



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
“Trabajo Final presentado para optar al Grado de Ingeniero
Agrónomo”

**DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD EN
RESPUESTA A SEQUIA, EN GERMOPLASMA DE GIRASOL**
(Helianthus annuus L.)

ROMÁN CAMILO GALLO
DNI:31580326

Director: DR. ING.AGR. SERGIO ALEMANO
Co-director: MIC. CRISTIAN FERNÁNDEZ

Río Cuarto – Córdoba
Agosto/2010

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

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

**Determinación De La Variabilidad En Respuesta A Sequia, En
Germoplasma De Girasol (*Helianthus annus L.*)**

Autor: Román Camilo Gallo

DNI: 31580326

Director: Dr. Ing. Agr. Sergio Alemano

Co-Director: Mic Cristian Fernandez

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

Fecha de Presentación: _____/_____/_____

Aprobado por la Secretaría Académica: _____/_____/_____

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

A mi co-director Cristian Fernandez, por su permanente disponibilidad y ayuda en las tareas de laboratorio y redacción del trabajo final.

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

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

	Pág.
RESUMEN	VII
SUMMARY	VIII
INTRODUCCIÓN	9
- Origen e importancia del cultivo de Girasol.....	9
- Descripción del cultivo.....	18
- Las Fenofases del Girasol.....	19
- Hipótesis.....	22
- Objetivos generales.....	22
- Objetivos específicos.....	22
MATERIALES Y METODOS	24
- Material vegetal.....	24
- Condiciones de crecimiento de las líneas.....	24
- Evaluación del recuento final de germinación (RFG).....	24
- Evaluación de peso seco.....	25
- Análisis estadísticos.....	25
- Determinaciones de hormonas vegetales.....	25
- Método de extracción y purificación de (Durgbanshi <i>et al.</i> , 2005).....	25
- Identificación y cuantificación de hormonas vegetales.....	26
- Análisis estadístico.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
- Evaluación del recuento final de germinación.....	27
- Evaluación de peso seco.....	29
- Determinaciones de hormonas vegetales en familias F ₃	31
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
- Figura 1. Superficie implantada de girasol 1969-2008.....	9
- Figura 2 Producción de girasol en Argentina 1969-2008.....	10
- Figura 3 Producción nacional de aceite de girasol 1999-2009.....	11
- Figura 4 Distribución del cultivo de girasol en Argentina	12
- Figura N° 5 Biosíntesis de ABA y metabolitos.....	14
- Figura 6 Vía de síntesis y localización de JAs.....	16
- Figura 7 Vía de síntesis y localización de SA.....	18
- Figura 8 Fenofases del Girasol.....	20
- Figura 9 Familias F3 agrupadas por intervalos de porcentaje de germinación en relación al testigo (PGRT) vs. Numero de progenies F3 en cada categoría.....	28
- Figura 10 Familias F3 agrupadas por intervalos de porcentaje de germinación en relación al testigo (PGRT) vs. Numero de progenies F3 en cada categoría. N°33.....	28
- Figura 11 Determinación de PGRT (%) en familias F3 tolerantes y sensibles sometidas a estrés hídrico.....	29
- Figura 12 Progenie F3 agrupadas por intervalos de peso seco relativos al control (PSRT) vs. Número de progenies en cada intervalo.....	30
- Figura 13 Determinación de PSRT (%) en familias F3 tolerantes y sensibles sometidas a estrés hídrico.....	31
- Figura 14 Niveles endógenos de SA. (pmol. gr.-1 PS) en familias F3 tolerantes, controles y tratadas con manitol.....	32
- Figura 15 Niveles endógenos de SA. (pmol. gr.-1 PS) en familias F3 sensibles, controles y tratadas con manitol.....	32
- Figura 16 Niveles endógenos de ABA. (pmol. gr.-1 PS) en familias F3 tolerantes, controles y tratadas con manitol.....	33
- Figura 17 Niveles endógenos de ABA. (pmol. gr.-1 PS) en familias F3 sensibles, controles y tratadas con manitol.....	34
- Figura 18 Niveles endógenos de JA. (pmol. gr.-1 PS) en familias F3 tolerantes, controles y tratadas con manitol.....	35
- Figura 19 Niveles endógenos de JA. (pmol. gr.-1 PS) en familias F3 sensibles, controles y tratadas con manitol.....	35

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
- Cuadro 1 ANOVA individual de progenies F3 (R432 x A 59) de girasol para la variable porcentaje de germinación (Manitol 400 Mm) en relación al testigo no sometido a estrés hídrico (PGRT).....	27
- Cuadro 2 ANOVA individual de progenies F3 (R432 x A59) de girasol para la variable peso seco en plántulas sometidas a estrés hídrico en relación al testigo no sometido a estrés hídrico (PSRT).....	30

RESUMEN

La respuesta de las plantas a estrés abiótico incluye cambios morfológicos y metabólicos que se rigen por la expresión de grupos de genes involucrados en la tolerancia a tal estrés, la cual se encuentra intermediada por modificaciones en los niveles hormonales, principalmente de ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA). Plántulas de familias F_3 , provenientes del cruzamiento de líneas endocriadas tolerante (R432) y sensible (A59), fueron sometidas a estrés hídrico con 400 mM de manitol hasta los 11 días de edad y evaluadas para el carácter: poder germinativo (PG); peso seco (PS) y niveles hormonales. Se determinó el PG relativo al testigo (PGRT), PS relativo al testigo (PSRT) y ABA, JA y SA (por cromatografía líquida y doble espectrometría de masas), en las familias F_3 : 174; 199; 314; 310; 224; 290 y 148; 333; 336; 95; 300, tolerantes y sensibles a sequía respectivamente. Los datos de PGRT de las familias F_3 mostraron una segregación típica de una herencia cuantitativa del carácter tolerancia al estrés hídrico en el estadio fenológico de plántula. Los datos de PSRT de familias F_3 , muestran una distribución normal con desplazamiento hacia la derecha, que podría deberse al bajo número de familias F_3 analizadas hasta el momento para este carácter. Las concentraciones de ABA y SA en líneas tolerantes, presentaron en la mayoría de las mismas una tendencia a incrementarse bajo estrés hídrico, mientras que las líneas sensibles muestran un comportamiento contrastante, en JA se observó un comportamiento errático. Por todo ello, se concluye que los datos de PGRT validarían la metodología para detectar segregación en este carácter en condiciones de estrés hídrico para una población de familias F_3 , mientras que la respuesta hormonal indicaría que el comportamiento de las líneas contrastantes a sequía podría estar mediada por hormonas como ABA y SA.

Palabras clave: Germinación, Girasol, Fithormonas, Estrés hídrico.

SUMMARY

The response of plants to abiotic stress includes morphological and metabolic changes that are governed by the expression of groups of genes involved in tolerance to that stress, which is mediated by changes in hormone levels, specifically those related to acid stress abscisic (ABA), jasmonic (JA) and salicylic acid (SA). Based on that, F₃ families seedlings, from the crossing of inbred lines tolerant (R432) and sensitive (A59) were subjected to water stress using a solution of 400 mM mannitol until 11 days old and evaluated the F₃ families segregation for the character of: Percentage of germination (PG), dry weight and hormone levels. PG was determined related to the control (PGRT), dry weight related to the control (PSRT) and the phytohormones ABA, JA and SA (Liquid chromatography mass spectrometry and double) in F₃ families: 174, 199, 314, 310, 224, 290 and 148, 333, 336, 95, 300, tolerant and sensitive to drought, respectively. PGRT data from F₃ families showed a typical segregation of quantitative inheritance of tolerance to water stress status in the phenological stages of seedling. The concentrations of ABA and SA in tolerant lines, present in most of them a tendency to increase under water stress, while the sensitive lines show a contrasting behavior, in JA an erratic behavior was observed. Therefore, we conclude that PGRT data would validate the methodology to detect segregation in this character in water stress conditions for a population of F₃ families, while the hormonal response would indicate that the behavior of contrasting lines to drought could be mediated by hormones such as ABA and SA.

Key Words: Germination, Sunflower, Fithormons, Water stress.

INTRODUCCIÓN

Origen e importancia del Girasol

La palabra "girasol" viene del griego *helios*, que significa "sol", y de *anthos*, que significa "flor", moviéndose las flores hacia el sol. 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 XIX, comenzaron en Rusia las experiencias para obtener madurez en menor tiempo y más aceite en las semillas. 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 (Andreani, 2004).

En la última década del siglo pasado, debido a los altos precios internacionales, el crecimiento del complejo oleaginoso global encontró en el girasol argentino su mejor ejemplo. En la campaña 1994/95, se sembraron poco más de 3.000.000 de hectáreas (Has.) (Fig. N° 1), nivel que se sostuvo y aún trepó casi un 20% para la campaña 1997/98, antes del inédito registro de 4.200.000 de Has. del ciclo siguiente, que permitió obtener una producción superior a 7.000.000 de toneladas (Tn.) (Fig. N° 2). Argentina se convirtió así, en el primer exportador mundial de aceite de girasol, desarrollando una de las más competitivas industrias procesadoras de aceite (Andreani, 2004).

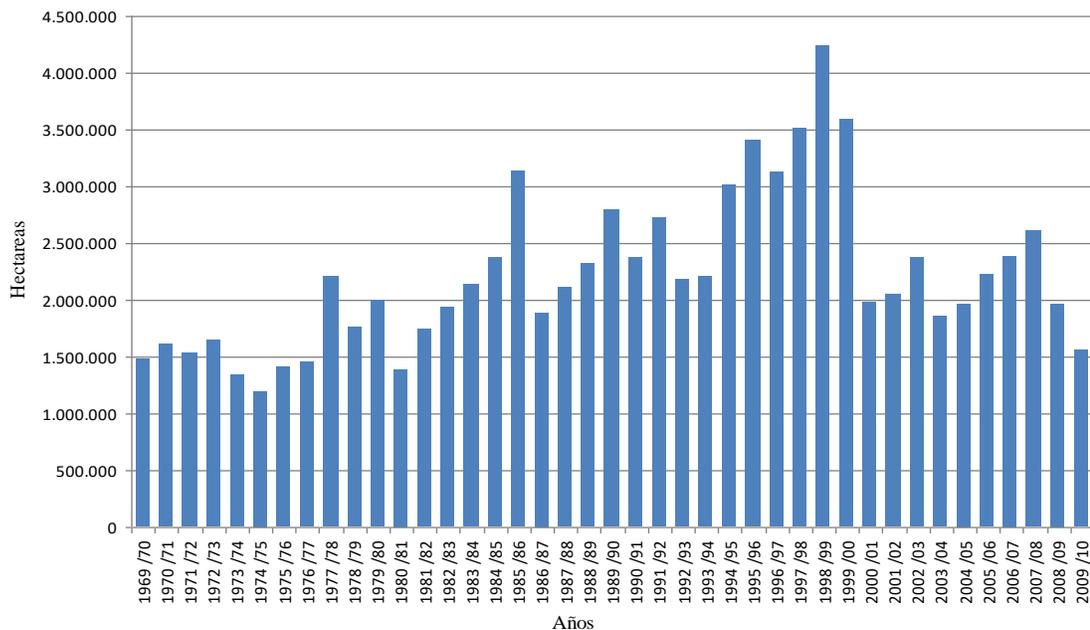


Figura 1. Superficie implantada de girasol 1969-2008 Fuente: (MAGyP, 2010)

En el mercado mundial de aceites, el de girasol es el cuarto en orden de importancia. Argentina se encuentra entre uno de los primeros exportadores mundiales de aceite y harina de girasol. En la campaña 2007/2008, nuestro país vendió 1,45 millones de toneladas (41,4% del total) de aceite (Fig. N° 3) y junto a Ucrania (33,4% del total) y la Federación Rusa (12% del total) suman el 87% de la oferta. Algo similar ha ocurrido en las ventas de harina de girasol, donde nuestro país con 1,33 millones de Tn., ha aportado el 37,7% del mercado mundial, Ucrania el 33,5% y la Federación Rusa el 18% (ASAGIR, 2008). En la campaña 2008/2009 Argentina tuvo una superficie sembrada de 1.967.420 Has. (Fig. N° 1) de las cuales se cosecharon 1.820.030 de Has., con una producción total de 2.483.437 Tn., lo que equivale a un rendimiento de 1.365 Kg por Ha. La última campaña de girasol 2009/2010 dejó como balance una superficie implantada de 1.550.000 Has., con una producción final, que se estima rondaría una cifra cercana a las 2.250.000 Tn. (Fig. N° 1 y 2) (MINAGRI, 2010).

