

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Trabajo Final presentado para optar al

Grado de Ingeniero Agrónomo

Modalidad: Proyecto

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE PLÁNTULAS DE
GIRASOL (*Helianthus annuus* L.) A ESTRÉS HÍDRICO.**

Nombre del Alumno: Ramírez Federico
DNI: 33827306

Director: Andrade Andrea
Co-Director: Vigliocco Ana

Río Cuarto – Córdoba
Diciembre 2015

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

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final:
**“CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE PLÁNTULAS DE
GIRASOL (*Helianthus annus* L.) A ESTRÉS HÍDRICO.”**

Autor: Ramírez Federico
DNI: 33827306

Director: Andrade Andrea
Co-Director: Vigliocco Ana

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión
Evaluadora:

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, hermana, abuelos y demás familiares por su apoyo incondicional en cada momento y por su significativo aporte para mi formación personal, sin lo cual no habría podido lograrlo.

A mis abuelos Edit y “Nino”, desde donde sea que estén mirando, seguramente habrán echo fuerzas para que yo pueda alcanzar este título.

A todos los compañeros y amigos de la carrera, por los inolvidables momentos compartidos.

A los amigos de la vida.

A Andrea y Ana, por haberme ayudado en todo lo que podían.

A los profesores que me ayudaron y aconsejaron en el camino hacia este título de grado.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto.

INDICE GENERAL

Índice de texto	III
Índice de figuras.....	IV y V
Índice de tablas	V
Resumen	VI
Abstract	VII
Introducción	
Origen. Distribución. Importancia del cultivo	1
Descripción del cultivo	3
El estrés hídrico y el cultivo de girasol	3
Hipótesis y objetivos	
Hipótesis	6
Objetivo General	6
Objetivos específicos	6
Materiales y Método	
Material vegetal	7
Ensayo de germinación	7
Ensayo de crecimiento temprano y tratamiento de estrés hídrico	7
Ensayo de recuperación post-estrés	8
Evaluación de parámetros morfo-fisiológicos	8
Evaluación de parámetros bioquímicos	9
Reproducibilidad de las determinaciones	10
Análisis estadístico	10
Resultados	
Parámetros morfo-fisiológicos	12
Parámetros bioquímicos	19
Discusión	22
Conclusión	26
Bibliografía	27

Índice de figuras

Figura 1. Áreas productoras del cultivo de girasol en Argentina	2
Figura 2. Contenido relativo de agua (CRA) en hojas de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días	11
Figura 3. Potencial osmótico en hojas de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días	12
Figura 4. Potencial osmótico en raíces de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días	12
Figura 5. Peso fresco relativo de parte aérea de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días	13
Figura 6. Peso fresco relativo de raíces de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días	14
Figura 7. Peso seco de parte aérea de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días	14
Figura 8. Peso seco de raíces de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días	15
Figura 9. Relación PS radical / PS de parte aérea de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días	16
Figura 10. Tasa de aparición de hojas de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días	16
Figura 11. Área foliar de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días	17
Figura 12. Contenido de prolina en parte aérea de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días	18
Figura 13. Contenido de prolina en parte radical de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días	19
Figura 14. Contenido de glicin-betaína en parte aérea de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días	19

Figura 15. Contenido de glicin-betaína en parte radical de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días 20

Índice de tablas

Tabla 1. Efecto de las diferentes condiciones sobre el contenido de clorofilas y carotenoides 20

RESUMEN

El estrés hídrico es uno de los factores abióticos más acuciantes que afecta el crecimiento y productividad de las plantas. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta morfo-fisiológica y bioquímica de plántulas de girasol de la línea endocriada B71 -tolerante a estrés hídrico- luego de ser sometidas a estrés hídrico moderado y a un período de rehidratación post-estrés (3, 5 y 8 días). La obtención de plántulas se realizó en bandejas con arena fina en Cuartos Ambientales Conviron PR48 durante 18 días. El contenido hídrico del sustrato al momento de siembra fue 60% de capacidad de campo (c.c); a partir del 4^{to} día, y luego cada 3 días, se realizaron riegos por ascenso capilar empleando soluciones que generaron las condiciones evaluadas: 1- Hoagland 50% fuerza iónica (control); 2- Manitol 400 mM (agente de estrés hídrico moderado); 3- Rehidratación por 3, 5 y 8 días. Las plántulas se cosecharon, seccionaron en parte aérea (hojas verdaderas y tallo, exceptuando cotiledones) y radical, congelaron en N₂ líquido, liofilizaron y conservaron a -20°C. Varios parámetros de crecimiento fueron alterados por el estrés hídrico; entre ellos, área foliar, peso fresco relativo aéreo y radical y peso seco radical. Un aumento significativo se registró en la relación peso seco radical/peso seco aéreo. También se modificaron ciertos parámetros fisiológicos y bioquímicos en respuesta a la condición estresante. El contenido relativo de agua disminuyó significativamente, y esto confirmó que las plántulas se encontraban estresadas. Además, se observó una drástica disminución del potencial osmótico, el cual recuperó el valor de las plántulas controles a los 8 días de rehidratación. Entre los solutos osmocompatibles, la concentración de prolina se incrementó en parte aérea y radical de plántulas estresadas. En general, el período de rehidratación considerado no fue suficiente para revertir la respuesta post-estrés. Los resultados demuestran que la línea en estudio posee características morfo-fisiológicas y bioquímicas adaptativas a la condición estresante impuesta; esto generaría la posibilidad de producir híbridos de girasol a partir de su empleo como línea tolerante parental.

Palabras claves: *Helianthus annuus* L., estrés hídrico, período de rehidratación, parámetros morfológicos, bioquímicos y fisiológicos.

ABSTRACT

Characterization of the sunflower seedlings (*Helianthus annuus* L.) response to water stress

Water stress is one of the most severe abiotic stresses affecting growth and productivity of plants. The aim of this study was to evaluate the morpho-physiological and biochemical response of sunflower seedlings of B71 inbred line - tolerant to water stress- when they were subjected to moderate water stress and rehydration period (3, 5 and 8 days). The germinated seeds were transferred to 31 x 18 x 10 cm trays (50 seeds per tray) containing fine sand. At time of planting the water content was 60% field capacity (FC). Then, trays were placed in Environmental Convirion Rooms PR48 for 18 days. Mannitol (400 mM) was used as a drought stimulator. From the 4th day of planting in sand, water stress was applied by mannitol irrigation during 14 day-time till moderate water stress was reached. Controls plants (control) were grown continuously with normal irrigation (Hoagland's solution, 50% of full strength). Irrigation with Hoagland's solution or mannitol was done every 3 days till the end of the experiment. To evaluate plant recovering subsequent to water stress, after 5 days of irrigation with mannitol seedlings were kept in optimal growth conditions, i.e., re-watered with Hoagland's solution during 3, 5 and 8 days after rewatering ("recovery period") till the end of the experiment. After harvest, fifteen plants of each condition (control, stressed and rewatering) were separated into aerial part and roots and cleaned with distilled water. Several growth parameters were altered by water stress; including leaf area, fresh aerial part and radical relative weight and root dry weight. A significant increase was recorded in the root dry weight / aerial part dry weight. Also, physiological and biochemical parameters were changed in response to a stressful condition. The relative water content decreases significantly, and this confirms that the seedlings were stressed. In addition, a drastic reduction of the osmotic potential, which recovered the value of the controls at 8 days of rehydration seedlings were observed. Among the compatible solutes, proline content increased in aerial part and root of seedlings stressed. Generally, the rehydration period was not considered sufficient to reverse the post-stress response. The results showed that the B71 line has morpho-physiological and biochemical characteristics adaptive to the stressful conditions imposed; this creates the possibility of producing sunflower hybrids from use as tolerant parental line.

Key words: *Helianthus annuus* L., water stress, rehydration period, morphologic, biochemical and physiological parameters.

INTRODUCCIÓN

Origen. Distribución. Importancia del cultivo

El cultivo de girasol (*Helianthus annuus* L.) se remonta a las tribus indias de América del Norte. Hacia el 1500 los conquistadores españoles llevan el cultivo a Europa, extendiéndose a través de todo el continente, donde su uso fue principalmente ornamental y medicinal. En el siglo XVIII el girasol se convierte en un cultivo muy común en Rusia, creándose así el primer gran polo productor del mundo (Nacional Sunflower Association, 2015).

Las primeras referencias sobre el cultivo de girasol en Argentina se remontan al siglo XIX, cuando colonos afincados en las provincias de Entre Ríos, Santa Fe y Buenos Aires realizan las primeras introducciones de semilla para consumo propio. En el período comprendido entre los años 1930 y 1959 el girasol logra una gran expansión como cultivo oleaginoso; teniendo lugar en la campaña 48/49 el primer récord de superficie sembrada con 1.800.000 ha. Paralelamente a la expansión del cultivo, a causa de las guerras mundiales y la consecuente falta de aceite, se produce un incremento en la industrialización del grano, como así también en el consumo de su aceite en sustitución de otros. Entre los años 1950 y 1960, la crisis causada por factores económicos y sanitarios, da origen a una fuerte reducción del área sembrada, llegando en la campaña 54/55 a un mínimo de 560.000 ha. A partir de 1975 tiene lugar un vertiginoso desarrollo de los híbridos, y con el inicio de la década del '80 el cultivo experimenta un gran cambio. Las estadísticas muestran un importante aumento de la producción por unidad de superficie, especialmente en lo que se refiere a rendimiento de aceite. Sin embargo, a partir del año 2000 el desplazamiento del cultivo hacia zonas con mayor riesgo agroecológico y tierras de menor calidad condujo a que los rendimientos, pese a importantes cambios tecnológicos incorporados, no experimentaran subas significativas (ASAGIR, 2008).

