



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FISICO-QUIMICAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO EN UNA
POBLACIÓN SEGREGANTE DE GIRASOL CULTIVADO**

Mic. Cristian Sebastián Fernandez

Director: Dr. Ing. Agr. Sergio Gabriel Alemano

Río Cuarto, Mayo 2016

COMISION ASESORA

Dra. María Virginia Luna:	Universidad Nacional de Río Cuarto
Dra. Ruth Amelia Heinz:	INTA-Castelar
Dr. Jorge Omar Gieco:	Universidad Nacional del Litoral

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Universidad Nacional de Río Cuarto

Fecha: 13 de Mayo de 2016

Calificación:.....

Jurado

Firma.....

Aclaración:.....

Firma.....

Aclaración:.....

Firma.....

Aclaración:.....

AGRADECIMIENTOS

A los amores de mi vida Emilia, Amparo y Verónica, simplemente gracias!!!!

A mi Papá (ojala pudiera ver este logro, entre otros...), mamá, por su constante apoyo, valores y por estar siempre!

A la Universidad Nacional de Rio Cuarto por permitirme realizar mi formación de grado y posgrado.

Al Dr. Sergio Alemano por darme la oportunidad de trabajar en su grupo y por su ayuda y dirección en la realización de esta tesis.

A los miembros de la Comisión Asesora de Tesis, Dra. Ruth Heinz, Dr. Jorge Gieco y Dra. Virginia Luna por aceptar ser parte de esta comisión, por las sugerencias y buena predisposición.

A mi compañero de laboratorio, de tesis, amigo y demás, Maximiliano Escalante, por estar siempre en todo momento y para todo.

A mi otro compañero del laboratorio, Oscar Masciarelli, parte fundamental en la realización de este trabajo.

A Valeria Moreno y Gabriela Grandon (INTA Manfredi), Jorge Angelini por su infinita paciencia!! y su buena predisposición, gracias!

RESUMEN

El estrés hídrico tiene efectos adversos sobre procesos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares a lo largo de la ontogenia de la planta. Albuquerque y Carvalho (2003) reportaron que el estrés hídrico en girasol ocasiona irregular germinación de semillas y desincronizado establecimiento de plántulas. En este sentido, se demostró una disminución en el porcentaje de germinación tanto de cultivares como de híbridos de girasol bajo condiciones de estrés hídrico generado por PEG-6000 (Ahmad y col., 2009; Vassilevska-Ivanova y col., 2014). Asimismo, este estrés impacta negativamente sobre el rendimiento de granos y el contenido de aceite de las semillas (Ahmad y col., 2009; Fernández-Moroni y col., 2012). Respecto a los temas que comprenden la caracterización del germoplasma de girasol para condiciones de estrés hídrico, nuestro grupo de trabajo comenzó evaluando a campo y en laboratorio once líneas endocriadas crecidas bajo condiciones de estrés hídrico e irrigación. En estrés hídrico impuesto a campo se registró menor rendimiento de granos y materia grasa para las líneas B59, R419 y B67, por lo tanto fueron caracterizadas como sensibles a estrés hídrico, comparado con las líneas B71, R432 y HAR4, las cuales fueron caracterizadas como tolerantes. En ensayos de laboratorio, B59 mostró una disminución importante en el poder germinativo a 200 y 400 mM de manitol (utilizado para simular la condición de estrés hídrico); mientras que en la línea R432 se observó reducción del porcentaje de germinación sólo a 400 mM de manitol (Andrade y col., 2009). A partir de estos resultados se decidió continuar la línea de investigación empleando las líneas B59 y R432, sensible y tolerante a estrés hídrico, respectivamente.

A partir de tales líneas sensibles (B59) y tolerantes (R432) a estrés hídrico, se obtuvo la generación F_1 y luego por autofecundación se obtuvieron las líneas F_2 donde fueron evaluadas con marcadores genéticos, e integrados a los resultados de las familias $F_{2:3}$ que fueron evaluadas por su poder germinativo en condiciones de estrés hídrico en referencia al control y obtenidas las contrastantes a las cuales se le realizaron análisis de *Bulk Segregant Analysis* (BSA), en busca de polimorfismos para el carácter tolerancia a estrés hídrico.

En resumen, este trabajo plantea un abordaje integral desde estudios genéticos, de señalización que ocurre en la plántula a nivel de metabolitos con actividad hormonal y evaluación de respuestas fenotípicas para un carácter de relevancia para el cultivo de girasol, como es el estrés hídrico en las etapas tempranas del cultivo, lo cual entendemos aportará herramientas genéticas y moleculares para el mejoramiento asistido del mismo.