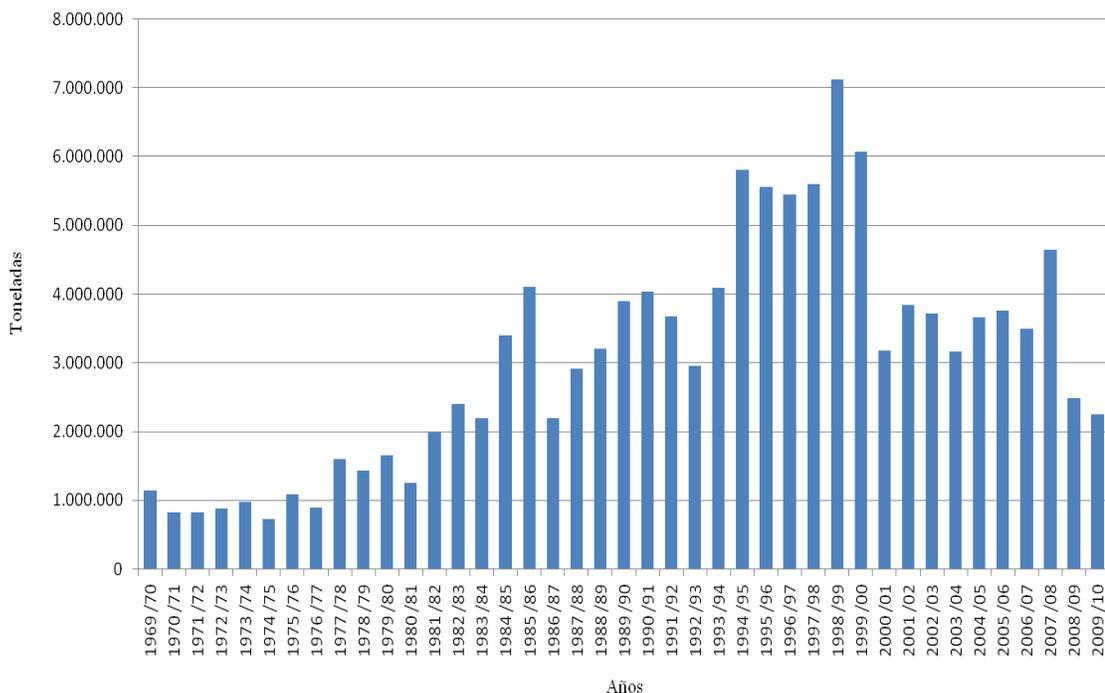


Figura 2. Producción de girasol en Argentina 1969-2008 Fuente: (MINAGRI, 2010).

La reducción en la superficie de implantación de girasol se asociaría con su reemplazo por la soja en zonas tradicionales y de altos potenciales de rinde (Fig. N° 1), como el desplazamiento de dicho cultivo a áreas de marginales (Andreani, 2004) exponiéndolo a suelos más pobres y a etapas de estrés hídrico durante el ciclo del cultivo, la cual implica una disminución en la producción de esta oleaginosa (Fig. N° 2).

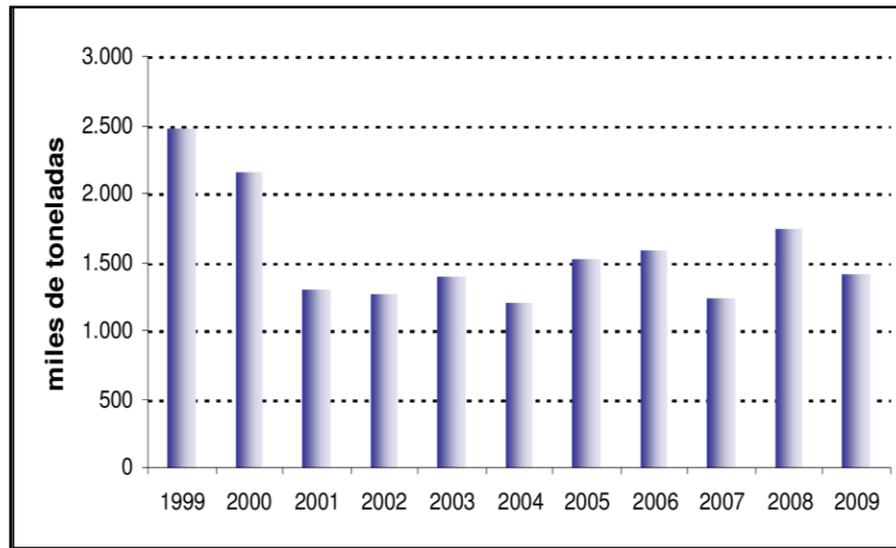


Figura 3. Producción nacional de aceite de girasol 1999-2009 Fuente: (MINAGRI, 2010).

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 vasto 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.

En Argentina, el área de cultivo de girasol se extiende desde el norte del Chaco hasta el sur de La Pampa (Fig. N° 4). 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 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).

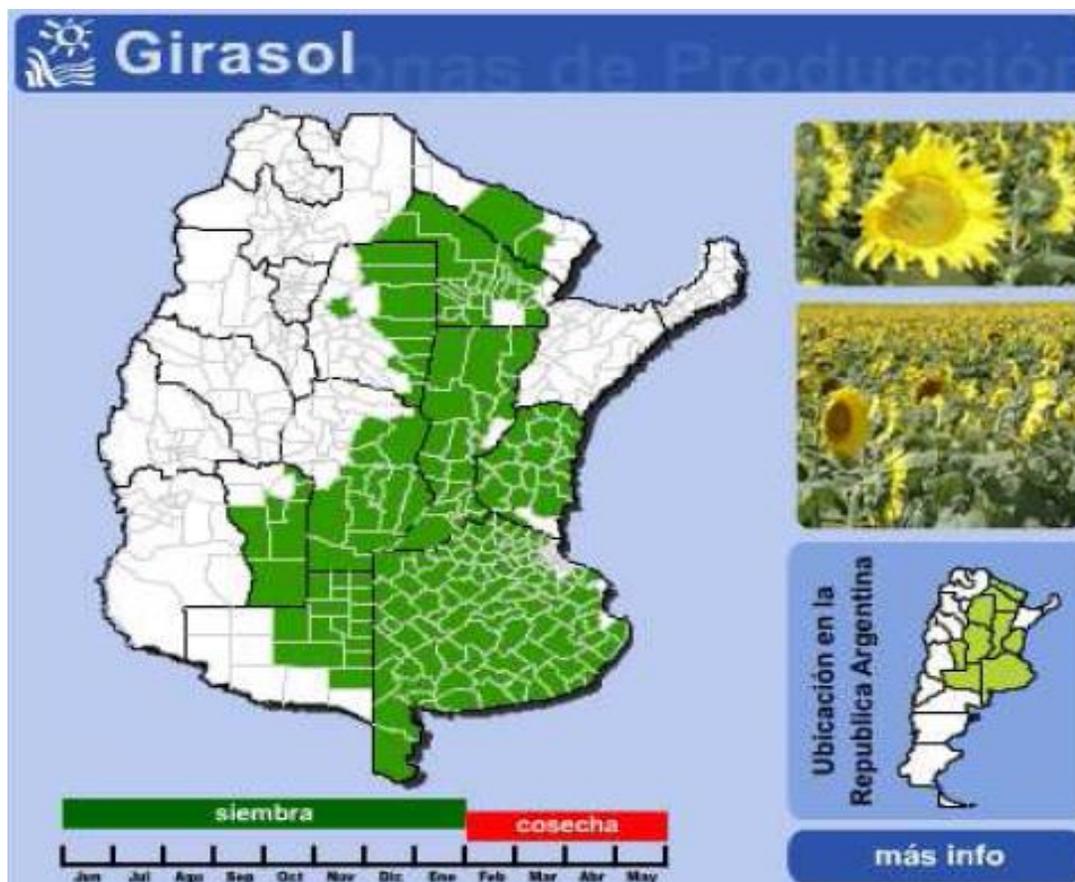


Figura 4. Distribución del cultivo de girasol en Argentina. Fuente: (MINAGRI, 2010)

El estrés hídrico en girasol produce disminución en el crecimiento temprano del cultivo, afectando longitud de la raíz, longitud del tallo, parte área total de la hoja, peso fresco, peso seco, contenidos de 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 (Dvorak y Ross, 1986; Fick y Miller, 1997). Producción y tolerancia a sequía son procesos controlados por locus genéticos diferentes, por lo tanto incrementar la tolerancia a este tipo de estrés involucra identificar y transferir características fisiológicas responsables de la tolerancia con el fin de producir cultivares con alto rendimiento y agrónomicamente aceptables. De allí surge la necesidad de dilucidar los mecanismos fisiológicos que operan como sistemas de ajuste a condiciones de estrés.

Entre los mecanismos involucrados en las respuestas de las plantas al ambiente (altas o bajas temperaturas, salinidad y sequía), se encuentran las modificaciones en los niveles de hormonas vegetales como ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA) y

etileno. La participación de los jasmonatos en respuesta a estrés biótico y abiótico fue ya citada en numerosos trabajos científicos previos (Penninckx *et al.*, 1996; Kramell *et al.*, 2000; Wasternack y Hause, 2002; Wasternack, 2005).

El ABA es un compuesto muy ubicuo en la naturaleza, se encuentra en plantas superiores, algunos musgos, algas verdes, cianobacterias y varios hongos fitopatógenos. Numerosos procesos celulares y diversas etapas del desarrollo de la planta están regulados por ABA, tales como la maduración de la semilla (Seo y Koshiha, 2002; Xiong y Zhu, 2003), 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). Además el ABA es responsable de la prevención de la germinación durante las etapa de desarrollo (Berry y Bewley, 1992). El ABA no inhibe la imbibición inicial (dos primeras fases del proceso germinativo) necesaria para el comienzo del crecimiento embrionario, sino que impide la transición hacia la fase de crecimiento de la plántula (López-Molina *et al.*, 2001).

Por otra parte, el ABA desempeña un rol primordial en la adaptación de las plantas a condiciones adversas tales como salinidad, sequía, bajas temperaturas y estrés osmótico (Zhu, 2002; Xiong y Zhu, 2003). Se ha visto que adicionalmente a su bien conocida función en el cierre estomático, la tolerancia de los tejidos a situaciones estresantes se ve incrementada significativamente con elevadas concentraciones de esta hormona (Hartung y Jeschke, 1999).

El ABA ($C_{15}H_{20}O_4$) es un sesquiterpeno que se sintetiza en cloroplastos y otros plástidos mediante escisión oxidativa de los epoxi-carotenoides, neoxantina y violaxantina. Su forma natural es (+)-(S)-ABA, y su fotoisomerización produce desdoblamiento, en una proporción aproximadamente del 50%, en los isómeros *cis* y *trans*, siendo el primero el biológicamente activo (Zacarías y Lafuente, 2000).

En plantas superiores, el ABA es sintetizado a través del clivaje oxidativo del precursor carotenoides 40 C. El primer paso de la epoxidación de zeaxantina a anterazantina y de anterazantina a violazantina ocurre en plástidos y es catalizado por zeaxantina epoxidasa (ZEP). Luego de una serie de modificaciones estructurales, violaxantina es convertida al 9-*cis*-epoxycarotenoide 9-*cis*-neoxantina por la enzima neoxantina sintasa (NSY) y luego a través de la enzima s 9-*cis*-epoxycarotenoide dioxigenasa (NCED) se produce xantoxina, intermediario de 15 C. Luego, este compuesto es exportado al citosol, donde es convertido en ABA a través de dos pasos enzimáticos vía ABA-aldehído, catalizado por ABA aldehído oxidasa (AAO) (Taylor *et al.*, 2000; Finkelstein y Rock, 2002; Seo y Koshiha, 2002; Xiong y Zhu, 2003; Schwartz y Zeevaart, 2004) (Fig. N° 5).

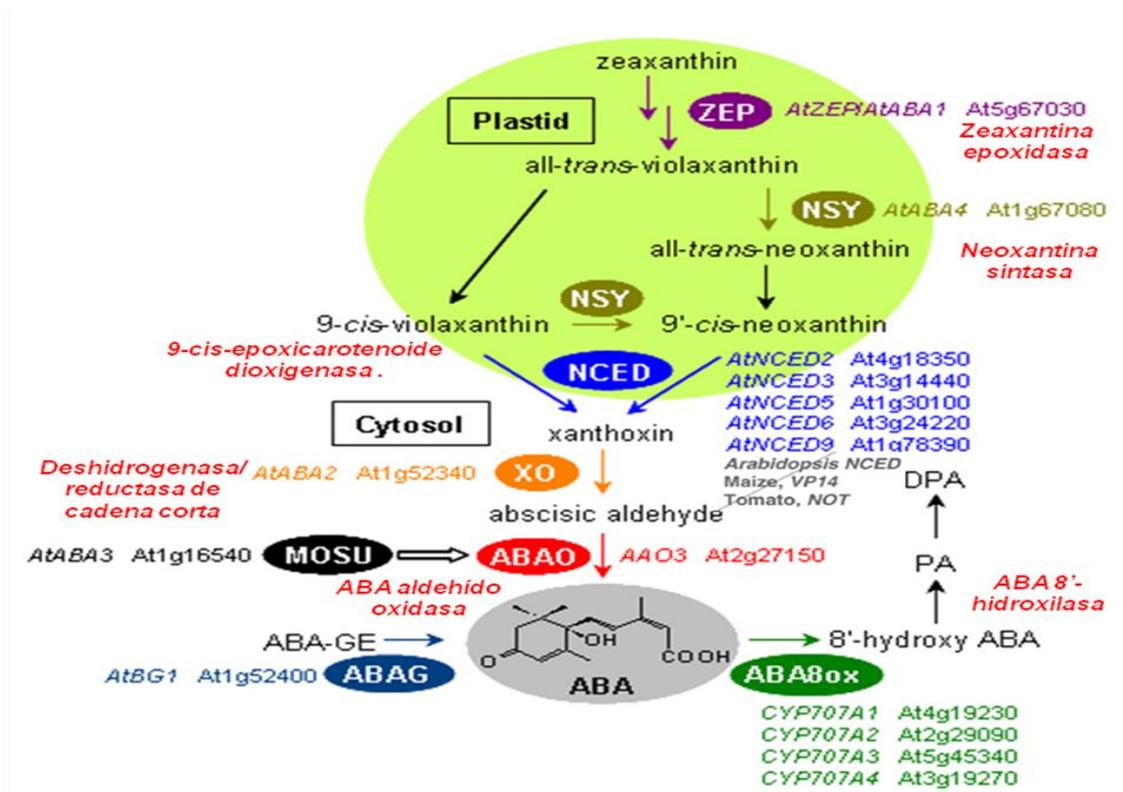


Figura 5. Biosíntesis de ABA y metabolitos. Adaptado de (RIKEN Plant Science Center Dormancy and Adaptation Research Unit)

El ABA puede ser metabolizado por hidroxilación, conjugación y reducción (Cutler y Krochko, 1999). La principal vía de oxidación es a través de la hidroxilación del átomo de carbono 8 del ABA, generando 8-hidroxi-ABA, mediado por la citocromo P450 monooxigenasa (Krochko *et al.*, 1998).