Actualmente, el cultivo de girasol se encuentra distribuido en el suroeste de Estados Unidos, Norte de México, el Caribe, Oceanía, Europa, África y Asia. En Argentina, el girasol es cultivado desde el sudeste de la Región Pampeana (39° S) hasta la Región Chaqueña (26° S); comprendiendo el norte de Santa Fe y Chaco (17%), Córdoba y Entre Ríos (15%), oeste de Buenos Aires, La Pampa y San Luis (25%) y sudeste y suroeste de Buenos Aires (43%) (Fig. 1). En cada una de estas zonas los cultivares utilizados tienden a ser distintos como así también la estación del año en que se cumple buena parte de su ciclo de cultivo. El hecho de que se logren rendimientos comerciales importantes en ambientes tan dispares resulta, en parte, de la plasticidad de la especie y del éxito de los fitomejoradores en seleccionar materiales adaptados a zonas con diferente disponibilidad de recursos e incidencia de adversidades.

En cuanto a la producción, los países líderes del mercado mundial de girasol mostraron en la campaña 2013/2014 una excelente recuperación y crecimiento respecto de los valores registrados en los últimos dos años (2011/2012 y 2012/2013). Sin embargo, en Argentina se

observa una persistente reducción: en la campaña 2011/2012 se registró una producción de 3.680.000 tn, en el ciclo 2012/2013 fue de 2.850.000 tn y de 2.300.000 tn en la campaña 2013/2014. En el ciclo 2014/2015 la superficie cosechada fue de 1,24 millones de ha -siendo la más baja de los últimos quince años- alcanzando una producción de 2.750.000 tn, lo cual representa un 19% más en relación a la campaña anterior (2013/2014) (FyO, 2014, 2015). Esta tendencia hacia la disminución en la superficie cultivada con girasol, sumado a la competencia de aceites provenientes de otros cultivos tales como los de soja y palma, ha posicionado al girasol en una situación desfavorable en comparación con otros cultivos oleaginosos.



Figura 1. Áreas productoras del cultivo de girasol en Argentina (INTAGRO, 2015).

En relación a la importancia del girasol, el principal producto que se obtiene de su molienda es el aceite, ya que sus semillas son una importante fuente de materia grasa y energía, además de hidratos de carbono y proteínas. El resto, principalmente harina de proteína vegetal es utilizada como insumo forrajero en la alimentación de animales, aves de corral y rumiantes. En este sentido, Argentina es el primer exportador mundial de aceite y harina de girasol (Infoagro, 2015a).

Descripción del cultivo

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una planta anual perteneciente a la familia *Asteraceae*, con numerosas subespecies cultivadas como plantas ornamentales, oleaginosas y forrajeras.

El sistema radical está formado por una raíz pivotante y un sistema de raíces secundarias de las que nacen las terciarias, las cuales exploran el suelo en sentido horizontal y vertical. Normalmente la longitud de la raíz principal puede alcanzar profundidades mayores a los 2 m.

El tallo, de consistencia semileñosa y maciza en su interior, es cilíndrico, con un diámetro variable entre 2 y 6 cm, y una altura hasta el capítulo de entre 40 cm y 2 m. El mismo presenta una superficie exterior rugosa, asurcada y vellosa; excepto en su base. Sus hojas presentan filotaxis alterna, son dentadas y de áspera vellosidad tanto en el haz como en el envés, variando su número entre 12 y 40, según la variedad.

Las flores se reúnen en una inflorescencia denominada capítulo, el cual está rodeado por brácteas involucrales. Las flores exteriores (pétalos amarillos) son estériles, están dispuestas radialmente y su función es atraer a los insectos polinizadores. Las flores internas (color café) poseen ovario ínfero, una corola en forma de tubo y cinco anteras unidas a la base del tubo de la corola. El fruto seco es una cipsela de tamaño comprendido entre 3 y 20 mm de largo y entre 2 y 13 mm de ancho. Se compone de la verdadera semilla y un clamidocarpo fibroso y duro. La semilla está formada por el eje embrionario y dos cotiledones carnosos, estando el eje embrionario situado en la zona apical más aguda, mientras que los cotiledones ocupan todo el resto interior del fruto. La cubierta seminal forma una película fina que recubre al embrión, asegurando la adherencia entre el clamidocarpo y la semilla (Infoagro, 2015b).

El estrés hídrico y el cultivo de girasol

El estrés hídrico es uno de los factores más acuciantes que afecta el crecimiento y productividad de las plantas (Roche *et al.*, 2009), definiendo la distribución de los cultivos agrícolas. Los procesos que las plantas ponen en juego al enfrentar una situación de estrés hídrico son muy variables, especialmente en cuanto a la escala temporal en que tiene lugar. Varias de las respuestas rápidas probablemente se relacionan con actividades de mantenimiento del metabolismo y pueden no ser directamente importantes como rasgos de tolerancia a sequía.

Así, gran cantidad de genes se expresan como consecuencia del estrés, pero la función de muchos de ellos es aún desconocida. En el otro extremo de la escala temporal de respuestas a estrés se encuentran aspectos tales como la fenología y el desarrollo del área foliar (Dardanelli *et al.*, 2003).

La habilidad de un cultivo para crecer y lograr un rendimiento importante en áreas sujetas a sequías periódicas reconoce dos grandes estrategias: el escape al déficit hídrico o la tolerancia al mismo (Begg y Turner, 1976). De este modo, existen diferentes estrategias de escape al estrés tales como un rápido desarrollo fenológico, lo cual permite a la especie cumplir su ciclo en períodos con condiciones hídricas favorables para el crecimiento o aquellas estrategias en las que la siembra se realiza tardíamente y los estadios más críticos para la determinación del rendimiento se definen una vez recuperado el balance hídrico positivo. La estrategia de tolerancia, que no es excluyente de la anterior, es importante en ambientes donde los períodos de déficit hídrico ocurren en cualquier momento durante la estación de crecimiento. Esta situación es característica de muchas áreas agrícolas del mundo, donde la cantidad total de precipitaciones supera los requerimientos hídricos de los cultivos pero la variabilidad intra-estacional es grande. En este sentido, la tolerancia a la sequía se define como la habilidad de una planta para soportar dicha condición. La intensidad de la merma en la producción como consecuencia del estrés hídrico depende de la etapa fenológica del cultivo, siendo germinación y establecimiento los estadios críticos en la mayoría de las especies cultivadas.

En girasol, el estrés hídrico ocasiona una pobre e irregular germinación de semillas y un desincronizado establecimiento de plántulas (Albuquerque y Carvalho, 2003), además de impactar negativamente sobre el rendimiento de granos y materia grasa. Por otra parte, como consecuencia de la sequía, durante el desarrollo vegetativo se observan modificaciones morfológicas tales como reducción del área foliar, altura y diámetro del tallo y número de hojas (Agele, 2003; Turhan y Baser, 2004). Asimismo, un aumento en la longitud de las raíces bajo condiciones de estrés hídrico se produce a expensas de la biomasa aérea. Esto, a su vez, disminuye la actividad fotosintética (Badr *et al.*, 2004; Germ *et al.*, 2005) y, por ende, la asimilación de sus productos durante la fase reproductiva, lo que lleva a la reducción del diámetro del capítulo y el número de cipselas por capítulo. Durante la etapa de floración, el estrés hídrico provoca aborto de ovarios y de embriones, esterilidad del polen y disminución en el índice de área foliar, número de cipselas por capítulo, peso de 100 cipselas y número de cipselas fértiles por capítulo (Baldini y Vannozzi, 1998; Reddy *et al.*, 2003). El estrés hídrico también posee impactos negativos sobre características físicas de la semilla tales como su tamaño, siendo el grado de deterioro menor cuando la sequía ocurre durante la etapa de llenado de las cipselas. En esta etapa, las plantas responden al estrés con la senescencia abrupta de las hojas (Rauf y Sadaqat, 2007) y la movilización de reservas hacia las cipselas en desarrollo (Baldini y Vannozzi, 1998; Rauf y Sadaqat, 2007). No obstante, cabe destacar que en respuesta a la escasez hídrica el rendimiento de la planta se reduce aproximadamente entre el 15-25% durante la fase vegetativa y es mayor al 50% durante la etapa de floración (Reddy *et al.*, 2003). A nivel celular, el estrés hídrico causa reducción del crecimiento, pérdida de turgencia, cierre de

estomas, lesiones en la membrana celular y producción de radicales libres que tiende a dañar el aparato celular (Kang y Zhang, 1997; Tahir *et al.*, 2002).

