKENZIE 1994 Abscisic acid-induced heat tolerance in *Bromus inermis* (L) cell-suspension cultures. Heat-stable, abscisic acid-responsive polypeptides in combination with sucrose confer enhanced thermostability. **Plant Physiol.** 105: 181-190.
- ROCK, C. 2000 Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. **New Phytol.** 148: 357-396.
- ROCK, C. y R. QUATRANO 1995 **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology.** Ed. Davies P.J. Kluwer, Norwell, Massachusetts, USA, pp. 671-697.
- ROHDE, A., S. KURUP y M. HOLDSWORTH 2000 *ABI3* emerges from the seeds. **Trends Plant Sci.** 5: 418-419.
- SAUTER, A., S.R. ABRAMS y W. HARTUNG 2002 Structural requirements of abscisic acid (ABA) and its impact on water flow during radial transport of ABA analogues through maize roots. **Plant Growth Regul.** 21: 50-59.
- SCHWARTZ, S.H. y J.A.D. ZEEVAART 2004 **Plant Hormones: biosynthesis, signal transduction, action.** Ed. Davies P.J. Cornell University, NY, USA, pp. 137-155.
- SEKI, M., T. UMEZAWA, K. URANO y K. SHINOZAKI 2007 Regulatory metabolic networks in drought stress responses. **Curr. Opin. Plant Biol.** 10: 296-302.
- SEO, M. y T. KOSHIBA 2002 Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. **Trends Plant Sci.** 7: 41-48.
- SHARP, R.P., M.E. LENOBLE, M.A. ELSE, E.T. THORNE y F. GHERARDI 2000 Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plants water balance: evidence for an interaction with ethylene. **J. Exp. Bot.** 51: 1575-1584.
- SPOLEN, W.G., M.E. LENOBLE, T.D. SAMMUELS, N. BERNSTEIN y R.E. SARP 2000 Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. **Plant Physiol.** 122: 967-976.

- TAYLOR, I.B., A. BURBIDGE y A.J. THOMPSON 2000 Control of Abscisic acid synthesis. **J. Exp. Bot.** 51: 1563-1574.
- TODOROKI, Y., N. HIRAI y H. OHIGASHI 2000 Analysis of isomerization process of 8'-hydroxyabscisic acid and its 3'-fluorinated analog in aqueous solutions. **Tetrahedron** 56: 1649-1653.
- TRAPANI, N. y M. LOPEZ PEREIRA 2004 Bases ecofisiológicas para El cultivo de Girasol. **En: El cultivo de Girasol en Siembra Directa.** Ed. Gustavo Duarte, B. Aires, Argentina, pp. 29-37.
- VÁZQUEZ, R.J.L. y J.D. PAOLONI 1991 Seguimiento de la disponibilidad hídrica para girasol utilizando subseries decádicas. **Reunión Nacional de Oleaginosos:** Rosario, Argentina, pp. 21-26.
- VIGLIOCCO, A., S. ALEMANO, O. MIERSCH, D. ALVAREZ y G. ABDALA 2007 Endogenous jasmonates during sunflower germination in seeds from plants grown under different soil moisture content. **Seed Sci. Res.** 17: 91-98.
- VILLALOVOS, F.J., V.O. SADRAS, A. SORIANO y E. FERERES 1994 Planting density effects on dry matter partitioning and productivity of sunflower genotypes. **Field Crops Res.** 36: 1-11
- WANG, Z., S. MAMBELLI y T.L. SETTER 2002 Abscisic acid catabolism in maize kernels in response to water deficit at early endosperm development. **Ann. Bot.** 90: 623-630.
- XIONG, L. y J.K. ZHU 2003 Regulation of abscisic acid biosynthesis. **Plant Physiol.** 133: 29-36.
- XU, Z.J., M. NAKAJIMA, Y. SUZUKI y I. YAMAGUCHI 2002 Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from Adzuki bean seedlings. **Plant Physiol.** 129: 1285-1295.
- YOKOTA, A., K. TAKAHARA y K. AKASHI 2006 Water stress. **En: Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants.** Eds. K. V. Madhava Rao, A.S. Raghavendra, K. Janardhan Reddy, Netherlands. pp. 15-40.
- ZEEVAART, J.A.D. 1999 **Biochemistry and molecular biology of plant hormones.** Eds. Hooykass P.J.J., Hall M.A., Libbenga K.R. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 189-207.
- ZEEVAART, J.A.D. y B.V. MILBORROW 1976 Metabolism of abscisic acid and the occurrence of epi-dihydrophaseic acid in *Phaseolus vulgaris*. **Phytochem.** 15: 493-500.
- ZEEVAART, J.A.D. y R.A. CREELMAN 1988 Metabolism and physiology of abscisic acid. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 39: 439-473.
- ZEEVAART, J.A.D., C.D. ROCK, F. FANTAUZZO, T.G. HEATH y D.A. GAGE 1991 **Abscisic acid: physiology and biochemistry.** Eds. Davies W.J., Jones H.G. BIOS Scientific, Oxford, pp. 39-52.

- ZHANG, J. y W.J. DAVIES 1990 Does ABA in the xylem control the rate of leaf growth in soil-dried maize and sunflower plants. **J. Exp. Bot.** 41: 1125-1132
- ZHANG, J., W. JIAN, J. YANG, y A. ISMAIL 2006 Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. **Field Crops Res.** 97: 111-119.
- ZHENG, Y.Z. y T. LI 2000 Changes in proline levels and abscisic acid content in tolerant/sensitive cultivars of soybean under osmotic conditions. **Soybean Genet. Newsl.** 27. En: [www.soygenetics.org](http://www.soygenetics.org). Consultado: 18-03-09.
- ZHU, J.K. 2002 Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.** 53: 247-273.