El producto de la oxidación (8-hidroxi-ABA), existe en equilibrio con el ácido faseico PA (Balsevich *et al.*, 1994; Zou *et al.*, 1995). El PA puede ser conjugado o luego reducido a ácido dihidrofaseico DPA. El mismo también puede ser metabolizado a conjugados de DPA. (Zeevaart, 1999). Una segunda vía, de menor importancia, de oxidación a través de la hidroxilación del átomo de carbono 7 de ABA, generando 7-hidroxi-ABA (Lehmann *et al.*, 1983; Lehmann y Schwenen, 1988). En células de bromegrass cultivadas, el producto de la vía minoritaria (7-hidroxi-ABA) no se acumula ya que es luego metabolizado a productos desconocidos.

Aunque hay reportes que el PA y el DPA son hormonalmente inactivos (Cutler y Krochko, 1999), los metabolitos 8-hidroxi-ABA y 7-hidroxi-ABA han exhibido una actividad

hormonal significativa, en los pocos estudios en los cuales estos compuestos lábiles han sido comparados con ABA. En dichos estudios se sugiere la posibilidad que catabolitos específicos de ABA pueden mediar algunos o todos los efectos hormonales del ABA.

Existe evidencia de una nueva vía catabólica en *Brassica napus* en la cual se desarrolla la actividad biológica de dos metabolitos de ABA novedosos, 9-hidroxi-ABA y su producto cíclico, que se denomina ácido neofaseico (neoPA) (Zhou *et al.*, 2004).

El contenido de ABA en los tejidos vegetales es el resultado de la combinación del transporte, biosíntesis y metabolismo (Zaharia *et al.*, 2004) y estos procesos están influenciados por el desarrollo y factores ambientales tales como la luz y el estrés hídrico, así como otros factores reguladores (Cutler y Krochko, 1999).

El transporte del ABA a los brotes y el incremento de su concentración en los diversos órganos iniciaría el principal cambio que ocurre como respuesta a la sequía. (Zeevaart y Creelman, 1988). Esta afirmación es ampliamente aceptada pero existirían además señales adicionales que estarían involucradas en el proceso (Munns y King, 1988; Trejo y Davies, 1991; Munns *et al.*, 1993; Griffiths y Bray, 1996).

Frente a condiciones de estrés hídrico y estrés osmótico se ha visto un incremento en los niveles endógenos de ABA, siendo este aumento esencial como factor desencadenante de la respuesta de la planta (Skriver y Mundy, 1990, Chandler y Robertson, 1994, Bray, 1997, Leung y Giraudat, 1998, Zhu, 2002). Entre algunos de los mecanismos protectores dependientes de ABA se encuentran: reducción del área foliar, protección del aparato fotosintético, modificación en la relación de crecimiento raíz/tallo, control de la síntesis de etileno y ajuste osmótico mediante la regulación de canales iónicos (principalmente en la raíz), así como en la síntesis de solutos compatibles, tales como prolina y azúcares (Alves y Setter, 2004).

Como se mencionó anteriormente, los jasmonatos (JAs) desarrollan importantes funciones en las plantas (Creelman y Mullet, 1997; Blée, 2002; Howe, 2004), regulando aspectos del desarrollo y el crecimiento de plantas incluidas la germinación de semillas, maduración de los frutos, la producción viable de polen, crecimiento y desarrollo de la raíz, abscisión y senescencia de las hojas (Creelman y Mullet, 1997; Conconi, *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 2000). A través de numerosas investigaciones, diversos autores proponen que JA y sus derivados están implicados en la respuesta a estrés biótico y abiótico (Penninckx *et al.*, 1998; Kramell *et al.*, 2000; Wasternack y Hause, 2002). Un incremento en el contenido endógeno de ABA y JA fue causado por estrés hídrico aplicado a plántulas de maíz (Xin *et al.*, 1997).

El camino de biosíntesis de los JAs comienza a partir de ácido graso poliinsaturado α -ácido linoleico (α -LA). Este ácido graso puede ser sustrato de una 9-lipooxigenasa (9-LOX) o de

una 13-lipooxigenasa (13-LOX), enzimas que insertan un oxígeno en la posición 9 o 13 del α -ácido linoleico, generando 9-hidroperoxido de ácido linoléico (9-HPOT) o 13-hidroperoxido de ácido linolenico (13-HPOT), dependiendo de la enzima que actúe. Solo la vía del 13-HPOT genera JA (Fig. N° 6).

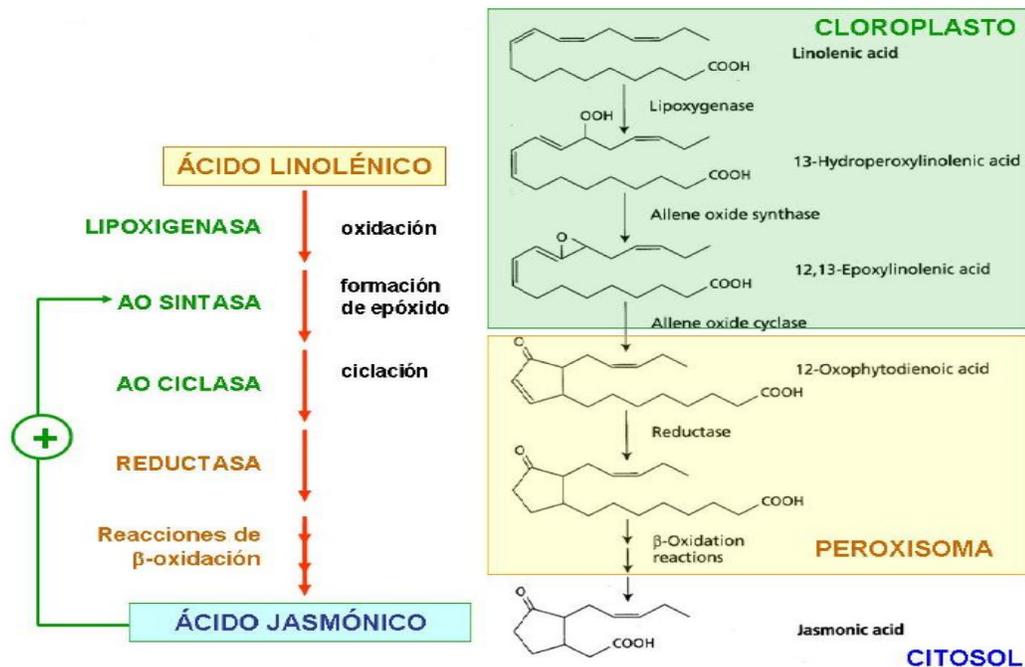


Figura 6. Vía de síntesis y localización de JAs

Estos HPOT resultantes son convertidos por una óxido de aleno sintasa (AOS), en un óxido de aleno inestable que es ciclado por una óxido de aleno ciclasa (AOC) para formar el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA). Este compuesto por acción de una OPDA reductasa (OPR3) y tres ciclos subsecuentes de β -oxidación produce el ácido (+)-7iso-jasmónico. Esta sustancia fisiológicamente activa es convertida rápidamente en su estereoisomero estable, el (-) JA, que luego es metabolizado dando origen a diferentes jasmonatos (Feussner y Wasternack, 2002; Wasternack y Hause, 2002).

La biosíntesis de los JAs ocurre en tres compartimentos celulares: en cloroplastos u otros plastídios (Abdala *et al.*, 2003), donde LA es convertido a OPDA, en citoplasma OPDA es reducido por una OPR reductasa y en peroxisoma donde ocurren los tres pasos de β -oxidación. Luego en el citoplasma JA puede ser modificado por hidroxilación o conjugación (Schaller *et al.*, 2005). Lehmann *et al.* (1995) y Kramell *et al.* (2000) informaron que el contenido endógeno

de JAs se incrementó rápidamente en hojas de cebada sometidas a estrés osmótico producido por adicción de sorbitol o manitol. En tomate, el cv. pera tolerante a sal, mostró mayores niveles endógenos de JA y OPDA que el cv. sensible Hellfrucht Frühstamm (HF); además, ambos cultivares respondieron a estrés salino modificando sus niveles de JA. La acumulación de una proteína lipoxigenasa (LOX), enzima primordial en la síntesis de JAs, fue más pronunciada en las plantas del cv. HF sometidas a estrés.

El ácido salicílico (SA) es conocido por su participación en la defensa de las plantas contra ataques de patógenos. La aplicación exógena de SA y el ingreso de microorganismos extraños al tejido vegetal aumentan los niveles endógenos de SA, generando un incremento en la resistencia a un amplio rango de agentes patógenos (Ryals *et al.*, 1996).

No solo se ha demostrado su activa participación en estrés biótico, sino también se ha comprobado que en tejidos vegetales es capaz de inducir la tolerancia a distintos tipos de estrés abiótico, por ej. estrés hídrico (Bhupinder y Usha, 2003), salino (Rajjou *et al.*, 2006) y por irradiación con UV (Cristea y Drochioue, 1987; Rasquin, 1992).

La síntesis de SA en las plantas se realiza a partir del ácido cinámico por dos posibles vías. Una de ellas implica la descarboxilación de la cadena lateral de ácido cinámico a ácido benzoico seguido por una hidroxilación, obteniéndose como producto final SA (Lee *et al.*, 1995). Alternativamente el ácido cinámico puede ser hidroxilado a ácido cumárico y luego descarboxilado a SA (Fig N° 7).

De esta manera se sugirió que la síntesis de SA en plántulas de tomate infectadas con *Agrobacterium tumefaciens* se realiza mediante la vía del ácido cumárico, mientras que en plántulas no infectadas se realiza por medio de la vía del ácido benzoico (Lee *et al.*, 1995).

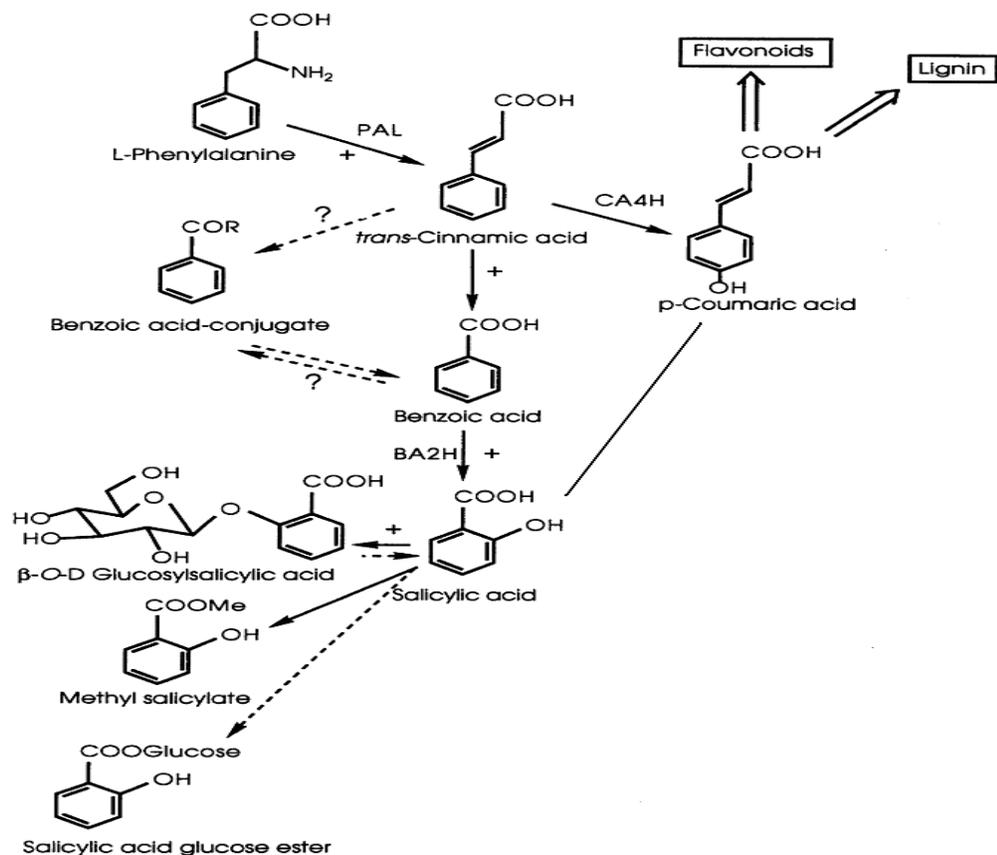


Figura 7. Vía de síntesis y localización de Ácido Salicílico SA.