Las plantas pueden responder al estrés hídrico a través de un proceso denominado "ajuste osmótico", que implica la reducción del potencial osmótico celular por la acumulación de solutos tales como azúcares (rafinosa, sacarosa, trehalosa), azúcares alcohol (sorbitol, manitol), aminoácidos (prolina), y aminas (glicin-betaína, algunas poliaminas). Estos metabolitos funcionan como "osmoprotectores" para mantener el equilibrio osmótico, o como antioxidantes que neutralizan las especies reactivas de oxígeno (Mahajan y Tuteja, 2005). Finalmente, las plantas enfrentan la sequía mediante la expresión de una batería de genes que codifican proteínas con alguna función adaptativa o de protección. Tales genes, por ejemplo, pueden ayudar a proteger las células frente a condiciones de sequía mediante la producción de proteínas metabólicas importantes, o proteínas que regulan la transducción de señales en la respuesta al estrés (Shinozaki *et al.*, 2003). Asimismo, fitohormonas tales como ácido jasmónico y ácido abscísico actúan como moléculas de señalización implicadas en las rutas para la expresión de genes que responden al estrés hídrico (Zhang *et al.*, 2006; Miersch *et al.*, 2008).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

1. Plántulas de girasol de la línea B71 modifican su crecimiento (parámetros morfológicos) cuando son sometidas a estrés hídrico moderado generado por la aplicación de manitol.
2. Plántulas de girasol presentan además modificaciones en algunos de sus parámetros fisiológicos y bioquímicos en respuesta a estrés hídrico moderado.
3. Al restablecerse las condiciones hídricas favorables -período de recuperación post-estrés- los parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos alcanzan valores similares a aquellos registrados para plántulas crecidas bajo condiciones óptimas de humedad.

Objetivo General

- ❖ Evaluar la respuesta de plántulas de girasol de la línea endocriada *B71* (*tolerante a estrés hídrico*) a través del análisis de parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos durante un breve período de estrés y luego de la recuperación post-estrés.

Objetivos Específicos

- I. Medir parámetros morfológicos en plántulas crecidas bajo condiciones óptimas de humedad, sometidas a tratamiento de estrés hídrico moderado y luego del período de recuperación post-estrés.
- II. Evaluar parámetros fisiológicos y bioquímicos en plántulas crecidas en condiciones óptimas de humedad, sometidas a tratamiento de estrés hídrico moderado y luego del período de recuperación post-estrés.
- III. Analizar la respuesta de las plántulas al restituirse las condiciones hídricas adecuadas luego del estrés (período de recuperación post-estrés) y correlacionar dicha respuesta con la sensibilidad de la línea en estudio.

MATERIALES Y MÉTODO

Material vegetal

Para la realización de los ensayos programados se utilizaron semillas de girasol de la línea tolerante *B71*, provistas por EEA-INTA Manfredi (Córdoba).

1. Ensayo de germinación

Cien semillas, desinfectadas con hipoclorito de sodio 3%, se sembraron en bandejas conteniendo como soporte toallas de papel humedecidas a saturación con agua destilada. Las bandejas fueron cubiertas con bolsas de nylon a fin de lograr una adecuada presión de vapor ambiental cercana a saturación y se colocaron a germinar en Cuartos Ambientales Conviron PR48 programados con 8 h de oscuridad a 18 °C y 90% de HR y 16 h de luz ($130 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) a 28 °C y 80% de HR, por el término de 48 h. Se cosechó el 50% de semillas germinadas que poseían una longitud radical dentro del rango ($\bar{X} \pm \delta$). Como criterio de germinación se consideró la profusión de la radícula a través de las cubiertas de la semilla (testa y clamidocarpo). El ensayo se realizó por quintuplicado.

2. Ensayo de crecimiento temprano y tratamiento de estrés hídrico

Las cincuenta semillas seleccionadas se transplantaron a bandejas conteniendo arena fina como sustrato. El contenido hídrico al momento de la siembra fue de 60% de la capacidad de campo. Cada bandeja se dispuso dentro de una bolsa de nylon abierta en la parte superior a fin de mantener cierta humedad ambiental (no saturación). Las mismas se mantuvieron en los Cuartos Ambientales arriba mencionados durante 18 días, período en el cual se visualizó en las plántulas estresadas una significativa reducción en la longitud aérea, sumado a síntomas visuales de marchitamiento. A los 4 días del transplante (6 días de edad de las plántulas), y posteriormente cada tres días hasta la finalización del experimento, las plántulas fueron regadas mediante ascenso capilar empleando soluciones que generaron dos de las *condiciones* evaluadas: 1- Hoagland 50% de fuerza iónica (control); 2- Manitol 400 mM (agente de estrés hídrico moderado).

3. Ensayo de recuperación post-estrés

Luego de 5 días de riego con manitol las plántulas se colocaron en condiciones óptimas de crecimiento (riego con Hoagland 50% de fuerza iónica) durante 3, 5 y 8 días (“período de rehidratación”) hasta el final del experimento para evaluar la recuperación posterior al estrés.

4. Evaluación de parámetros morfo-fisiológicos

Quince plántulas de cada condición (controles, estresadas y rehidratadas) fueron seleccionadas para el análisis de los distintos parámetros morfofisiológicos; los mismos fueron evaluados a los 18 días (final del experimento), y a los 3, 5 y 8 días del período de recuperación post-estrés.

El peso fresco (PF) y peso seco (PS) fueron registrados en parte aérea y radical. Para la obtención del PS las muestras fueron secadas en estufa a 70 °C hasta alcanzar un valor de peso seco constante.

La tasa de aparición de hojas se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de aparición de hojas: } 1/\text{Filocrono}$$

Donde el *filocrono* fue estimado a partir del tiempo térmico entre la aparición de dos hojas consecutivas utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Tiempo térmico (°Cd): } \sum [(T_{max} + T_{min})/2 - T_B]$$

T_{max} = temperatura máxima diaria, T_{min} = temperatura mínima diaria, y T_B = temperatura base de 6 °C. Los datos se expresaron como número de hojas / día.

La determinación del área foliar se realizó según la ecuación de Schneiter (1978). A tal fin se midió la longitud (distancia comprendida entre el vértice de la hoja hasta la base de la lámina) y el ancho (porción más ancha de la hoja en ángulo recto a la medición de longitud) de cada hoja del primer par.

El contenido relativo de agua (CRA) se estimó según Turner (1981) de acuerdo a la ecuación:

$$\text{CRA (\%): } [(PF-PS) / (PT-PS)] \times 100$$

donde PF (peso fresco), PT (peso turgente), el cual se obtuvo luego de la inmersión de discos de hoja en agua destilada dentro de placas de Petri por el término de 24 h en oscuridad a temperatura ambiente, y PS (peso seco) estimado luego de secar los discos de hoja en estufa a 70°C hasta alcanzar un peso seco constante. Los discos de hojas se obtuvieron de la sección media de cualquiera de las plántulas con el fin de minimizar los efectos de la edad. El ensayo se realizó por quintuplicado.

Para la evaluación del potencial osmótico (Ψ_o), 300 mg de PF de hojas y raíces se colocaron en tubos Falcon de 50 ml y se congelaron a -80°C durante 24 h. Posteriormente se descongelaron a 100°C durante 10 min. Se centrifugaron a 8000 rpm por 30 min, se recogió el sobrenadante en Eppendorf de 2 ml y se centrifugó durante 1 min. Se tomaron alícuotas de 150 μ l para medir el potencial osmótico con un osmómetro de punto de congelación (Semi Micro K-7400; Knauer, Berlín, Alemania). El potencial osmótico se expresó mediante la relación $\Psi_o: C \times R \times T$; donde C: osmolalidad, T: temperatura absoluta y R: constante de los gases (0,00831 MPa/Osmol/K) (Sayar *et al.*, 2008).

5. Evaluación de parámetros bioquímicos

Los parámetros bioquímicos se registraron a los 18 días de la siembra en arena (final del experimento), y a los 3, 5 y 8 días del período de recuperación post-estrés.

5.1. Determinación del contenido de prolina

Se realizó según protocolo de Bates (1973). Para ello, 0.5 g de PF de parte aérea y radical se trituró en mortero con N₂ líquido y 2 ml de agua destilada (solvente de extracción). Los extractos se transfirieron a Eppendorf de 1.5 ml y se incubaron a 95 °C durante 30 min. Luego se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. Se recogió 500 μ l del sobrenadante y se agregaron 500 μ l de citrato de sodio (0.2 M, pH 4.6) y 2 ml del reactivo de ninhidrina (60:40%, acético:agua). Luego de 60 min las muestras se transfirieron a un baño de hielo. Posteriormente, se añadieron 2 ml de tolueno, se agitó vigorosamente y se separaron las fases acuosa y orgánica mediante centrifugación a 3000 rpm por 10 min. Finalmente, se extrajo la fase orgánica y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 520 nm. La experiencia se realizó por cuadruplicado.

5.2 Determinación del contenido de glicin-betaína

Se realizó según protocolo de Greive y Grattan (1983). Para ello, 0.5 g de PF de parte aérea y radical se homogeneizó con 3 ml de agua destilada. Las muestras se filtraron y diluyeron (1/1) con H₂SO₄ 2 N. Se alicuotó 1 ml en Eppendorf y se adicionó 0.4 ml del reactivo KI-I₂ frío. Las muestras se almacenaron a 4 °C durante 16 h y luego se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min. Se recogió el sobrenadante, se disolvieron los cristales de yoduro en 9 ml de 1,2 dicloroetano (1,2 DCE) y se mezcló vigorosamente. Se dejó reposar durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 365 nm.