ABSTRACT

Water stress has adverse effects on morphological, physiological, biochemical and molecular along the ontogeny of the plant processes. Albuquerque and Carvalho (2003) reported that water stress causes irregular sunflower seed germination and seedling establishment desynchronized. In this regard, a reduction was demonstrated in the germination percentage of both cultivars as sunflower hybrids under water stress generated by PEG-6000 (Ahmad et al, 2009; Vassilevska-Ivanova et al, 2014). Also, this stress negatively impacts on grain yield and oil content seeds (Ahmad et al, 2009; Fernández-Moroni et al, 2012). On the issues comprising the sunflower germplasm characterization for water stress conditions, our working group began evaluating field and laboratory eleven inbred lines grown under conditions of water stress and irrigation. In water stress tax field lower grain yield and fat for B59, R419 and B67 lines was recorded therefore were characterized as sensitive to water stress, compared with B71, R432 and HAR4 lines, which were characterized as tolerant. In laboratory tests, B59 showed a significant decrease in germination at 200 and 400 mM mannitol (used to simulate water stress condition); while the R432 line germination percentage reduction was observed only at 400 mM mannitol (Andrade et al., 2009). From these results it was decided to continue the research using the B59 and R432 lines, sensitive and tolerant to drought, stress respectively. From such sensitive (B59) and tolerant lines (R432) to water stress, the F_1 generation was obtained and then by selfing F_2 lines which were evaluated with genetic markers, and integrated with the results of the F_2 families were obtained: 3 which were evaluated for their viability under water stress in reference to the control and obtained the contrasting to which analyzes were performed Bulk Segregant Analysis (BSA), in search of polymorphisms for the character tolerance to water stress. In summary, this paper presents a comprehensive approach from genetic studies, signaling that occurs at the seedling level metabolites with hormonal activity and evaluation of phenotypic responses to a character relevant to the sunflower crop, such as water stress in early stages of cultivation, which we understand will provide genetic and molecular assisted breeding for the same tools.

ÍNDICE

	Pág.
Comisión asesora:	I
Agradecimiento:	II
Resumen en español e inglés:	III
Índice de tablas:	V
Índice de figuras:	VI
Abreviaturas:	VII
Prologo:	7-8
Introducción:	9-39
-Sequía:	9-10
-Efecto de estrés hídrico en plantas:	10-12
-Respuestas hormonales relacionadas a estrés hídrico:	13-23
-Determinación de hormonas vegetales:	23-24
-Girasol:	24-32
-Recursos genéticos de girasol y su caracterización:	33-39
Hipótesis Propuesta:	40
Objetivo General:	41
Objetivos Específicos Propuestos:	42-43
Materiales y Métodos:	44-55
SECCIÓN A.	
Evaluación de la metodología utilizada en la determinación de hormonas vegetales.	
A.1 Material vegetal:	44
A.2 Extracción y purificación de hormonas vegetales:	44
A.2.1 Método de extracción y purificación de Durgbanshi A y col., (2005):	44

A.2.2 Método de extracción y purificación de Miersch O. y col., (2008):	45
A.2.3 Método de extracción y purificación de Luna MV y col., (1993):	45
A.3 Identificación y cuantificación de hormonas vegetales:	46
A.4 Análisis estadístico:	47

SECCIÓN B.

Caracterización fenotípica.

B.1 Evaluación fenotípica de familias $F_{2:3}$:	
B.1.1 Material vegetal:	47
B.1.1.2 Condiciones de crecimiento de líneas parentales y sus Familias $F_{2:3}$:	47
B.1.1.3 Parámetros de caracterización fenotípica de líneas parentales y sus familias $F_{2:3}$:	48
B.1.1.3.1 Evaluación del recuento final de germinación:	48
B.1.1.3.2 Evaluación de peso seco:	48
B.1.2 Evaluación de crecimiento de líneas F_6 (R432 x B59):	48
B.1.2.1 Material vegetal:	48
B.1.2.2 Condiciones de crecimiento de RILs:	49
B.1.2.3 Caracterización fenotípica de RILs:	49
B.1.3 Análisis estadísticos:	50

SECCIÓN C.