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 los cultivares que se siembran actualmente en Argentina en la etapa de floración puede medir de 1 a 3 m 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).

Las Fenofases del Girasol

El desarrollo del cultivo es la sucesión progresiva de cambios fisiológicos y morfológicos que van dando lugar a distintos estados de las plantas. Se identifican así las fases del desarrollo y los estados fenológicos que sirven de hitos que separan los mismos. El desarrollo se encuentra bajo control genético y es modulado en mayor o menor medida por los factores del ambiente. Para la descripción del desarrollo existen escalas que toman en cuenta los cambios morfológicos asociados a los estados fenológicos. La identificación de los estados puede hacerse utilizando escalas que se basan en cambios visibles, por ejemplo, la floración, o en aquellos que ocurren en nivel microscópico (Fig. N° 8). Se considera que el cultivo ha alcanzado un determinado estado fenológico cuando una proporción (en general un 50%) de la población de las plantas ha alcanzado dicho estado (Trápani *et al.*, 2003).

Los principales factores ambientales que controlan la duración de las fases son la temperatura y el fotoperíodo; la importancia relativa de cada uno de ellos varía según la fase que se considere, el ambiente en el que crece el cultivo y el genotipo (Trápani *et al.*, 2003).

A continuación se describirán las cuatro fases de desarrollo:

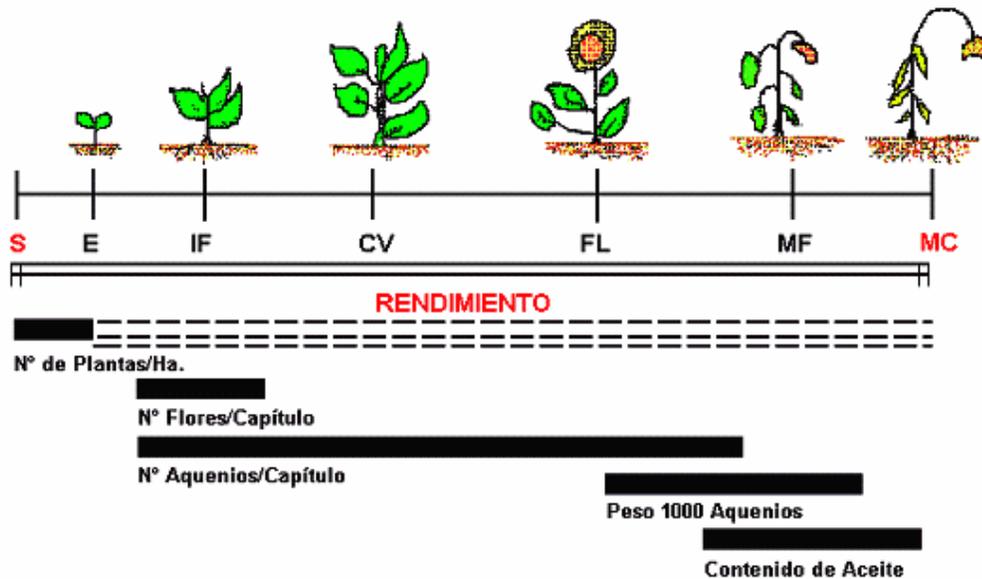


Figura 8. Fenofases del Girasol.

I. Siembra-Emergencia: Durante esta fase tienen lugar los procesos de imbibición de la semilla, emergencia de la radícula, crecimiento de la plántula y su emergencia, abriéndose el gancho plumular sobre la superficie del suelo. Se cumple así la fase de establecimiento del cultivo (Trápani *et al.*, 2003). 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 3-6°C (Trápani *et al.*, 2003).

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. Indirectamente, actúa condicionando la temperatura y la presión parcial de oxígeno en la fase gaseosa del suelo. Con el aumento de la humedad, la amplitud térmica del suelo es menor y el oxígeno difunde más lentamente. El potencial agua del sustrato puede tener efectos importantes sobre la tasa de germinación, encontrándose grandes diferencias entre cultivares de girasol (Trápani *et al.*, 2003).

II. Emergencia- Iniciación Floral: esta fase comienza con la emergencia de la plántula y finaliza en el momento en que el ápice del vástago, productor de primordios foliares, cambia su forma y pasa a diferenciar la inflorescencia y sus flores. Durante la fase

emergencia-iniciación floral 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 hojas emergidas (Trápani *et al.*, 2003).

La duración de la fase emergencia-iniciación floral depende principalmente del cultivar, de la temperatura, del fotoperíodo y, en menor medida de la radiación y otros factores como nitrógeno y fósforo. La duración de este período será generalmente menor con temperatura y radiación alta y días largos (Trápani *et al.*, 2003).

III. Iniciación floral – Primera antesis: 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 esta fase se diferencian los primordios florales y las flores crecen y maduran. Al mismo tiempo continúan el desarrollo de los primordios foliares ya iniciados y no emergidos, y la emergencia y despliegue de hojas (Trápani *et al.*, 2003).

Durante la iniciación floral el ápice en desarrollo de la planta de girasol presenta un meristema o área generativa central. Se trata de una zona de activa división celular cuyo perímetro posee un anillo que puede asemejarse a una “ola estática” en la cual células indiferenciadas son moldeadas a primordios florales. La relación entre la tasa de diferenciación de primordios y la tasa de formación del área generativa determina la magnitud de esa superficie. La relación entre el área generativa y el área total del ápice en desarrollo disminuye a lo largo del tiempo. El área generativa desaparece finalmente, reduciéndose hacia el centro de la inflorescencia en desarrollo, quedando establecido así el número potencial de flores de la inflorescencia (Trápani *et al.*, 2003).

La marcha del desarrollo de las flores individuales en los distintos sectores de la inflorescencia (periferia, medios y centro) es centrípeta y muestra desfases que se mantienen durante todo el período. Las flores de la periferia son las que se encuentran siempre en un estado de desarrollo más avanzado (Trápani *et al.*, 2003).

La duración de la fase iniciación floral-primera antesis depende principalmente del cultivar, la temperatura y el fotoperíodo (Trápani *et al.*, 2003).

IV. Primera antesis – Madurez fisiológica: Esta fase comienza con la antesis de las flores periféricas del capítulo y finaliza con la madurez fisiológica. La madurez comercial se determina según el contenido hídrico del fruto requerido para la cosecha mecánica. La duración de la fase antesis – madurez fisiológica depende principalmente del cultivar y de la temperatura (Trápani *et al.*, 2003).

Hipótesis

Las poblaciones de las familias F₃ derivadas del cruzamiento de las líneas endocriadas parentales R432 y B59, tolerante y sensibles respectivamente a estrés hídrico, expuestas a condiciones de estrés hídrico en los primeros estadios del crecimiento de plantas de girasol, mostraran variabilidad fenotípica en parámetros fisiológicos como poder germinativo (PG), peso seco (PS) y en los perfiles de hormonas de respuesta a estrés hídrico de (ABA, SA y JA).

La evaluación de la variabilidad genotípica mediante marcadores moleculares neutros y funcionales de las familias F₂ de dicha población, que se realizan en el marco del Programa de Ares Estratégicas en Girasol “de la ANPCyT”, permitirá a futuro establecer asociaciones con las variables fenotípicas, determinadas en las familias F₃ expuestas a estrés hídrico y con ello identificar las regiones genómicas que la explican.

Objetivo general

Evaluar la respuesta a estrés hídrico de diferentes germoplasmas segregantes de *Helianthus annuus* L. provenientes de la cruce de dos líneas endocriadas (R432 y B59) con diferente tolerancia a sequía, durante las etapas de germinación y crecimiento temprano.

Teniendo en cuenta que la germinación y el crecimiento de las plántulas son estadios críticos de ciclo de vida en la mayoría de las especies cultivadas, y que ello conlleva problemas en el establecimiento del cultivo, es que se propone dilucidar la acción de las hormonas de respuesta a estrés y su posible (Cross-talk) en condiciones de estrés hídrico en plántulas de familias F₃ provenientes del cruzamiento de líneas endocriadas de girasol, caracterizadas como tolerante (R432) y sensible (B59) a este carácter (Andrade *et al.*, 2009).

Objetivos específicos

1. Determinar el poder germinativo y peso seco de plántulas en las familias F₃, generadas a partir de la cruce de líneas endocriadas parentales tolerantes y sensibles a sequía (R432 x B59), sometidas a condiciones limitadas de agua.
2. Determinar y comparar los niveles endógenos de ABA, JA y SA en las familias F₃ generadas a partir de la cruce de líneas endocriadas parentales tolerantes y sensibles a sequía (R432 x B59) con comportamiento contrastante frente a estrés

hídrico, en la etapa de crecimiento temprano, cuando son sometidos a condiciones de sequía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se trabajó con líneas endocriadas de girasol pertenecientes al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), las cuales son tolerantes (R432) y sensibles (B59) a sequía. Tales líneas fueron seleccionadas a partir de ensayos a campo y en laboratorio (Andrade *et al.*, 2009). A partir de estas líneas endocriadas contrastantes a estrés hídrico y mediante el cruzamiento de las mismas, se generaron por autofecundaciones las correspondientes F_1 y F_2 segregantes y a partir de estas últimas se obtuvieron las familias F_3 de las cuales se han evaluado 89 y sus 2 líneas parentales para los parámetros de poder germinación relativo al testigo (PGRT) y 32 para peso seco relativo al testigo (PSRT).

El material vegetal utilizado para las determinaciones hormonales fueron las familias F_3 174; 199; 314; 310; 224; 290 y 148; 333; 336; 95; 300, tolerantes y sensibles a sequía respectivamente según los parámetros evaluados de PGRT.

Condiciones de crecimiento de las líneas

Las semillas pertenecientes a cada familia F_3 (25 por repetición) se colocaron en bandejas plásticas sobre arena fina previamente esterilizada. El contenido hídrico del sustrato en el momento de la siembra fue de 60% de la capacidad de campo, realizándose posteriores riegos a capacidad de campo a los 4, 7 y 10 días de la siembra, utilizando para tal fin el método de ascenso capilar de la solución al sustrato. El tratamiento de estrés hídrico fue generado con una solución de 400 mM de manitol siguiendo iguales condiciones que las explicitadas para el control mencionado con anterioridad.

Tanto controles como tratamiento fueron colocados en una cámara de crecimiento CONVIRON E15 programada con 16 hs. de iluminación a 28°C y 8 hs. de oscuridad a 20°C. En estos ensayos se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 4 repeticiones.

Evaluación del recuento final de germinación (RFG)

A partir del cruzamiento de las líneas endocriadas sensibles (A59) y tolerantes (R432) y mediante dos autofecundaciones, se generó la familia F_3 . Se evaluó el PGRT en 89 familias F_3 , lo cual se realizó a los 11 días postsiembra en aquellas plántulas normales cuya longitud de la parte aérea y/o radical sea de 0.5 cm. o mayor, descartándose las que presentaran distintas anomalías según lo tipificado en el Manual para la Evaluación de Plántulas en análisis de germinación, editado por el International Seed Testing Association (ISTA, 1979).

Desde el punto de vista de la tecnología de semillas, germinación es definida como el desarrollo, a partir del embrión de la semilla, de una plántula con las estructuras esenciales que indican su capacidad para originar una planta normal, cuando se brindan las condiciones favorables de crecimiento (Peretti, 1994). A los fines de poder comparar entre las diferentes líneas parentales y sus familias F₃, se determinó el Poder Germinativo Relativo al testigo (PGRT) el cual se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{PGRT (\%)} = \text{PG 400mM (\%)} / \text{PGT (testigo) (\%)} \times 100$$

Evaluación de peso seco

El peso seco (PS) se determinó en las plántulas normales en condiciones control y tratadas con 400 mM de manitol cosechadas en el día 11 post-siembra y luego procesadas con nitrógeno líquido y liofilizado. A partir de tales determinaciones de crecimiento se obtuvo el peso seco relativo al testigo (PSRT) a través de la siguiente fórmula:

$$\text{PSRT (\%)} = \text{PS 400mM (mgr)} / \text{PST Testigo (mgr)} \times 100$$

Análisis estadísticos

El análisis estadístico de los resultados, para los caracteres PGRT y PSRT, se realizó mediante un Análisis de la Varianza (ANOVA), utilizando a posteriori un Test de comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$). El software empleado fue el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS) (1999).

Determinaciones de hormonas vegetales

La extracción y purificación del ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA) y ácido abscísico (ABA), se realizó mediante la técnica modificada de Durgbanshi *et al.* (2005) en plántulas normales previamente desecadas de 11 días de edad.