5.3 Determinación de clorofilas a y b

100 mg de PF de hojas se trituroó con N₂ líquido y homogeneizó con 10 ml de acetona 80%, se transvasó a tubo Falcon y posteriormente se mantuvo durante 1 h a 4 °C. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 650 y 665 nm (clorofila *a* y *b*, respectivamente).

5.4 Determinación de carotenoides

Se transvasó el volumen total de la extracción anterior a otro tubo Falcon. Se adicionó 5 ml de NaOH 1M y agitó para permitir la saponificación de la muestra. Posteriormente, se particionó con 15 ml de éter etílico, agitó 1 min y se dejó reposar para permitir la decantación. Se recogió la fase orgánica (etérea) y se descartó la fase acuosa (acetona). Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 450 nm.

Las fórmulas de Vernon (1960) y McKinney (1941) se aplicaron para calcular la concentración de clorofilas y carotenoides.

6. Reproducibilidad de las determinaciones

Se utilizó un diseño experimental totalmente aleatorizado con 2 ensayos independientes (réplicas biológicas) y 4 réplicas técnicas por cada condición ensayada: humedad óptima, estrés hídrico moderado y recuperación post-estrés.

7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante Análisis de la Varianza de una vía (ANNOVA) a fin de determinar diferencias significativas entre medias de los parámetros

evaluados. Se empleó a posteriori un test de Rangos Múltiples (LSD de Fisher; $p < 0.05$). El software empleado fue Statgraphics Plus, versión 3, Manugistics 1997.

RESULTADOS

Evaluación de parámetros morfo-fisiológicos

En respuesta al estrés hídrico y durante el período de rehidratación, el CRA foliar disminuyó significativamente respecto a la condición control. La reducción en este parámetro fisiológico en plántulas tratadas con manitol indicó que las mismas efectivamente se encontraban estresadas. Notablemente, no se observó modificación en este parámetro a lo largo del tiempo de rehidratación (Fig. 2).

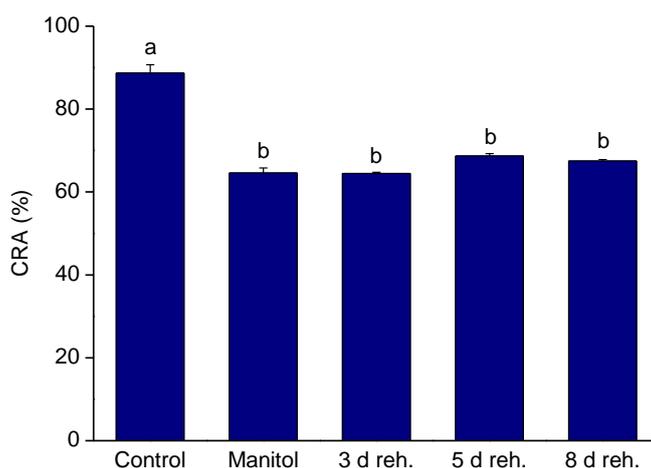


Fig. 2. Contenido relativo de agua (CRA) en hojas de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=5 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

El potencial osmótico registró el menor valor en hojas de plántulas estresadas, siendo tres veces inferior respecto a la condición control. Durante el período de rehidratación se registró un incremento del potencial osmótico, alcanzando a los 8 días valores similares a los de las plántulas controles (Fig. 3).

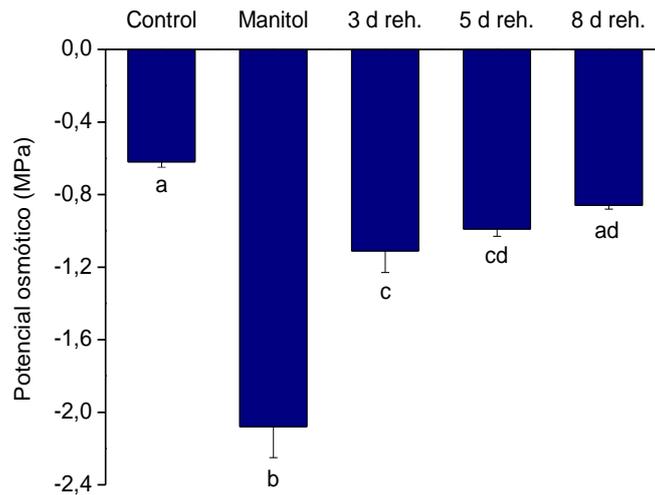


Fig. 3. Potencial osmótico en hojas de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=4 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Contrariamente, el potencial osmótico de raíces no se modificó por efecto de ninguna de las condiciones ensayadas (control, estrés hídrico moderado y período de rehidratación) (Fig. 4).

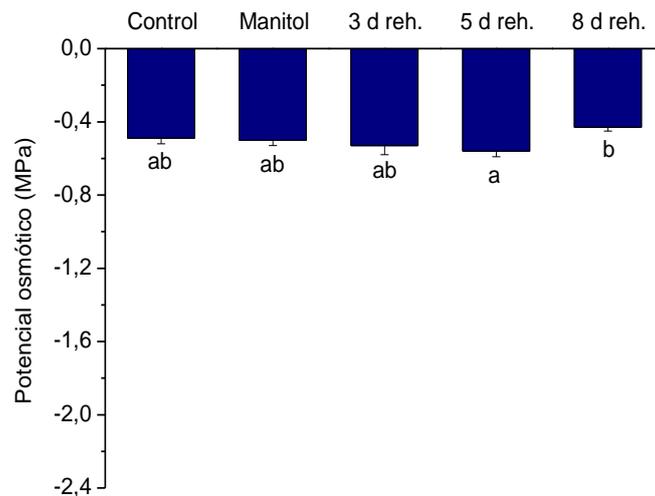


Fig. 4. Potencial osmótico en raíces de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=4 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Bajo estrés hídrico se observó una disminución significativa de cinco veces en el peso fresco relativo (PFR) de la parte aérea. A los 8 días de rehidratación este parámetro no fue modificado sustancialmente en relación a la condición de estrés. Por otra parte, durante el período de rehidratación las plántulas no recuperaron el PFR respecto al valor registrado para las controles en ninguna de las condiciones ensayadas (Fig. 5).

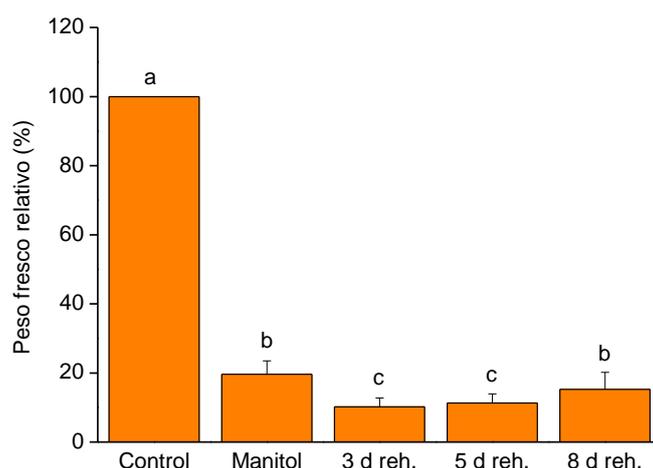


Fig. 5. Peso fresco relativo de parte aérea de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=4 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Respecto al PFR radical, una reducción significativa se registró en respuesta a la condición de estrés hídrico moderado. Luego de 8 días de rehidratación, este parámetro alcanzó el mismo valor que el observado para raíces estresadas (Fig. 6). Al comparar el PFR de parte aérea y radical se deduce que la raíz fue el órgano menos afectado tanto bajo condiciones de estrés hídrico como durante el período de rehidratación.

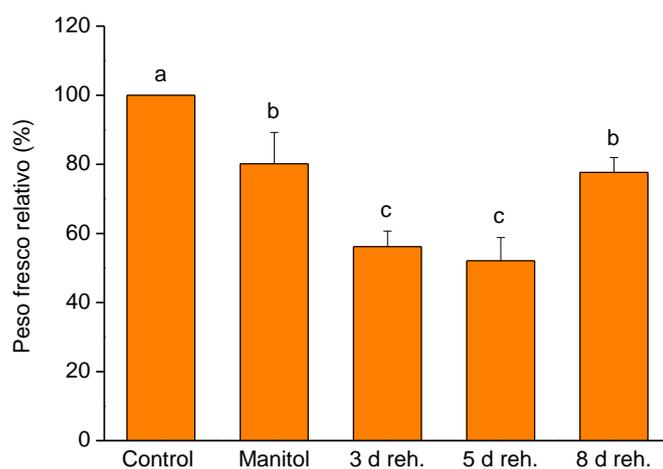


Fig. 6. Peso fresco relativo de raíces de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=4 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

El peso seco (PS) de la parte aérea disminuyó considerablemente (cuatro veces) bajo estrés hídrico. Por el contrario, durante el período de rehidratación las plántulas no mostraron una adecuada recuperación, ya que no alcanzaron los valores obtenidos para las controles (Fig. 7).