Determinaciones de hormonas vegetales.	50
C.1 Material vegetal:	50
C.2 Extracción y purificación de hormonas vegetales:	51
C.3 Identificación y cuantificación de hormonas vegetales:	51
C.4 Análisis estadístico:	51

SECCIÓN D.

Caracterización genotípica.	51
D.1 Determinación de polimorfismos de ADN a través de SSR:	52
D.1.1 Extracción de ADN:	52
D.1.2 Cuantificación del ADN:	52
D.1.3 Amplificación por PCR:	52
D.1.4 Electroforesis capilar:	53

D.2 Determinación de marcadores polimórficos en líneas parentales:	55
D.3 Análisis molecular (BSA):	55
Resultados y discusión	
SECCIÓN A.	
Evaluación de la metodología utilizada en la determinación de hormonas vegetales.	56
A.1 Determinaciones de hormonas vegetales:	59
SECCIÓN B.	
Caracterización fenotípica.	59
B.1 Evaluación fenotípica de familias $F_{2:3}$:	59
B.1.1 Evaluación del recuento final de germinación (familias $F_{2:3}$):	59
B.1.2 Evaluación de peso seco (familias $F_{2:3}$):	64
B.2 Evaluación de crecimiento de RILs F_6 :	67
SECCIÓN C.	
Determinaciones de hormonas vegetales.	
C.1 Determinaciones de hormonas vegetales en familias $F_{2:3}$:	69
C.2 Determinaciones de hormonas vegetales en RILs F_6 (R432 x B59):	80
SECCIÓN D.	
Caracterización genotípica.	
D.1 Caracterización Genotípica: Análisis:	88
ANEXO	94
Conclusiones:	96-97
Perspectivas:	97
Referencias Bibliográficas:	98-152

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		Página
1	Transiciones MRM y condiciones usadas en espectrómetro de masas (Quattro Ultima, Micromass, Manchester, Reino Unido).	57
2	ANOVA individual de progenies $F_{2:3}$ (R432 x A 59) de girasol para la variable porcentaje de germinación (Manitol 400 Mm) en relación al testigo no sometido a estrés hídrico (PGR).	58
3	Información de marcadores SSR evaluados.	90
4	Información de marcadores SSR evaluados que no resultaron polimórficos para el carácter evaluado.	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página.
1	Estructura del ácido jasmónico modificado por Schilmiller y Howe, 2005; Wasternack, 2006.	8
2	La biosíntesis de ácido jasmónico (JA) y (+)-7- <i>iso</i> -JA-L-isoleucina tiene lugar en tres diferentes compartimentos de una célula vegetal (Wasternack, 2014).	11
3	Vía de síntesis y localización de ABA (Seiler y col., 2011).	14
4	Vía de síntesis y localización de SA (Wildermuth M y col., 2001).	16
5	Estructuras del SA y sus derivados. SA: ácido salicílico; SAG: SA 2-O- -D-glucósido; SGE: Ester de glucosa SA; MeSA: metil-salicílico; MeSAG: metil-salicílico 2-O- -D-glucósido (Rivas-San Vicente y Plasencia 2011).	17
6	Producción mundial de semillas de girasol (miles de toneladas). Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014/2015.	21
7	Molienda de semillas de girasol (miles de toneladas). Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014/2015.	22
8	Relación molienda/producción de semillas de girasol (miles de toneladas).	22
9	Girasol y productos de alimentación y distribución (millones de toneladas métricas).	23
10	Girasol y productos. Suministro y distribución (millones de toneladas métricas).	24

11	Indicadores de los principales productores de aceite de girasol en el mundo (miles de toneladas). Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014/2015.	25
12	Indicadores de los principales productores de harina de girasol en el mundo (miles de toneladas). Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014/2015.	25
13	Principales áreas de cultivo de girasol en Argentina. (MINAGRI, 2014).	27
14	Producción de girasol en Argentina 1969-2014 Fuente: (MINAGRI, 2014; Informativo semanal, Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014).	28
15	Representación diagramática del empleo de BSA para mapear genes de resistencia a enfermedades. (Marcador dominante) (Ferreira y Grattapaglia, 1998).	34
16	BSA. Ejemplo para un marcador co-dominante (microsatélite) (Ferreira y Grattapaglia, 1998).	35
17	Determinación de ABA (pmol. G ⁻¹ PS) en plántulas de girasol mediante método propuesto por Durgbanshi y col., (2005) y método propuesto por Luna y col., (1993).	54
18	Determinación de SA (pmol. G ⁻¹ PS) en plántulas de girasol mediante método propuesto por Durgbanshi y col., (2005) y método propuesto por Miersch y col., (2008).	55
19	Determinación de JA (pmol. G ⁻¹ PS) en plántulas de girasol mediante método propuesto por Durgbanshi y col., (2005) y método propuesto por Miersch y col., (2008).	56