Método de extracción y purificación adaptada de Durgbanshi *et al.* (2005)

Para la extracción se utilizó 200 mgr. de peso seco de tejido vegetal, al cual se le añadió nitrógeno líquido en un mortero y se realizó la extracción con 5 ml. agua deionizada y se transfirió la mezcla obtenida a un tubo falcón, donde se agregaron 50 ng. de los siguientes estándares internos deuterados (²H₆) ABA, (²H₆) JA, (²H₆) y SA, (²H₂). Posteriormente se

realizó la homogeneización en un Ultraturrax durante 40 seg. y se centrifugó 15 min. a 5000 rpm. Se colectó el sobrenadante en tubos falcón ajustándose el pH a 2.8 con una solución de ácido acético (AcH) al 15%. La partición se realizó mediante el agregado de 5 ml. de Diethyl Ether (Ether etílico) vortereando por 30 segundos. Se descartó la fase acuosa y se tomó la fase orgánica, este paso fue repetido dos veces. Una vez obtenida la fase orgánica se la secó a 25° C en evaporador rotativo. El extracto seco se resuspendió con Metanol pro-análisis (MeOH) 750 µl. 100%. La solución obtenida fue filtrada en columna con filtro de celulosa acoplado a una cámara de vacío Supelco. Luego se secó nuevamente a 25° C. en SpeedVac SC110 (Savant Instruments, Inc., New York, USA).

Las muestras obtenidas en el paso anterior, fueron disueltas en MeOH al 100% e inyectadas al cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) Alianza 2695 (Waters, Milford, MA, USA.), utilizándose un gradiente de incremento lineal de 40 a 80 % de MeOH/H₂O/AcH (0.2%) en un tiempo de 25 minutos por corrida; luego de 1 min., el sistema fue restituido a las condiciones iniciales de corrida, permitiéndose que se equilibre la columna durante 7 min. El flujo de corrida fue de 0.2 ml. min.⁻¹, y la columna utilizada, de fase reversa C18 de 100 mm x 2,1 mm 3-m., de marca RESTEK.

Identificación y cuantificación de hormonas vegetales

La identificación y cuantificación se realizó utilizando un espectrómetro de masas con un triple cuádrupolo (Quattro Ultima, Micromass, Manchester, Reino Unido), acoplado al HPLC citado en el párrafo anterior. La fuente de ionización utilizada fue electroespray negativo (ESI-) con un voltaje de capilar: (kVol) 3.25, energía de cono 35 (Volt), temperatura de la fuente 120 °C y temperatura desolvatación 350 °C, flujo de gas (N₂) de cono 102 (Lts/h)

Se utilizó para la detección de iones el modo MRM (Monitoreo de Reacción Múltiple), siendo las transiciones utilizadas para ABA 263>153, SA 137>97, y JA 209>59.

Los valores de concentración se obtuvieron mediante la relación de área del compuesto endógeno y el estándar interno deuterado, los cuales mediante las respectivas curvas de calibración con ajuste lineal, permitieron obtener los valores en pmol. de hormona por gr. PS⁻¹. El software utilizado fue MassLynx TM v. 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los métodos de extracción y purificación de hormonas vegetales se realizó mediante un Análisis de la Varianza de una vía (ANOVA), utilizando a posteriori un test de Rangos Múltiples LSD de Fisher ($p \leq 0.05$). El software empleado fue STATGRAPHICS Plus Versión 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del recuento final de germinación

Se evaluó el comportamiento del poder germinativo de 89 familias F_3 y sus parentales sometidas a 400 mM. de manitol, comparado al que muestran tales familias en condiciones control (PGRT). Se registraron entre las mismas diferencias significativas según se puede observar en el Cuadro N° 1.

Cuadro 1. ANOVA individual de progenies F_3 (R432 x A 59) de girasol para la variable porcentaje de germinación (Manitol 400 Mm) en relación al testigo no sometido a estrés hídrico (PGRT).

FV	GL	SC	CM	F	PR > F
Bloque	3	462.3252	154.1084	0.82	0.4832
Progenies					
F_3	89	283519.3225	3185.6104	16.97	<.0001**
Residuo	267	50115.5646	187.6987		
Total	359	334097.2123			

CV: 17.36; R^2 : 0.85; PGRT MEDIO: 78.91; FV: fuentes de variación; GL: grados libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; NS: no significativo; *significativo; **: altamente significativo (1%).

Las familias F_3 evaluadas son el resultado del cruzamiento de dos líneas endogámicas contrastantes para el carácter tolerancia a estrés hídrico previamente seleccionadas a campo utilizando la técnica de cobertura del entresurco con film plástico, según lo indicado en (Andrade *et al.*, 2009). La F_1 obtenida fue autofecundada para producir las plantas F_2 y a partir de la autofecundación de estas últimas se obtuvieron las respectivas familias F_3 o $F_{2,3}$.

A los fines de observar la segregación que presentó este carácter, las 33 familias F_3 se agruparon en base al comportamiento durante la germinación cuando fueron sometidas a 400 mM de manitol, y a partir de que se trata de poblaciones segregantes y siendo el carácter en evaluación de herencia cuantitativa que mostró un modelo de segregación 1:2:1, es que aquellas que se encontraban en el 25 % con inferior PGRT (familias F_3 N° 255 148, 333, 336, 95 y 300) se las definió como sensibles a estrés hídrico, mientras que el 50% de familias F_3 que presentaron valores de respuestas cercanos al valor medio se las definió como intermedias, mientras que las que se comportaron en el 25 % superior de PGRT se las caracterizó como familias F_3 tolerantes a estrés hídrico (familias F_3 N° 290, 314, 310, 174, 199 y 224), dentro de este grupo podemos encontrar familias con comportamiento superior al parental tolerante (segregación transgresiva), fenómeno que puede ser explicado a través de

las interacciones intra-alélicas, como aditividad y sobredominancia e inter-alélicas tales como la epístasis (Fig. N° 9).

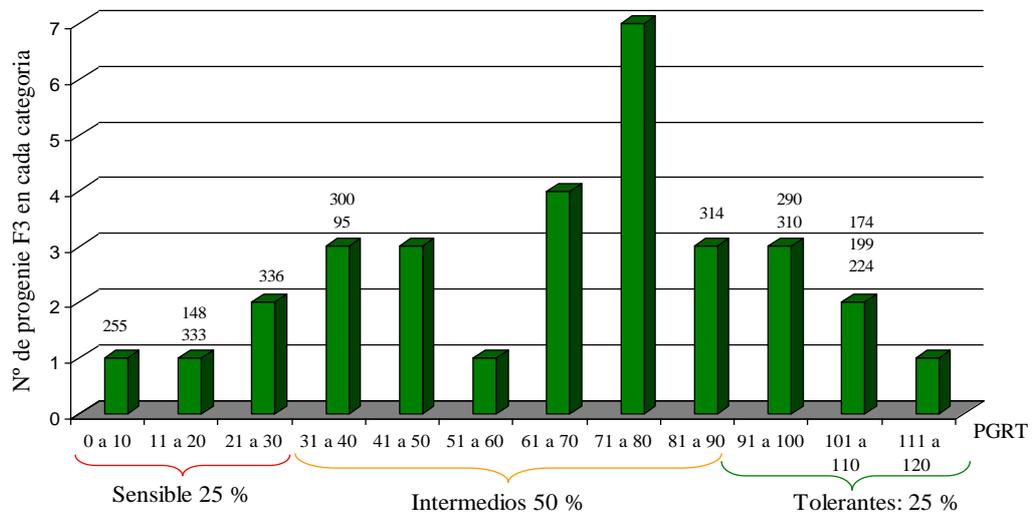


Figura 9. 33 Familias F₃ agrupadas por intervalos de porcentaje de germinación en relación al testigo (PGRT) vs. Número de progenies F₃ en cada categoría.

Actualmente, con un mayor número de datos obtenidos de PGRT en el transcurso del proyecto, las familias que se encontraban dentro del grupo tolerante se encuentran distribuidas en el grupo intermedio, ello a partir de que nuevas familias F₃ con mejor comportamiento a estrés hídrico durante la germinación se ubicaron en el extremo más tolerante, ello según se observa en la figura N° 10.

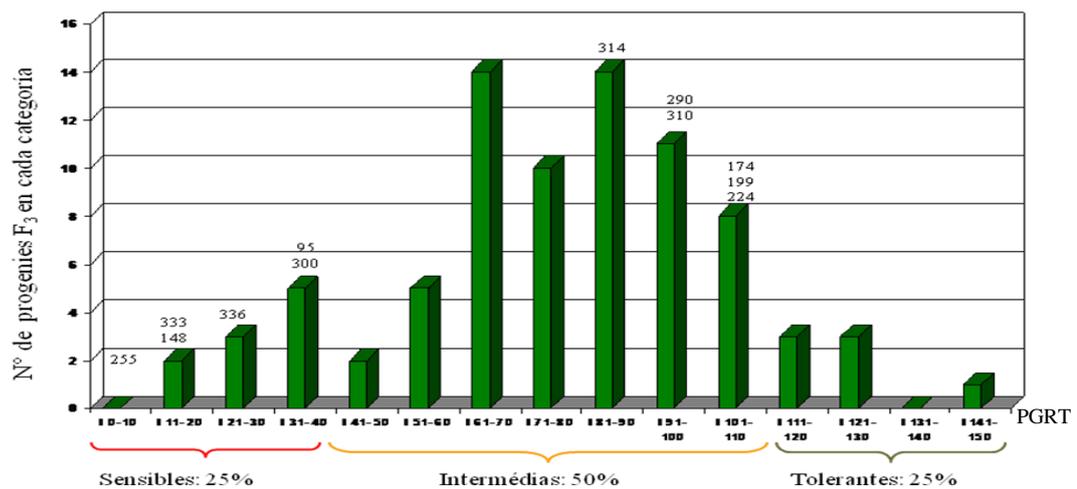


Figura 10. 89 Familias F₃ agrupadas por intervalos de porcentaje de germinación en relación al testigo (PGRT) vs. Número de progenies F₃ en cada categoría.

El análisis estadístico de PGRT realizado a las 33 familias F₃ denominadas sensibles (familias F₃ N° 255 148, 333, 336, 95 y 300) y tolerantes (familias F₃ N° 290, 314, 310, 174, 199 y 224) determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre dichas familias (Fig. N° 11), lo que corroboraría su comportamiento contrastante ante condiciones de estrés hídrico. Se observa en la Fig. N° 11, que la familia F₃ 255 presenta un PGRT igual a cero, indicando un mínimo nivel de sensibilidad de la misma al estrés hídrico.

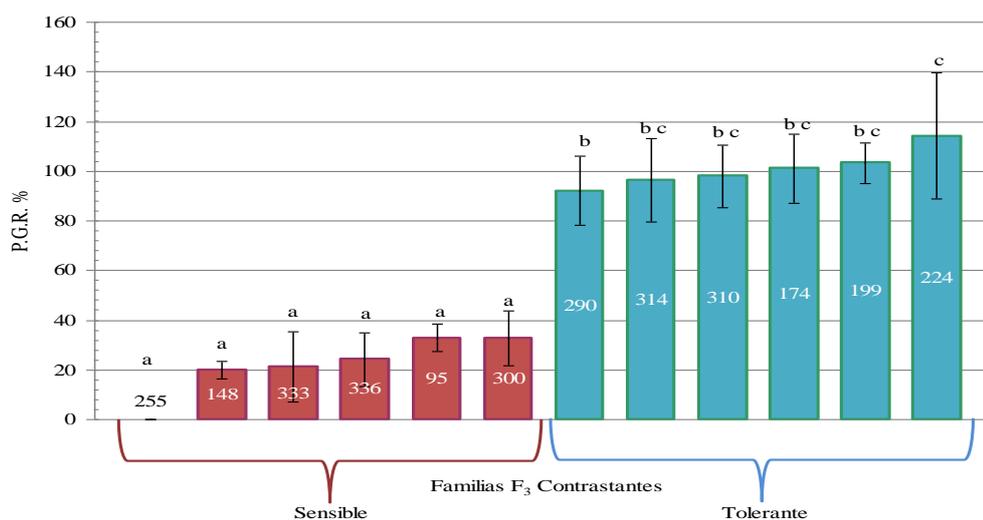


Figura 11. Determinación de PGRT (%) en familias F₃ tolerantes y sensibles sometidas a estrés hídrico (n=4 ± SE) p<0.05.

Este resultado mostraría la variabilidad existente para el carácter evaluado, y por otro lado, indicaría la importancia de evaluar el estrés hídrico en el estadio de germinación. Ello a partir de que esta etapa es crítica para el establecimiento de la plántula porque es indispensable cumplimentar con la imbibición de la semilla (Almansouri *et al.*, 2001). Un estrés hídrico en tal estadio, produce pobre e irregular germinación de semillas y falta de sincronización en el establecimiento de las plántulas (Mwale *et al.*, 2003; Mustapha *et al.*, 2009).

Evaluación de peso seco

Las 32 familias F₃ evaluadas a través de su peso seco cuando fueron sometidas a 400 mM de manitol con referencia al testigo no sometido a estrés hídrico (PSRT), mostraron entre las mismas diferencias significativas según se puede observar en la Cuadro N° 2.

Cuadro 2 ANOVA individual de progenies F₃ (R432 x A59) de girasol para la variable peso seco en plántulas sometidas a estrés hídrico en relación al testigo no sometido a estrés hídrico (PSRT).