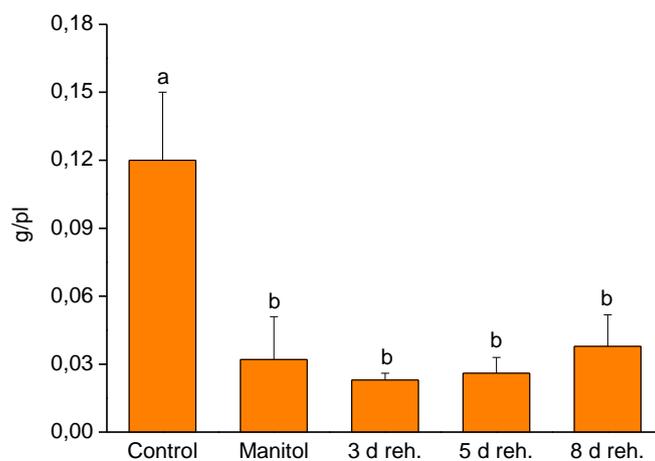


Fig. 7. Peso seco de parte aérea de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=4 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Por el contrario, el PS radical no varió por efecto del estrés hídrico. De modo similar, durante el transcurso de la rehidratación permaneció prácticamente inalterable (Fig. 8).

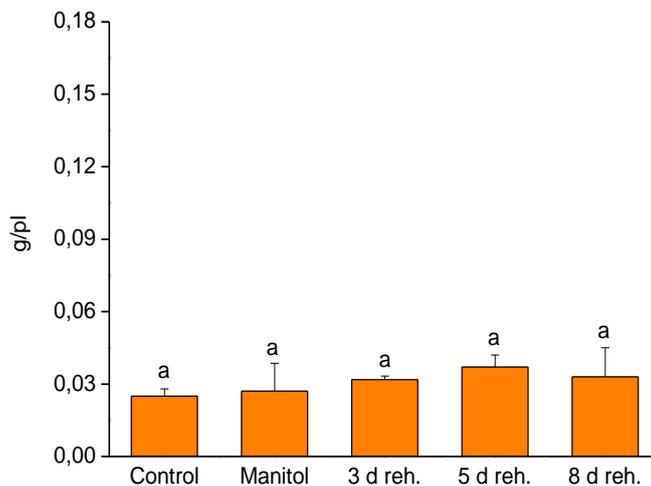


Fig. 8. Peso seco de raíces de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=4 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

La Fig. 9 muestra la relación entre PS radical vs PS de parte aérea. Un incremento significativo de 2,8 veces fue observado en plántulas estresadas respecto a las controles. Durante el período de rehidratación no se registraron diferencias significativas en comparación con el tratamiento de estrés hídrico. No obstante, a partir de los 3 días de rehidratación este parámetro se recuperó, superando incluso a los valores de las plántulas controles (Fig. 9).

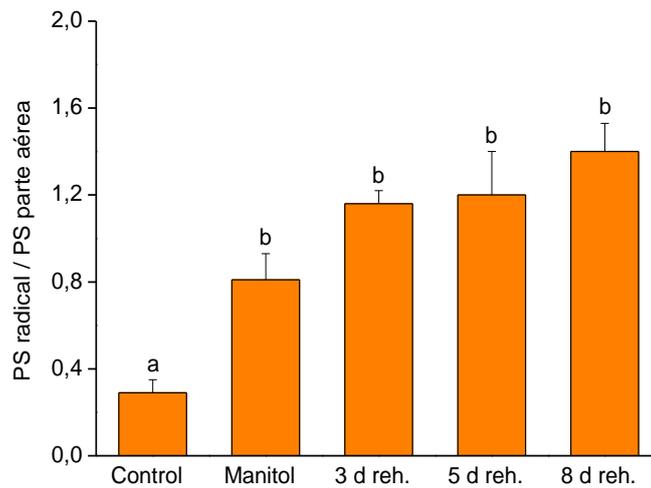


Fig. 9. Relación PS radical / PS de parte aérea de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=4 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Una leve disminución -no significativa- en la tasa de aparición de hojas, se detectó cuando las plántulas fueron tratadas con manitol. A partir del tercer día de rehidratación un gradual incremento fue registrado, recuperando a los 8 días valores similares a los de las plántulas controles (Fig. 10).

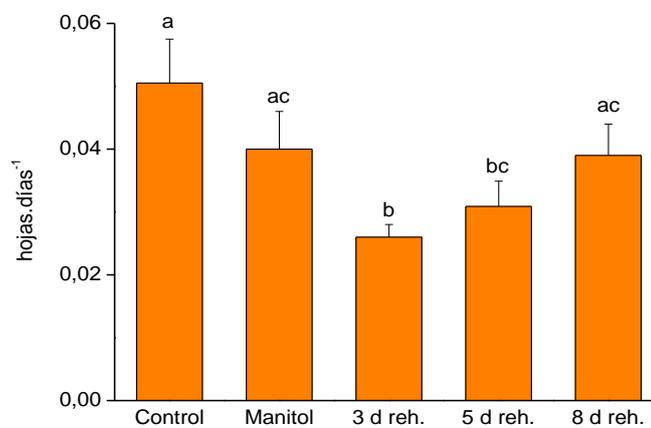


Fig. 10. Tasa de aparición de hojas de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=4 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

El área foliar mostró una reducción significativa (~ 60%) en plántulas sometidas a tratamiento de estrés hídrico moderado. Por el contrario, no se observaron cambios entre la condición de estrés y el período de rehidratación; este hecho pone de manifiesto que este parámetro no logró recuperarse luego del estrés impuesto (Fig. 11).

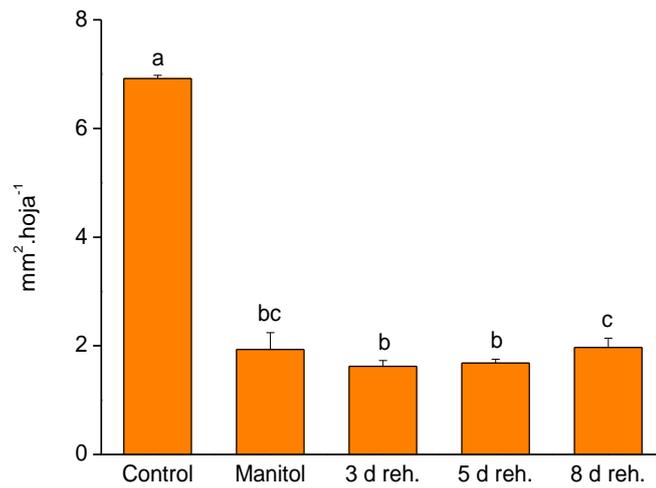


Fig. 11. Área foliar de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=4 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Evaluación de parámetros bioquímicos

En respuesta a estrés hídrico moderado, tanto la parte aérea (1,47 veces) como radical (1,36 veces) presentaron un incremento en el contenido de prolina (Figs. 12 y 13). En parte aérea, este osmoprotector disminuyó entre los 3 y 5 días de rehidratación; no obstante, a los 8 días recuperó el contenido cuantificado en las plántulas controles (Fig. 12).

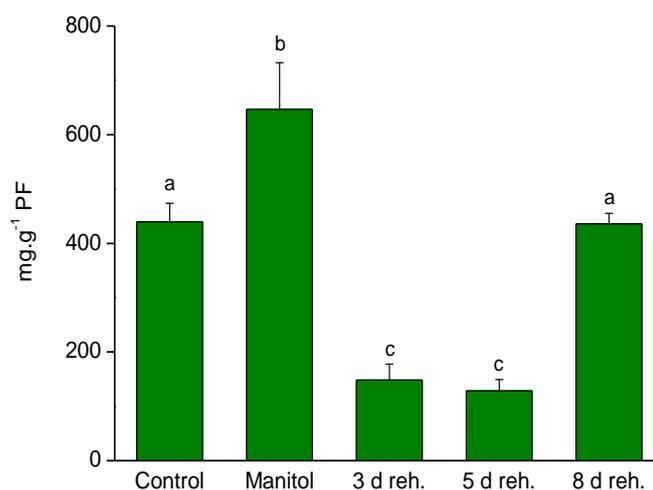


Fig. 12. Contenido de prolina en parte aérea de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=4 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Similarmente, en parte radical una reducción en el contenido de prolina fue registrada a partir del tercer día de rehidratación, recuperando aproximadamente los valores de las plántulas controles a los 8 días (Fig. 13).

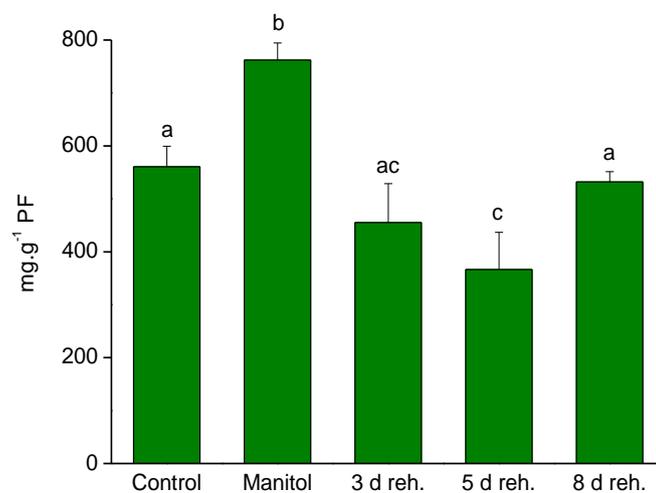


Fig. 13. Contenido de prolina en parte radical de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=4 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

En parte aérea, el tratamiento de estrés hídrico ocasionó una disminución significativa (~75%) sobre el contenido de glicin-betaína. Al finalizar el período de rehidratación este parámetro alcanzó valores similares a los de las plántulas controles (Fig. 14).

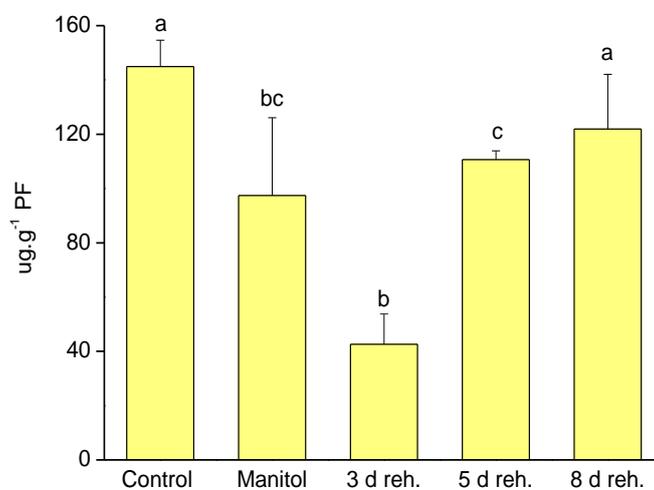


Fig. 14. Contenido de glicin-betaína en parte aérea de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=4 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

En parte radical, el contenido de glicin-betaína mostró una drástica reducción (3,2 veces) en respuesta al tratamiento con manitol. Durante el período de rehidratación se observó una leve y gradual recuperación, aunque ésta no fue suficiente para alcanzar el contenido registrado en las plántulas controles (Fig. 15).

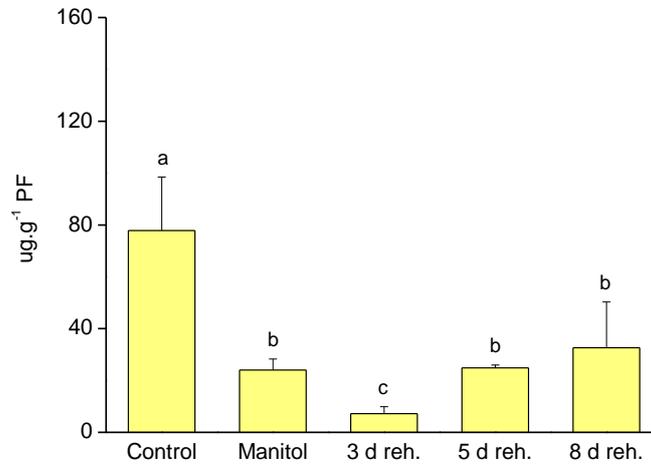


Fig. 15. Contenido de glicin-betaína en parte radical de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=4 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Un menor contenido de clorofilas a y b y carotenoides se registró bajo estrés hídrico en comparación con la condición control. Durante el transcurso del tiempo de rehidratación, el contenido de estos pigmentos logró recuperarse, alcanzando valores similares a los registrados para la condición control (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de las diferentes condiciones sobre el contenido de clorofilas y carotenoides ($n=4 \pm SE$); $P < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Condición	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides
Control	163,1 \pm 3 a	89,7 \pm 5,8 ac	793,3 \pm 94 a
Manitol	76 \pm 3,4 b	51,8 \pm 14,2 b	655 \pm 55 a
3 d reh.	135,5 \pm 9,8 a	104,2 \pm 24,4 a	703,3 \pm 147,1 a
5 d reh.	111,7 \pm 6,9 ab	69,8 \pm 8,4 bc	576,7 \pm 41,8 a
8 d reh.	136,9 \pm 26,9 a	87,7 \pm 4,9 ac	740 \pm 20 a

DISCUSIÓN

El estrés hídrico es un importante tipo de estrés abiótico que condiciona severamente el crecimiento y rendimiento de los cultivos. Las respuestas de las plantas a este efector difieren significativamente entre los distintos niveles de organización en función de la intensidad y duración del estrés, así como también según la especie vegetal y su fase de crecimiento (Chaves *et al.*, 2003; Jaleel *et al.*, 2008). En los últimos años, en Argentina el área de siembra de girasol se ha extendido hacia zonas más secas (oeste del país), además de ser tradicionalmente cultivado en áreas de mayor humedad (por ej., sudeste de la pcia. de Buenos Aires). Aún en estas zonas, donde las precipitaciones son abundantes, es frecuente la ocurrencia de períodos de déficit hídrico moderado que afectan distintos momentos del ciclo del cultivo.

En este estudio, plántulas de girasol de la línea endocriada B71 (tolerante a estrés hídrico) presentaron modificaciones en diferentes parámetros morfofisiológicos luego de ser sometidas a un breve período de estrés hídrico durante el crecimiento temprano. En tal sentido, es bien conocido que la sequía afecta directamente el crecimiento y la productividad de las plantas mediante la alteración de su estado hídrico. Entre los parámetros que permiten caracterizar el estado hídrico de las plantas el contenido relativo de agua es utilizado con éxito para identificar resistencia a sequía tanto en girasol como en otras especies. En este trabajo, el riego con manitol por el término de 14 días generó un estrés hídrico moderado en las plántulas B71, lo cual provocó una disminución en su contenido relativo de agua. Este resultado coincide con informes de Angadi y Entz (2002) y Ghobadi *et al.* (2013) en híbridos enanos y cultivares de polinización abierta de girasol. Por otra parte, la drástica reducción del potencial osmótico de parte aérea en respuesta al estrés hídrico indica la capacidad de las hojas de mantener la turgencia celular mediante un adecuado ajuste osmótico. Diversas investigaciones señalan que el ajuste osmótico se asocia con la tolerancia a sequía en diversos cultivos, incluyendo girasol (Chimenti *et al.*, 2002). Además, Ashraf y Foolad (2007) informaron que un potencial osmótico menor se correlaciona con la acumulación de solutos en muchas especies vegetales en respuesta a estrés, y esta acumulación es mayor en plantas tolerantes comparado con plantas sensibles; tal como parece ocurrir con el contenido de prolina en parte aérea y radical de las plántulas B71 en respuesta a estrés hídrico moderado (manitol 400 mM). Además, la recuperación del potencial osmótico a valores similares a los de la condición control a los 8 días de rehidratación podría relacionarse con el contenido de prolina detectado en este tiempo.

Varios parámetros morfológicos fueron alterados por el estrés hídrico en la línea B71. Frecuentemente el déficit hídrico ocasiona una reducción en la producción de biomasa fresca y seca de plantas cultivadas (Faroq *et al.*, 2009). En este sentido, una disminución en la producción de biomasa ocasionada por la sequía fue observada en diversos genotipos de girasol. Sin embargo, algunos genotipos mostraron una mejor tolerancia a este estrés (Tahir y Mehid, 2001). En el presente estudio, el estrés hídrico moderado afectó negativamente el peso fresco relativo de la parte aérea. De modo similar, numerosas investigaciones reportaron reducción en el peso fresco de distintas especies sometidas a déficit hídrico; por ejemplo, trigo (Rane *et al.*, 2001), mijo perla (Kusaka *et al.*, 2005), *Abelmoschus esculentus* (Bhatt y Srinivasa Rao, 2005) y cinco variedades de girasol (Manivannan *et al.*, 2007). Asimismo, en nuestras condiciones experimentales el estrés hídrico afectó en mayor medida el peso seco de la parte aérea respecto al peso seco radical. En coincidencia, un estudio realizado en remolacha azucarera demostró que el estrés hídrico moderado afectó en mayor proporción el peso seco de la parte aérea (Mohammadian *et al.*, 2005). Por otro lado, el tiempo de rehidratación considerado pareció no ser suficiente para recuperar el peso seco de la parte aérea a los valores registrados en la condición control. Por el contrario, el ligero aumento en el peso seco radical a los 8 días de rehidratación podría permitir la maximización de la absorción de agua debido a la mayor capacidad exploratoria del sistema radical (Tahir *et al.*, 2002; Verslues *et al.*, 2006). De este modo, el aumento del peso seco radical conduciría a un incremento en la relación peso seco parte radical / peso seco parte aérea. En tal sentido, una mayor relación peso seco radical / peso seco aéreo se informó en plántulas de maíz (Ma *et al.*, 2010) y en tres variedades de sorgo bajo estrés hídrico (Munamava y Riddoch, 2001).

Un óptimo desarrollo del área foliar es importante para la fotosíntesis y la producción de materia seca. En la línea bajo estudio, el área foliar fue reducida considerablemente por el estrés hídrico impuesto; esto podría representar una estrategia de la planta para reducir el área transpiratoria influyendo así en su actividad fotosintética. Similarmente, el déficit hídrico redujo el crecimiento foliar en numerosas especies tales como *Populus* (Wullschleger *et al.*, 2005), soja (Zhang *et al.*, 2004) y otras (Farooq *et al.*, 2009).