FV	GL	SC	CM	F	PR > F
Bloque	3	319.452	106.484	0.86	0.4673
Progenies	31	28283.193	912.361	7.33	<.0001**
F₃					
Residuo	93	11579.489	187.6987		
Total	127	40182.1348			

CV: 16.28; R²: 0.71; PSRC MEDIO: 68.56; FV: fuentes de variación; GL: grados libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; NS: no significativo; *: significativo; **: altamente significativo (1%).

A los fines de observar la segregación que presentó este carácter, las familias F₃ se agruparon en base a intervalos de PSRT y se los representó en función del número de progenie F₃ en cada categoría (Fig. N° 12), lo cual muestra una distribución que no se comportaría claramente como una distribución normal, como lo observado para la distribución del carácter PGRT, lo cual podría deberse al menor número de familias analizadas hasta el momento.

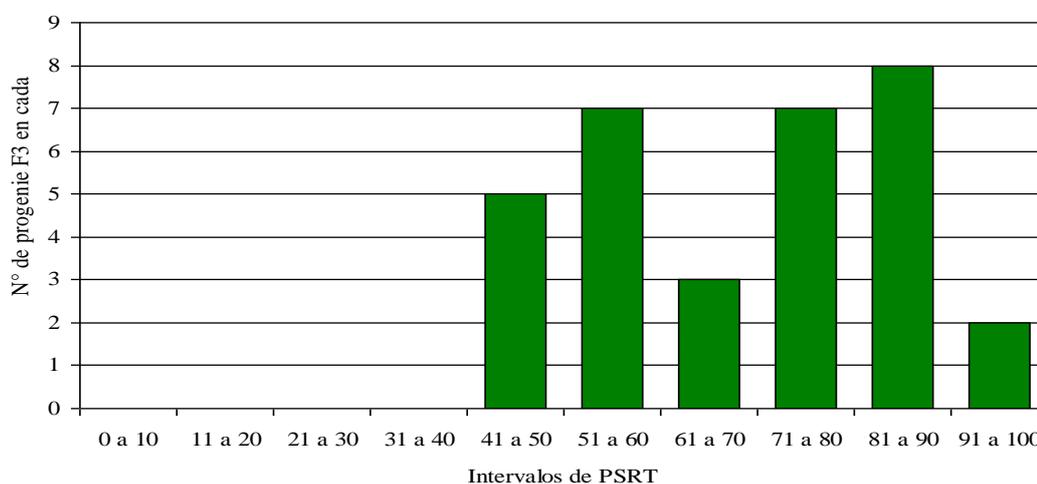


Figura 12. Progenie F₃ agrupadas por intervalos de peso seco relativos al control (PSRT) vs. Número de progenies en cada intervalo.

En los resultados obtenidos de PSRT provenientes de familias F₃ que se mostraron sensibles y tolerantes al tratamiento de estrés hídrico, según las familias seleccionadas por el carácter PGRT (Fig. N° 9), se pudo observar que ambos grupos de familias F₃ presentan

menor peso seco cuando fueron tratadas con manitol respecto al control no tratado, mostrando por ello todas un valor de PSRT menor a 100 %.

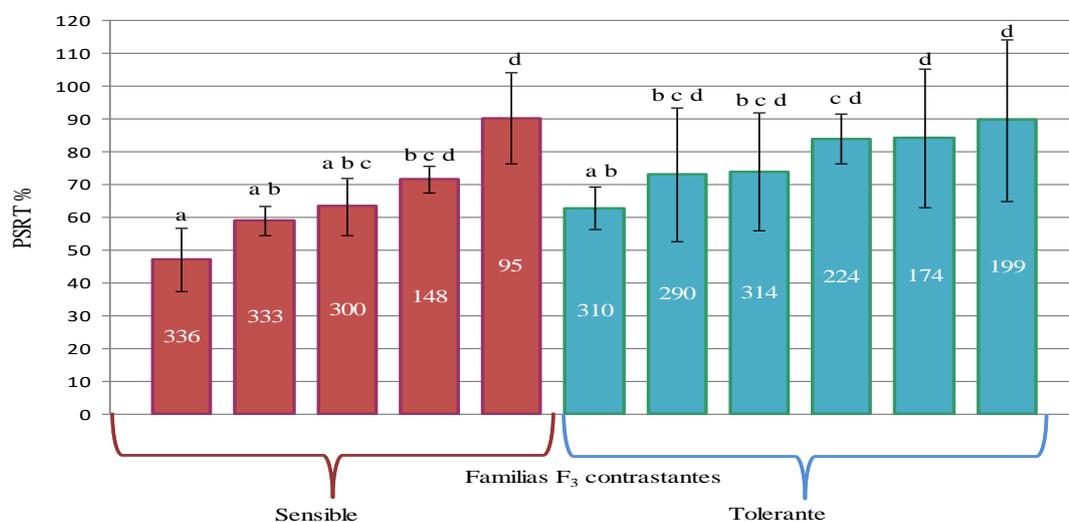


Figura 13 Determinación de PSRT (%) en familias F₃ tolerantes y sensibles sometidas a estrés hídrico (n=4 ± SE) p<0.05.

El análisis estadístico de PSRT, demostró que si bien existen diferencias significativas dentro de cada grupo de familias (sensibles y tolerantes), ello no permite discriminar hasta el momento entre grupos, por lo cual este carácter (PSRT), no sería muy eficiente en discriminar genotipos sensibles y tolerantes.

Determinaciones de hormonas vegetales en familias F₃

En referencia a las concentraciones de ácido salicílico (SA) en familias F₃ tolerantes (Fig. N° 14), se puede observar que las mismas, bajo estrés hídrico, presentan en la mayoría de los casos, una tendencia a incrementar las concentraciones de SA. En la mayoría de las familias analizadas se puede ver que la producción de SA esta por debajo de 60000 pmol/gr. PS de tejido vegetal. La familia 174 fue la que alcanzó el valor más alto en la síntesis de SA: 150161 pmol/gr. PS.

Por otra parte, se observa que las familias F₃ 174 y 310 bajo condiciones de estrés hídrico, muestran una elevada síntesis de SA manifestando una diferencia significativa con los respectivos controles. En el caso de las familias 224 y 290 muestran una menor producción de SA bajo tratamiento siendo este valor no significativo.

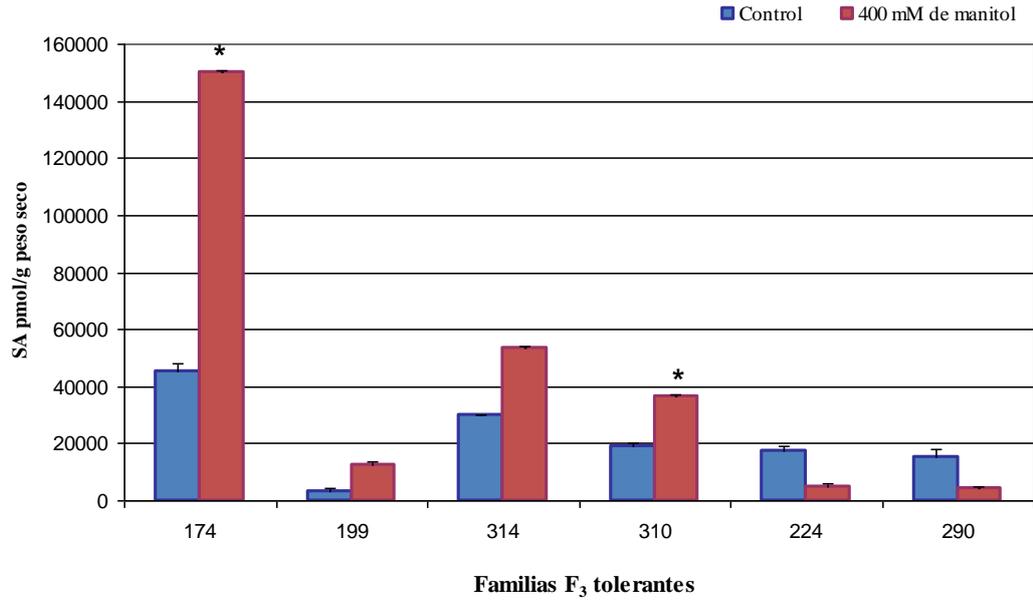


Figura 14. Niveles endógenos de SA. (pmol. gr.⁻¹ PS) en familias F₃ tolerantes, controles y tratadas con manitol. (*) Diferencia significativa (n=4 ± SE) p<0.05.

Con respecto a las familias F₃ sensibles, se observa en la Fig. N° 15 que la síntesis de SA bajo condiciones de estrés tiende a disminuir en general en las familias bajo tratamiento con respecto a los controles. En la mayoría de las familias analizadas, la producción de SA se encuentra por debajo de 40000 pmol/gr. PS. En este caso, se distingue que las familias que muestran diferencia significativa con respecto a los controles, son sólo las 95 y 336.

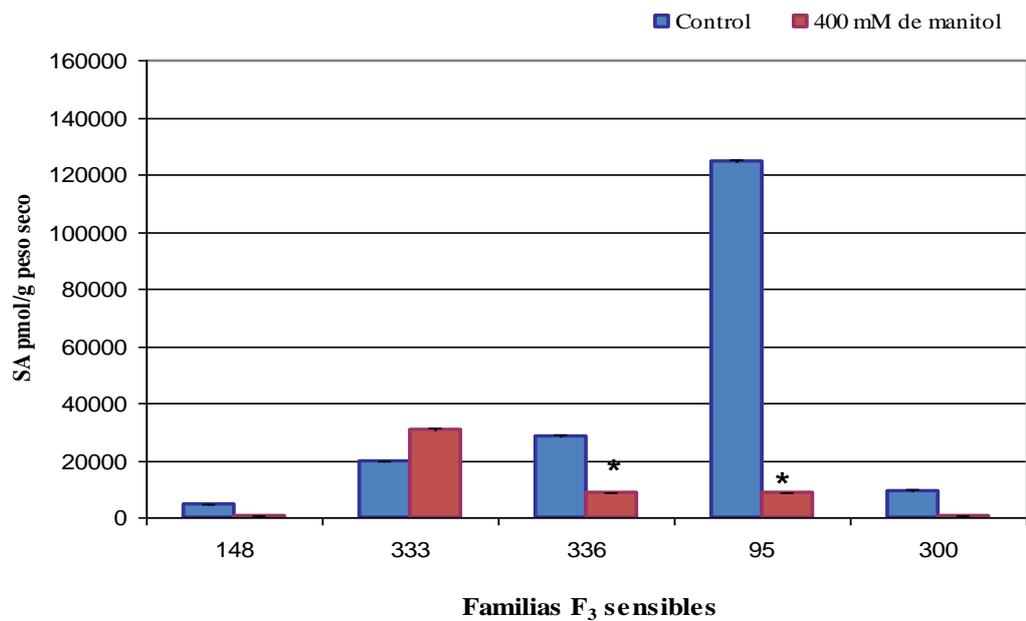


Figura 15. Niveles endógenos de SA. (pmol. gr.⁻¹ PS) en familias F₃ sensibles, controles y tratadas con manitol. (*) Diferencia significativa (n=4 ± SE) p<0.05.

La respuesta del ácido salicílico en algunas de las familias F₃ es concordante con lo propuesto por (Rajjou *et al.*, 2006) y (Borsani *et al.*, 2001), proponiendo este último autor, a SA como el principal componente en la respuesta al estrés osmótico en la germinación de plántulas de *Arabidopsis sp.* Además trabajos de Mikolajczyk *et al.* (2000) han determinado que el estrés osmótico puede inducir una síntesis elevada de SA y el mismo activar proteínas kinasas para responder adecuadamente a situaciones desfavorables. Por otra parte, se ha determinado que SA en *Arabidopsis sp.* participa en la protección de la planta contra el estrés oxidativo (Sharma *et al.*, 1996, Rao y Davis 1999), que podría ser generado en caso de sufrir la planta de estrés hídrico (Trejo y Davies, 1991).

En referencia a las concentraciones de ABA, en el caso de las familias F₃ tolerantes (Fig. N° 16), se puede distinguir que la mayoría de las familias muestran una tendencia a incrementar los niveles de ABA bajo condiciones de estrés hídrico. En este caso, solamente las familias 199, 314, 310 y 290 sometidas a tratamiento, manifiestan un incremento estadísticamente significativo en las concentraciones de ABA con respecto al control. Se observa que la familia F₃ 199 alcanzó el valor más alto en la síntesis de ABA, seguido por la familia F₃ 310 cuyos valores fueron 705.8 pmol/gr. PS y 656 pmol/gr. PS respectivamente.