En este trabajo, la tasa de aparición de hojas no fue un parámetro morfológico afectado por el tratamiento de estrés hídrico moderado. Por el contrario, en híbridos de girasol ha sido reportado que el estrés hídrico severo redujo aproximadamente en un 30% la tasa de aparición de hojas comparado con la condición de óptima irrigación (Gholinezhad *et al.*, 2012). Cambios cualitativos y cuantitativos en la composición de pigmentos fotosintéticos se producen en respuesta al estrés hídrico, y esto depende de la especie particular considerada (Reddy *et al.*, 1992; Oukarroum *et al.*, 2009). En las plántulas B71, sometidas a estrés hídrico moderado,

la reducción en el contenido de clorofilas estuvo fuertemente afectada por el área foliar. En concordancia, ante un déficit hídrico severo el contenido de clorofilas disminuyó significativamente en plantas de girasol (Kiani *et al.*, 2008) y en *Vaccinium myrtillus* (Tahkokorpi *et al.*, 2007). Un alto contenido de carotenoides fue reportado como otra de las respuestas comúnmente observadas frente a diferentes situaciones de estrés abiótico (Foyer y Harbinson, 1994; Peñuelas y Munné-Bosh, 2005). Tales compuestos desempeñan un rol clave en el sistema antioxidante de la planta (Jaleel *et al.*, 2009). El alto contenido de carotenoides detectado en plántulas control sugiere que la línea B71 podría estar preparada para enfrentar adecuadamente condiciones de estrés tales como déficit hídrico o estrés oxidativo. La rehidratación post-estrés por 8 días fue suficiente para que el contenido de pigmentos recuperara los valores registrados para la condición control.

Diversos compuestos poseen una función principal como agentes osmoprotectores que contribuyen en el ajuste osmótico, entre ellos aminos cuaternarios, aminoácidos o azúcares alcohol (Cherian *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha propuesto una posible relación causal entre grado de tolerancia a sequía y acumulación diferencial de prolina y glicin-betaína entre genotipos (Yang *et al.*, 2003). La prolina juega diversos roles bajo condiciones de estrés hídrico, participando así en la estabilización de proteínas, membranas y estructuras subcelulares, y en la protección de las funciones celulares a través del barrido de especies reactivas de oxígeno (Kavi Kishor *et al.*, 2005; Nikolaeva *et al.*, 2010). Por lo tanto, este compuesto es importante para el mantenimiento de ajuste osmótico y la adaptación al estrés (Ozturk y Demir, 2002). Nuestros resultados demostraron que bajo estrés hídrico moderado, el contenido de prolina de parte aérea y radical aumentó, lo cual contribuyó al ajuste osmótico disminuyendo el potencial osmótico. Notablemente, su contenido en parte radical recuperó el valor de las plántulas controles a los 3 días de rehidratación, mostrando así una respuesta rápida cuando el estrés fue suprimido.

Asimismo, la producción de glicin-betaína es abundante en respuesta a estrés hídrico (Mohanty *et al.*, 2002; Ashraf y Foolad, 2007). Este compuesto se sintetiza en cloroplastos (Rhodes y Hanson, 1993), y luego se transporta a otros órganos de la planta (Mäkelä *et al.*, 1998). En el presente trabajo, el hecho de que el estrés hídrico afectara negativamente el contenido de glicin-betaína en parte aérea, nos lleva a proponer que este compuesto no actúa como el principal osmoregulador en plántulas de la línea tolerante B71.

El contenido más elevado de prolina y el más bajo de glicin-betaína cuantificado en plántulas de la línea B71 coincide con la declaración de que "las especies que se comportan como acumuladoras de prolina contienen bajos niveles de GB, y viceversa" (Tipirdamaz *et al.*, 2006).

Conjuntamente, nuestros resultados demuestran que la línea en estudio posee características morfo-fisiológicas y bioquímicas adaptativas a la condición estresante impuesta,

lo cual generaría la posibilidad de producir híbridos de girasol a partir de su empleo como línea tolerante parental. Este hecho podría mejorar el establecimiento de las plántulas en condiciones agroecológicas marginales con incidencia de períodos de estrés hídrico frecuentes.

CONCLUSIONES

- Las plántulas de girasol de la línea endocriada tolerante B71 mostraron una respuesta morfo-fisiológica y bioquímica diferente de aquellas crecidas en condiciones óptimas de humedad luego de ser sometidas a un breve período de estrés hídrico moderado.
- El crecimiento diferencial ocasionado por la condición de estrés se evidenció a través de la modificación de ciertos parámetros morfológicos, tales como área foliar y biomasa fresca y seca de parte aérea.
- El estrés hídrico moderado generado por la aplicación de manitol 400 mM también condujo a la alteración de parámetros fisiológicos y bioquímicos; entre ellos, el contenido relativo de agua, el potencial osmótico -asociado con un alto contenido de prolina- y las clorofilas (a y b).
- Durante el transcurso del período de rehidratación considerado en este estudio (3, 5 y 8 días), sólo algunos de los distintos parámetros evaluados lograron recuperar sus valores luego de la condición estresante. Este hecho fue evidente principalmente en los parámetros bioquímicos y fisiológicos (por ejemplo, en el contenido de prolina, glicín-betaína de parte aérea y potencial osmótico). Por el contrario, en general, la mayoría de los parámetros morfológicos no se recuperaron posterior al tratamiento de estrés.
- La línea en estudio (B71) posee características morfo-fisiológicas y bioquímicas adaptativas a la condición estresante impuesta, lo cual generaría la posibilidad de producir híbridos de girasol a partir de su empleo como línea tolerante parental.

BIBLIOGRAFÍA

Agele, S.O. 2003. Sunflower responses to weather variations in rainy and dry, cropping seasons in a tropical rainforest zone. *Int. J. Biot.* 32: 17-33.

Albuquerque, F.M.C. de y N.M. de Carvalho. 2003. Effect of type of environmental stress on the emergence of sunflower (*Helianthus annuus* L.), soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) and maize (*Zea mays* L.) seeds with different levels of vigor. *Seed. Sci. Technol.* 31: 465-467.

Angadi, S.V. y M.H. Entz. 2002. Root system and water use patterns of different height sunflower cultivars. *Agron. J.* 94: 136-145.

ASAGIR. 2008. El girasol – Historia en la Argentina. En: www.asagir.org.ar/asagir2008/historia.asp. Consultado: 21-03-2015.

Ashraf, M. y M.R. Foolad. 2007. Roles of Glycine Betaine and Proline in Improving Plant Abiotic Stress Resistance. *Environ. Exper. Bot.* 59: 206-216.

Badr, N.M., A.T. Thalooth y M.H. Mohamed. 2004. Effect of foliar spraying with the nutrient compound “Streen” on the growth and yield of sunflower plants subjected to water stress during various stages of growth. *Bull. Nat. Res. Centre Cairo* 29: 427-439.

Baldini, M. y G. P. Vannozzi. 1998. Agronomic and physiological assessment of genotypic variation for drought resistance in sunflower genotypes obtained from cross between *H. annuus* and *H. argophyllus*. *Agric. Medit.* 128, 232–240.

Bates, L., R.P. Waldren, y I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.

Begg, J.E. y N.C. Turner. 1976. Crop water deficits. *Adv. Agron.* 28: 161-217.

Bhatt, R.M. y N.K. Srinivasa Rao. 2005. Influence of pod load response of okra to water stress. *Indian J. Plant Physi.* 10: 54-59.

Chaves, M.M., J.P. Maroco y J.S. Pereira. 2003. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plants. *Funct. Plant. Biol.* 30: 239-264.

Cherian, S., M. Reddy y R. Ferreira. 2006. Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance: Progress and future prospects. *Biol. Plantarum* 50: 481-495.

Chimenti, C.A., J. Pearson y A.J. Hall. 2002. Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. *Field Crop Res.* 75: 235-246.

Dardanelli, J., D. Collino, M.E. Otegui y V.O. Sadras. 2003. Bases funcionales para el manejo del agua en los sistemas de producción de los cultivos de granos. En: Producción de granos, bases funcionales para su manejo. 1° ed. Cap. 16. p: 377-406.

Farooq, M., A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita y S.M.A. Basra. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* 29: 185-212.

Foyer, C.H. y J. Harbinson. 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. En: *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. Foyer C.H. y P.M. Mullineaux, Eds., CRC Press, Boca Raton. p: 1-42.

FyO. 2014. Mercado mundial de granos – Girasol. En: www.fyo.com/informe/todos-creceran-en-el-mercado-mundial-de-girasol-excepto-argentina. Consultado: 03-04-2015.

FyO. 2015. Estado de cultivos en Argentina – Cosecha de girasol. En: www.fyo.com/noticia/148676/finalizo-cosecha-girasol. Consultado: 16-04-2015.

Germ, M., O.U. Berčič y D.K. Ačko. 2005. The response of sunflower to acute disturbance in water availability. *Acta Agric. Slov.* 85: 135-141.