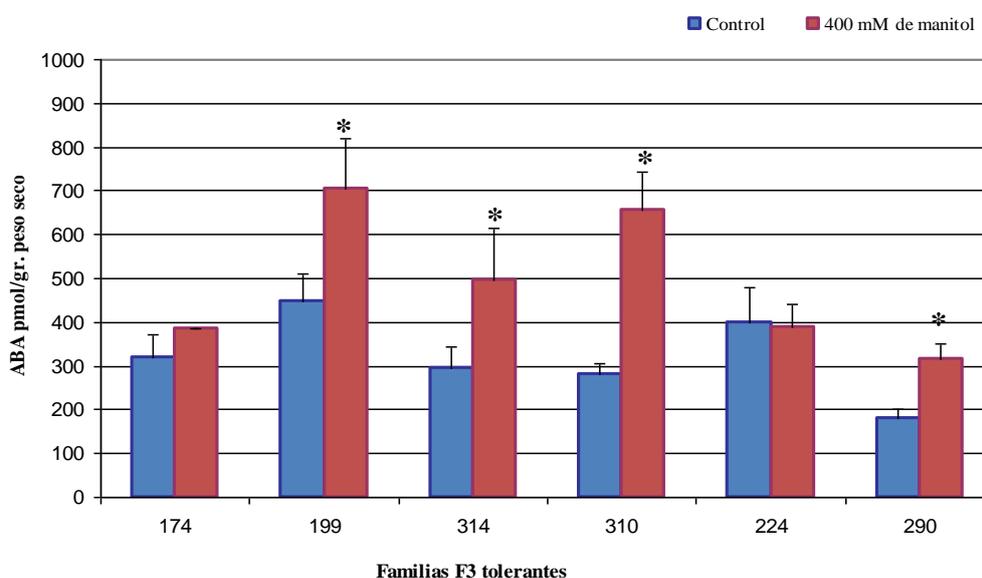


Figura 16. Niveles endógenos de ABA. (pmol. gr.⁻¹ PS) en familias F₃ tolerantes, controles y tratadas con manitol. (*) Diferencia significativa (n=4 ± SE) p<0.05.

En relación a las familias F₃ sensibles, que se observan en la Fig. N° 17, cuando fueron sometidas a estrés hídrico, se presentó una disminución generalizada del contenido endógeno de ABA. Se puede observar que tal efecto fue significativamente menor, comparado con sus controles, en las familias F₃ 333, 336, y 300. Las concentraciones

hormonales de ABA de todas las familias F_3 sensibles cuando son sometidas a estrés hídrico, se encuentra por debajo de los 500 pmol/gr. PS.

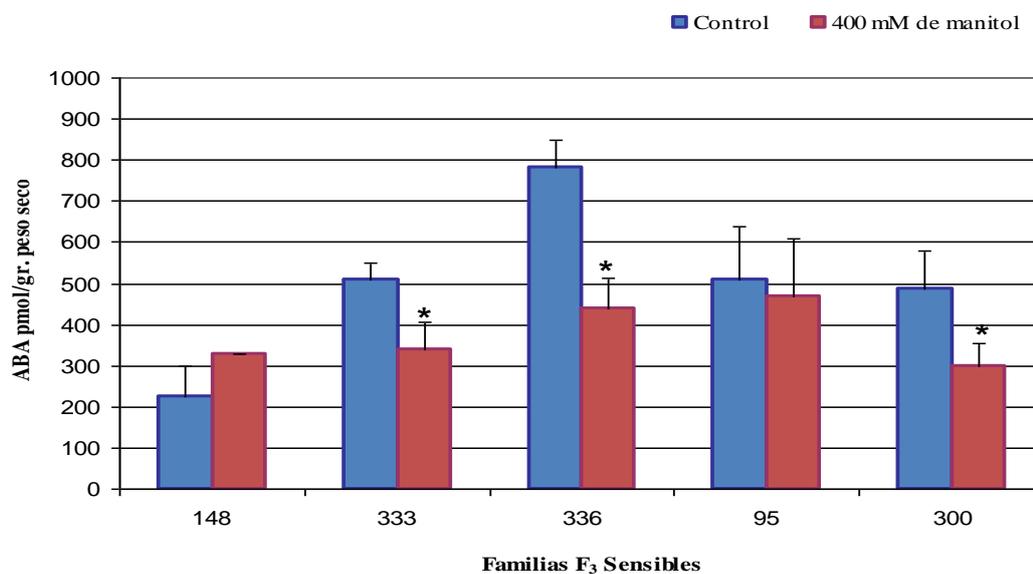


Figura 17 Niveles endógenos de ABA (pmol. gr^{-1} PS) en familias F_3 sensibles, controles y tratadas con manitol. (*) Diferencia significativa ($n=4 \pm SE$) $p < 0.05$.

A partir de lo expuesto en los resultado en la Fig. N° 16 quedaría en evidencia que un incremento en la concentración de ABA podría conferir a la planta una ventaja para enfrentar condiciones desfavorables (Jacobsen *et al.*, 2002), pudiendo provenir dicho incremento en ABA tanto de la activación de vías anabólicas (Nambara y Marion-Poll, 2005); (Schroeder *et al.*, 2001), como catabólicas (Lee *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2007; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Por otra parte, las plantas tratan de ajustar el ABA constantemente para responder a diversos cambios en las condiciones ambientales. El comportamiento de las familias sensibles y tolerantes a estrés hídrico con respecto a las concentraciones de ABA, es consistente con reportes previos donde se compararon cultivares tolerantes y sensibles a estrés en diferentes especies (Zheng y Li 2000; Chen *et al.*, 2002; Perales *et al.*, 2005; Zhu, 2002; Himmelbach *et al.*, 2003).

En cuanto a las concentraciones de ácido jasmónico (JA) en familias F_3 tolerantes podemos notar que no se manifiesta una tendencia clara (Fig. N° 18). En las familias F_3 tolerantes se observa que solo las familias F_3 174 y 310 presentan una elevada producción de JA cuando son sometidas a estrés hídrico, mostrando una diferencia significativa con sus controles. Las familias F_3 314 y 224 manifiestan una menor producción de JA al ser sometidas a estrés hídrico, mostrando diferencia significativas con los respectivos controles.

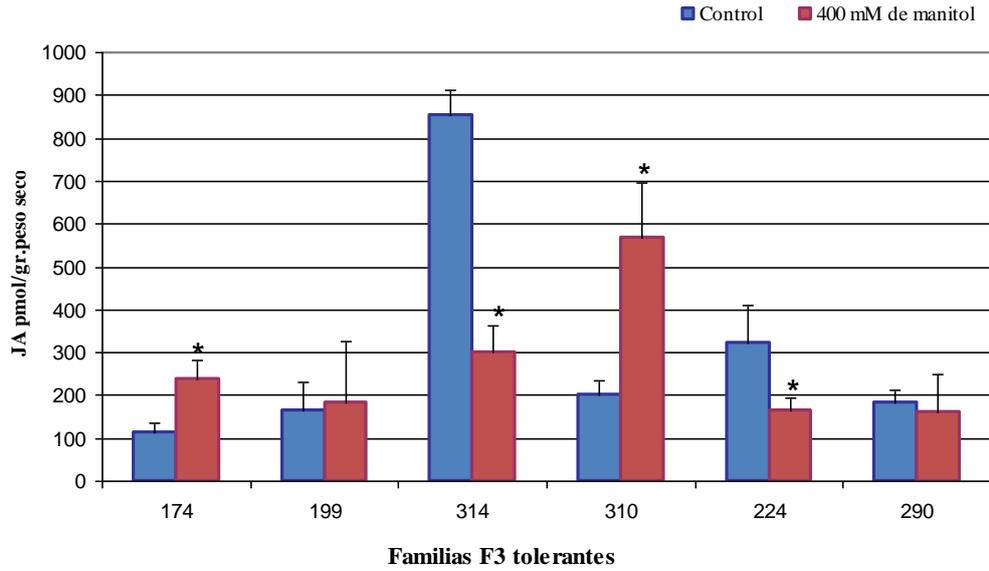


Figura 18. Niveles endógenos de JA. (pmol. gr.⁻¹ PS) en familias F₃ tolerantes, controles y tratadas con manitol. (*) Diferencia significativa (n=4 ± SE) p<0.05.

En la Fig. N° 19 se observa que familias F₃ sensibles tienen un comportamiento diferencial. Las familias F₃ 333, y 300 producen menor cantidad de JA cuando se las somete a estrés hídrico, mostrando una diferencia significativa con los controles, mientras que la familia F₃ 336 manifestó un incremento significativo. En el caso de las familias F₃ 148 y 95 no muestran una diferencia estadísticamente significativa con los controles.

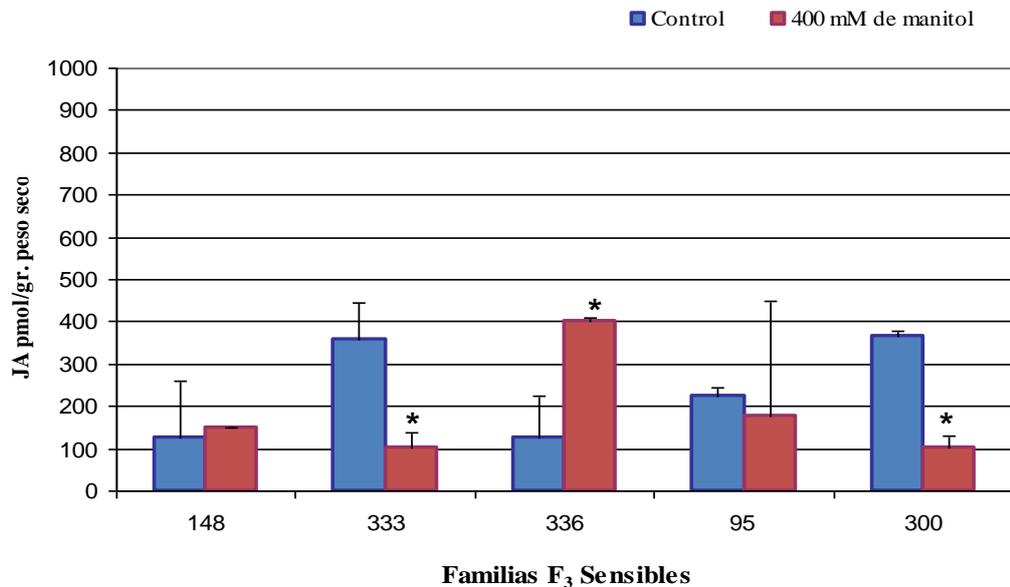


Figura 19 Niveles endógenos de JA. (pmol. gr.⁻¹ PS) en familias F₃ sensibles, controles y tratadas con manitol. (*) Diferencia significativa (n=4 ± SE) p<0.05.

Por lo tanto se observa que familias F_3 tolerantes y sensibles mostraron comportamientos contrastantes en los niveles endógenos de JA cuando fueron sometidas a estrés hídrico, no existiendo una concordancia clara con otros reportes realizados en otras especies como cebada (Lehmann *et al.*, 1995; Kramell *et al.*, 2000) ó en maíz (Xin *et al.*, 1997) en donde se observaron incrementos de JA ante condiciones de estrés hídrico.

En las determinaciones de ABA, JA, y SA de familias F_3 se observa que la familia F_3 255 no figura en los gráficos mencionados, esto se debe a que el efecto del tratamiento sobre dicha familia impidió el desarrollo de plántulas en estas condiciones y la obtención de material vegetal para las determinaciones; por este motivo no se colocó esta familia en los gráfico de ABA, JA y SA de familias sensibles.

CONCLUSIONES

-Con los datos obtenidos en este trabajo se concluye que el PGRT, demostró ser el mejor parámetro para discriminar al carácter evaluado en las familias F_3 , sensibilidad o tolerancia a estrés hídrico. Los resultados de PGRT de las familias F_3 mostraron una segregación típica de una herencia cuantitativa del carácter tolerancia al estrés hídrico en el estadio fenológico de plántula. Por lo tanto se concluye que los datos de PGRT validarían la metodología para detectar segregación en este carácter en condiciones de estrés hídrico para una población de familias F_3 .

-Al contrario de lo expresado para PGRT, el PSRT no fue un buen parámetro para discriminar en cuanto al carácter evaluado tolerancia o sensibilidad a estrés hídrico en las familias F_3 evaluadas.

-Las familias F_3 tolerantes bajo estrés hídrico presentaron una tendencia a incrementar ABA y en menor medida SA, mientras que en las familias F_3 sensibles el comportamiento fue contrastante. El contenido de JA mostró un comportamiento diferencial dentro de familias tolerantes y sensibles.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDALA, G., O. MIERSCHE, R. KRAMELL, A. VIGLIOCCO, E. AGOSTINI, G. FORCHETTI y S. ALEMANO 2003 Jasmonate and actadecanoid occurrence in tomato hairy roots. Endogenous level changes in response to NaCl. **Plant Growth Regul** 40:21-27.
- 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.
- ALMANSOURI, M., JM. KINET y S. LUTTS 2001 Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum Desf.*). **Plant Soil** 231:243–254.
- ALVES, A.A.C. y T.L. SETTER 2004 Abscisic acid accumulation and osmotic adjustment in cassava under water deficit. **Env Exp Bot** 51:259-271.
- 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. **Seed Sci. Res** 19:201–211.
- ANDREANI, P. 2004 Mercado de Girasol **En: El cultivo de Girasol en Siembra Directa**. Ed. Gustavo Duarte, B. Aires, pp. 16-26.
- ASAGIR 2008 Importancia económica – El Girasol. En: www.asagir.org.ar/asagir2008/importancia-economica.asp. Consultado: 10-06-2010.
- BALSEVICH, J.J., A.J. CUTLER, N. LAMB, L.J. FRIESEN, E.U. KURZ, M.R. PERRAS y S.R. ABRAMS 1994 Response of cultured maize cells to -abscisic acid, -abscisic acid, and their metabolites. **Plant Physiol** 106: 135–142.
- BERRY, T. y J.D. BEWLEY 1992 A role for the surrounding fruit tissue in preventing the germination of tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. **Plant Physiol**. 100: 951–957.
- BHUPINDER, S. y K. USHA 2003 Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under Waters stress. **Plant Growth Regul** 39:137-141.
- BLÉE, E. 2002 Impacto f phyto-oxylipins in plants defense. **Trends Plant Sci** 7:315:322.

BORSANI, O., V. VALPUESTA y MA. BOTELLA 2001 Evidence for a Role of Salicylic Acid in the Oxidative Damage Generated by NaCl and Osmotic Stress in Arabidopsis Seedlings. **Plant Physiology** 126:1024–1030.

BRAY, E.A. 1997 Plant response to water deficit. **Trends Plant Sci** 2: 48-54.

CHANDLER, P.M. y M. ROBERTSON 1994 Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 45:113-141.

CHAVES, M.M., J.P. MAROCO y J.S. PEREIRA 2003 Understanding plant responses 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. **Journal of Plant Growth Regulation** 21:224-233.

CONCONI, A., M.J. SMERDON, G.A. HOWE y C.A. RYAN 1996 The octadecanoid signaling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. **Nature** 383: 826-829.

CREELMAN, R.A. y J.E. MULLET 1997 Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Ann Rev Plant Physiol Plant mol Biol** 48:355-381.

CRISTEA, M. y G. DROCHIOUE 1987 Possibilities to stimulate germination of thermally treated and wheat and maize seeds. **Cercetari Agronomice in Moldova** 4:49-55.

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, JV. 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⁺, K⁺, Mg⁺ and SO₄⁺² ions and sea water in the amphiploid of *Triticum aestivum* x *Elytrigia pónica*. **Crop Sci.** 26: 658-660.

FEUSSNER, I. y C.WASTERNAK 2002 The lipoxygenase pathway. **Annu Rev Plant Physiol** 53:275-297.

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.R. y C.D. ROCK 2002 Abscisic acid biosíntesis and response. **En:** Somerville, C.R. y E.M. Meyerowitz, (Ed). **The Arabidopsis Book**. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD. p 1-52.

GRIFFITHS, A. y E.A. BRAY 1996 Shoot induction of ABA-requiring genes in response to soil drying. **J Exp Bot** 47:1525–1531.

HARTUNG, W. y W.D. JESCHKE 1999 Abscisic acid: a long distance stress signal in salt stressed plants. **En:** Lerner H (Ed) **Plant responses to environmental stresses: from phytohormone to genome reorganization**. New York: Marcel Dekker Inc. p 333-348.

HIMMELBACH, A., Y. YANG, y E. GRILL 2003 Relay and control of abscisic acid signaling. **Curr. Opin. Plant Biol.** 6:470–479.

HOWE, G.A. 2004 The roles of hormones in defense against insects and disease. **En:** Davies P.J. (Ed) **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action**. Cornell University, NY, USA. P 610-634.

ISTA 1979. Manual para la Evaluación de Plántulas en análisis de germinación. **Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero**. Estación de ensayo de semillas. Madrid. España.

JACOBSEN, J.V., D.W. PEARCE, A.T. POOLE, R. PHARIS y L.N.MANDER. 2002. Abscisic acid, Phaseic acid and Gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiol. Plant.* 115: 428-441.

KRAMELL, R., O. MIERSCH, R. ATZORN, B. PARTHIER y C. WASTERNAK 2000 Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. **Plant Physiology** 123, 177-187.

KROCHKO, J.E., G.D. ABRAMS, M.K. LOEWEN, S.R. ABRAMS y A.J. CUTLER 1998 Abscisic acid 8_h-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. **Plant Physiol** 118: 849–860

LEE H., J. LEON, I. RASKIN 1995. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** Vol. 92: 4076-4079

LEE, K.H., H.L. PIAO, H.-Y. KIN, S.M. CHOI, F. JIANG, W. HARTUNG, I. HWANG, J.M. KWAK, I.-J. LEE y I. HWANG 2006 Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increase active pools of abscisic acid. **Cell** 126: 1109-1120.

LEHMANN, H. y L. SCHWENEN 1988 Nigellinic acid: an endogenous abscisic acid metabolite from *Vicia faba* leaves. **Phytochemistry** 27: 677–678.

LEHMANN, H., A PREISS y J SCHMIDT 1983 A novel abscisic acid metabolite from cell suspension cultures of *Nigella damascena*. **Phytochemistry** 22:1277–1278.

LEHMANN, J., R. ATZORN, C. BRÜCKNER, S. REINBOTHE, J. LEOPOLD, C. WASTERACK y B. PARTHIER 1995 Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. **Planta** 197:156-162.

LEUNG, J. y J. GIRAUDAT 1998 Abscisic acid signal transduction. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 49:199-222.

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.

LÓPEZ-MOLINA, L., S. MONGRAND y N.H. CHUA 2001 A post-germination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 98: 4782-4787.

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.

MIKOLAJCZYK, M., O. S. AWOTUNDE, G. MUSZYNSKA, D.F. KLESSIG y G. DOBROWOLSKA 2000 Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. **Plant Cell** 12: 165–178.

MINAGRI., 2010. . Datos estadísticos de girasol. En:
www.minagri.gob.ar/SAGPyA/agricultura/cultivos_en_la_argentina/190.220.136.179/index.php/series-por-tema/agricultura Consultado: 23-06-2010.

MINAGRI., 2010. Datos estadísticos y mapas de girasol. En:
www.minagri.gob.ar/SAGPyA/agricultura/cultivos_en_la_argentina/01-mapa_principales_cultivos/index.php Consultado: 23-06-2010.

MINAGRI., 2010 Produccion de Aceite 2010. En:
www.alimentosargentinos.gov.ar/oleaginosos/Informes/Informe_Oleaginosas_2010_03Marzo.pdf Consultado: 23-06-2010.

MUNNS, R. y R.W. KING 1988 Abscisic acid is not the only stomatal inhibitor in the transpiration stream of wheat plants. **Plant Physiol** 88: 703–708.

MUNNS, R., J.B. PASSIOURA, B.V. MILBORROW, R.A. JAMES Y T.J. CLOSE 1993 Stored xylem sap from wheat and barley in drying soil contains a transpiration inhibitor with a large molecular size. **Plant Cell Environ** 16:867–872.

MUSTAPHA, G., T. TAHAR y N. MOHAMED 2009 Influence of water stress on seed germination characteristics in invasive diplotaxis harra (forssk.) boiss (brassicaceae) in arid zone of tunisia. **Journal of Phytology** 1(4): 249–254.

MWALE, S.S., C. HAMUSIMBI y K. MWANSA, 2003 Germination emergente and growth of sunflower *Helianthus annuus L.*, in response to osmotic seed priming. **Seed Science and Technology** 31, 199-206.

NAMBARA, E. y A. MARION –POLL. 2005. Abscisic acid biosynthesis and metabolism. **Annu. Rev. Plant Biol.** 56: 165-185.

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.

PENNICKX, I., B. THOMAS, A. BUCHALA, J.P. METRAUX y W.F. BROEKAERT 1998 Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathway is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. **Plant cell**. 10:2103-2113.

PENNINCKX, I., K. EGGERMONT, F.R.G. TERRAS, B.P.H.J. THOMMA, G.W. DE SAMBLANX, A. BUCHALA, J.P. MÉTRAUX, J.M. MANNERS y W.F. BROEKAERT 1996 Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. **Plant Cell** 8: 2309-2323.

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.

PERETTI, A. 1994 **Manual para análisis de semillas.** INTA y Ed. Hemisferio Sur S.A. Arg., p 281.

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. Consultado: 04-06-10.

RAJJOU, L., B. MAYA, R. HUGUET, C. ROBIN, A. MOREAU, C. JOB y D. JOB 2006 Proteomic investigation on the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. **Plant Physiol** 141:910-923.

RAO, M.V., H. LEE, R.A. CREELMAN, J.E. MULLET y K.R. DAVIS 2000 Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. **Plant Cell** 12, 1633–1646.

RAO, MV. y RD. DAVIS 1999 Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. **Plant J** 17:603–614.

RASQUIN, I. 1992 Role of salicylic acid in plants. **Annu Rev Pl Physiol Mol Biol** 43:439-463.

RIKEN Plant Science Center Dormancy and Adaptation Research Unit En: www.labs.psc.riken.jp/dart/Images/01/Research2.jpg Consultado: 02-09-2010.

REN, H., Z. GAO, L. CHEN, K. WEI, J. LIU, Y. FAN, W.J. DAVIES, W. JIA y J. ZHANG 2007 Dynamic analysis of ABA accumulation in relation to the rate of ABA catabolism in maize tissue under water stress. **Journal of Experimental Botany** 58: 211-219.

ROCK, C. 2000 Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. **New Phytol.** 148: 357-396.

ROHDE, A., S. KURUP y M. HOLDSWORTH 2000 *ABI3* emerges from the seeds. **Trends Plant Sci.** 5: 418-419.

RYALS, J.A., U.H. NEUENSCHWANDER, M.G. WILLITS, A. MOLINA, H. STEINER y M.D. HUNT 1996 Systemic acquired resistance. **Plant Cell** 8:1809-1819.

SCHALLER, F., A. SCHALLER y A. STINTZI 2005 Biosynthesis and metabolism of jasmonates. **J Plant Growth Regul** 23:179-199.

SCHROEDER, J.I., G.J. ALLEN, V. HUGOUVIEUX, J.M. KWAK y D. WANER 2001 Guard cell signal transduction. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 52: 627-658.

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.

SEO, M. y T. KOSHIBA 2002 Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. **Trends Plant Sci.** 7: 41-48.

SHARMA, YK., J. LEON, I. RASKIN y KR. DAVIS 1996 Ozone induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. **Proc Natl Acad Sci** 93:5099–5104.

SHINOZAKI, K. y K. YAMAGUCHI-SHINOZAKI 2000 Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and crosstalk between two stress signaling pathways. **Curr. Opin. Plant Biol.** 3:217–223.

SKRIVER, K. y J. MUNDY 1990 Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. **Plant cell** 2:503-512.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM 1999 Business Intelligence Software and Predictive Analytics. **Cary-usa**. Versión 8.11.

TAYLOR, I.B., A. BURBIDGE y A.J. THOMPSON 2000 Control of Abscisic acid synthesis. **J Exp Bot** 51:1563-1574.

TRÁPANI, N., M. LÓPEZ PEREIRA, V.O. SADRAS y A.J. HALL 2003 Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en girasol. **En:** Satorre, E. H., R. L. Benech Arnold, G. A. Slafer, E.B. de la Fuente, D.J. Miralles, M.E. Otegui, R. Savin,(Ed) **Producción de Granos, bases funcionales para su manejo**. Editorial Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. p. 10: 203-241.

TREJO, C.L. y W.J. DAVIES 1991 Drought-induced closure of *Phaseolus vulgaris* L. stomata precedes leaf water deficit and any increase in xylem ABA concentration. **J Exp Bot** 42: 1507–1515.

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.

WASTERNAK C, B. HAUSE 2002 Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.** 72:165-221.

WASTERNAK, C., 2005 Jasmonates. Introductory remarks on biosynthesis and diversity in actions. **J. Plant Growth Regul.** 23:167-169.

XIN, Z., X. ZHOU y P. PILET 1997 Level changes of jasmonic, abscisic, and indole-3yl-acetic acids in maize under desiccation stress. **J. Plant Physiol.** 151:120-124

XIONG, L. y J.K. ZHU 2003 Regulation of abscisic acid biosynthesis. **Plant Physiol.** 133: 29-36.

ZACARÍAS, L y M. LAFUENTE 2000. Etileno, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo. In: Azcón-Bieto y Talón, F. ed. Fundamentos de fisiología vegetal. **Barcelona, Mc Graw-Hill.** Pp 481-490.

ZAHARIA, LI., Y. GAY, K.M. NELSON, S.J. AMBROSE y S.R. ABRAMS 2004 Oxidation of 8'-hydroxy abscisic acid in Black Mexican Sweet maize cell suspension cultures. **Phytochemistry** 65:3199-3209.

ZEEVAART, J.A.D. 1999 Abscisic acid metabolism and its regulation. In PJJ Hooykaas, MAK Hall, R Libbenga, eds, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones. Elsevier Science. Amsterdam, pp 189–207.

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.

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. Consultado: 18-07-2010.

ZHOU, R., A. J. CUTLER, S. J. AMBROSE, M. M. GALKA, N. K. M. TIMOTHY, M. SQUIRES, M. K. LOEWEN, A. S. JADHAV, A. R.S. ROSS, D. C. TAYLOR Y S. R. ABRAMS 2004 plant biotechnology institute, national research council of canada, 110 gymnasium place, saskatoon, saskatchewan, canada **Plant physiology**, vol. 134, pp. 361–369

ZHU, J.K. 2002 Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.** 53: 247-273.

ZOU, J., G.D. ABRAMS, D.L. BARTON, D.C. TAYLOR, M.K. PEMEROY y S.R. ABRAMS 1995 Induction of lipid and oleosin biosynthesis by -abscisic acid and its metabolites in microspore-derived embryos of *Brassica napus L.* cv Reston. **Plant Physiol** 108: 563–571.