Ghobadi, M., S. Taherabadia, M.E. Ghobadi, G. R. Mohammadia y S. Jalali-Honarmanda. 2013. Antioxidant capacity, photosynthetic characteristics and water relations of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars in response to drought stress. *Ind. Crops Prod.* 50: 29-38.

Gholinezhad, E., A. Aynaband, A.H. Ghorthapeh, G. Noormohamadi y I. Bernousi. 2012. Effect of drought stress on grain yield, quality traits, phyllochron and leaf appearance rate of sunflower hybrid *Iroflor* at different levels of nitrogen and plant population. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 12: 306-314.

Greive, C.M. y S. R. Grattan. 1983. Rapid assay for determination of water-soluble quaternary amino compounds. *Plant Soil* 70: 303-307.

InfoAgro. 2015a. El cultivo de girasol – Aprovechamientos. En: www.infoagro.com/herbaceos/oleaginosas/girasol3.htm. Consultado: 12-04-2015.

InfoAgro. 2015b. El cultivo de girasol – Botánica. En: www.infoagro.com/herbaceos/oleaginosas/girasol.htm. Consultado: 09-04-2015.

INTAGRO. 2015. Zonas de cultivo – Girasol en Argentina. En: www.intagro.com/mapas/arg_gira.asp. Consultado: 08-05-2015.

Jaleel, C.A., Gopi R. y R. Panneerselvam. 2008. Growth and photosynthetic pigments responses of two varieties of *Catharanthus roseus* to triadimefon treatment. *C. R. Biol.* 331: 272-277.

Jaleel, C.A., P. Manivannan, A. Wahid, M. Farooq, H.J. Al-Juburi, R. Somasundaram y R. Panneerselvam. 2009. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agr. Biol.* 11: 100-105.

Kang, S.Z. y J.H. Zhang. 1997. Hydraulic conductivities in soil-root system and relative importance at different soil water potential and temperature. *Transactions of CSAE* 13: 76-81.

Kavi Kishor, P.B., S. Sangam, R.N. Amrutha, P.S. Laxmi, K.R. Naidu, K.R.S.S: Rao, S. Rao, K.J. Reddy, P. Theriappan y N. Sreenivasulu. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.* 88: 424-438.

Kiani, S.P., P. Maury, A. Sarrafi y P. Grieu. 2008. QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. *Plant Sci.* 175: 565-573.

Kusaka, M., M. Ohta y T. Fujimura. 2005. Contribution of inorganic components to osmotic adjustment and leaf folding for drought tolerance in pearl millet. *Physiol. Plant.* 125: 474-489.

- Ma, X.F., T. Yu, L.H. Wang, X. Shi, L.X. Zheng, M.X. Wang, Y.Q. Yao y H.J. Cai. 2010. Effects of water deficit at seedling stage on maize root development and anatomical structure. *J. Appl. Ecol. (Chine)*. 21: 1731-1736.
- Mahajan, S. y N. Tuteja. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444: 139-158.
- Mäkelä, P., K. Jokinen, M. Kontturi, P. Peltonen-Sainio, E. Pehu y S. Somersalo. 1998. Foliar application of glycinebetaine-a novel product from sugar beet-as an approach to increase tomato yield. *Ind. Crops Prod.* 7: 139-148.
- Manivannan, P., C.A. Jaleel, B. Sankar, A. Kishorekumar, R. Somasundaram, G.M. Alagu Lakshmanan y R. Panneerselvam. 2007. Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids Surf. B.* 59: 141-149.
- Manugistics. 1997. Statgraphics plus for Windows 3.0. Manugistics, Rockville, Maryland, USA.
- McKinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140: 315-322.
- Miersch, O., J. Neumerkel, M. Dippe, I. Stenzel y C. Wasternack. 2008. Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol.* 1778: 114-127.
- Mohammadian, R., M. Moghaddam, H. Rahimian y S.Y. Sadeghian. 2005. Effect of early season drought stress on growth characteristics of sugar beet genotypes. *Turk. J. Bot.* 289: 357-368.
- Mohanty, A., H. Kathuria, A. Ferjani, A. Sakamoto, P. Mohanty, N. Murata y A.K. Tyagi. 2002. Transgenics of an elite indica rice variety Pusa Basmati 1 harbouring the *codA* gene are highly tolerant to salt stress. *Theor. Appl. Genet.* 106: 51- 57.
- Munamava, M. y I. Riddoch. 2001. Response of three sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) varieties to soil moisture stress at different developmental stages. *S. Afr. J. Plant and Soil.* 18: 75-79.

National Sunflower Association, 2015. Historia del girasol. En: www.sunflowernsa.com/spanish/historia-del-girasol/. Consultado: 12-04-2015.

Nikolaeva, M.K., S.N. Maevskaya, A.G. Shugaev y N.G. Bukhov. 2010. Effect of drought on chlorophyll content and antioxidant enzyme activities in leaves of three wheat cultivars varying in productivity. *Russ. J. Plant Physl.* 57: 87-95.

Oukarroum, A., G. Schansker y R.J. Strasser. 2009. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl *a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiol. Plant.* 137: 188-199.

Ozturk, L. y Y. Demir. 2002. *In vivo* and *in vitro* protective role of proline. *Plant Growth Regul.* 38: 259-264.

Peñuelas, J. y S. Munné-Bosch. 2005. Isoprenoids: An evolutionary pool for photoprotection. *Trends Plant Sci.* 10: 166-169.

Rane, J., M. Maheshwari y S. Nagarajan. 2001. Effect of pre-anthesis water stress on growth, photosynthesis and yield of six wheat cultivars differing in drought tolerance. *Indian J. Plant Physiol.* 6: 53-60.

Rauf, S. y H.A. Sadaqat. 2007. Effect of osmotic adjustment on root length and dry matter partitioning in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under drought stress. *Acta Agricult. Scand. B.* 58: 252-260.

Reddy, R.N., P. Lyle y G. Small. 1992. Applications of spectral hole burning spectroscopies to antenna and reaction center complexes. *Photosynth. Res.* 31: 167-194.

Reddy, G.K.M., K.S. Dangi, S.S. Kumar y A.V. Reddy. 2003. Effect of moisture stress on seed yield and quality in sunflower. *Helianthus annuus* L. *J. Oilseeds Res.* 20: 282-283.

Rhodes, D. y A.D. Hanson. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. 1993. *Annu. Rev. Plant Biol.* 44: 357-384.

- Roche, J., T. Hewezi, A. Bouniols y L. Gentzbittel. 2009. Real-Time PCR monitoring of signal transduction related genes involved in water stress tolerance mechanism of sunflower. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 139-145.
- Sayar, R., Mosbahi, M., Kamelie, K. y H. Khemira. 2008. Physiological tests as predictive appreciation for drought tolerance in Durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Agron. Res.* 6: 79-90.
- Schneiter, A. A. 1978. Non-destructive leaf area estimation in sunflower. *Agron. J.* 70: 141-142.
- Shinozaki, K., K. Yamaguchi-Shinozaki y M. Seki. 2003. *Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses.* *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 410-417.
- Tahkokorpi, M., K. Taulavuori, K. Laine y E. Taulavuori. 2007. After effects of drought-related winter stress in previous and current year stems of *Vaccinium myrtillus* L. *Environ. Exp. Bot.* 61: 85-93.
- Tahir, M.H.N. y S.S. Mehid. 2001. Evaluation of open pollinated sunflower (*Helianthus annuus* L.) populations under water stress and normal conditions. *Int. J. Agr. Biol.* 3: 236-238.
- Tahir, M.H.N., Imran M. y M.K. Hussain. 2002. Evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) inbred lines for drought tolerance. *Int. J. Agr. Biol.* 3: 398-400.
- Tipirdamaz, R., D. Gagneul, C. Duhazé, A. Aínouche, C. Monnier, D. Özkum y F. Larher. 2006. Clustering of halophytes from an Inland Salt Marsh in Turkey according to their ability to accumulate sodium and nitrogenous osmolytes. *Environ. Exp. Bot.* 57: 139-153.
- Turhan, H. y I. Baser. 2004. In vitro and in vivo water stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia.* 27: 227-236.
- Turner, N. C. 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant Soil* 58: 339-366.
- Vernon, L.P. 1960. Spectrophotometric determination of chlorophylls and phaeophytins in plant extracts. *Annals Chem.* 32: 1144-1150.

Verslues, P.E., M. Agarwal, S. Katiyar-Agarwal, J. Zhu y J.K. Zhu. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* 45: 523-539.

Wullschleger S.D., T.M. Yin, S.P. DiFazio, T.J. Tschaplinski, L.E. Gunter, M.F. Davis y G.A. Tuskan. 2005. Phenotypic variation in growth and biomass distribution for two advanced-generation pedigrees of hybrid poplar. *Can. J. Forest Res.* 35: 1779-1789.

Yang, H., P. Reichert, K.C. Abbaspour y A.J.B. Zehnder. 2003. A water resources threshold and its implications for food security. *Environ. Sci. Technol.* 37: 3048-3054.

Zhang, J.Z., R.A. Creelman y J.K. Zhu. 2004. From laboratory to field: Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol.* 135: 615-621.

Zhang J., W. Jia, J. Yang y A.M. Ismail. 2006. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crop Res.* 97:111-119.