20	Familias $F_{2:3}$ agrupadas por intervalos de porcentaje de germinación en relación al testigo (PGR) vs. Número de progenies $F_{2:3}$ en cada categoría.	60
21	Determinación de PGR (%) en familias $F_{2:3}$ tolerantes y sensibles sometidas a estrés hídrico.	61
22	Progenie $F_{2:3}$ agrupadas por intervalos de peso seco relativos al control (PSR) vs. Número de progenies en cada intervalo.	63
23	Determinación de PSR (%) en familias $F_{2:3}$ tolerantes y sensibles sometidas a estrés hídrico.	65
24	Peso seco (g /planta) de RILs en F_6 control y tratamiento (Estrés hídrico) evaluadas bajo condiciones de invernadero.	66
25	Niveles endógenos de SA (pmol. g^{-1} PS) en familias $F_{2:3}$ tolerantes, controles y tratadas con manitol.	67
26	Niveles endógenos de SA (pmol. g^{-1} PS) en familias $F_{2:3}$ sensibles, controles y tratadas con manitol.	70
27	Niveles endógenos de ABA (pmol. g^{-1} PS) en familias $F_{2:3}$ tolerantes, controles y tratadas con manitol.	72
28	Niveles endógenos de ABA (pmol. g^{-1} PS) en familias $F_{2:3}$ sensibles, controles y tratadas con manitol.	73
29	Niveles endógenos de JA (pmol. g^{-1} PS) en familias $F_{2:3}$ tolerantes, controles y tratadas con manitol.	75
30	Niveles endógenos de JA (pmol. g^{-1} PS) en familias $F_{2:3}$ sensibles, controles y tratadas con manitol.	76

31	Patrones de distribución hormonal expresados en porcentajes por hormona en familias F _{2:3} Tolerantes y familias F _{2:3} Sensibles sometidos a estrés hídrico. Ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA).	77
32	Niveles endógenos de ABA (pmol. g ⁻¹ PS) en RILs F ₆ tolerantes, controles y tratadas con manitol.	80
33	Niveles endógenos de ABA (pmol. g ⁻¹ PS) en RILs F ₆ sensibles, controles y tratadas con manitol.	81
34	Niveles endógenos de SA (pmol. g ⁻¹ PS) en RILs F ₆ tolerantes, controles y tratadas con manitol.	83
35	Niveles endógenos de SA (pmol. g ⁻¹ PS) en RILs F ₆ sensibles, controles y tratadas con manitol.	84
36	Niveles endógenos de JA (pmol. g ⁻¹ PS) en RILs F ₆ tolerantes, controles y tratadas con manitol.	86
37	Niveles endógenos de JA (pmol. g ⁻¹ PS) en RILs F ₆ sensibles, controles y tratadas con manitol.	87

ABREVIATURAS

(² H ₂) SA:	Deuterado Interno de SA
(² H ₆) ABA:	Deuterado Interno de ABA
(² H ₆) JA:	Deuterado Interno de JA
11-OH-JA:	11-Hidroxi-JA
12-OH-JA:	12-Hidroxi-JA
13-HPOT:	13-hidroperóxido de Ácido Linolénico
13-LOX:	13-Lipooxigenasa
9-HPOT:	9-hidroperóxido de Ácido Linolénico
9-LOX:	9-Lipooxigenasa
AAO:	Aldehído Oxidasa
ABA:	Ácido Abscísico
AFLP:	Amplified Fragment Length Polymorphism
ANOVA:	Análisis de la Varianza de una vía
AOC:	Aleno Ciclasa
AOS:	Aleno Sintasa
B59:	Línea Sensible

BSA:	Bulk Segregant Analysis
CC:	Capacidad de Campo
CTAB:	Bromuro de Cetil-Trimetil Amonio
DALPs:	Direct Amplification of Length Polymorphisms
Daughter Scan:	Fragmentos Generados de la Ruptura de Compuestos Parentales
ELISA:	Inmuno Absorción Ligado a Enzimas
ESI-:	Electrospray Negativo
GA:	Ácidos Giberélico
GC-MS:	Cromatografía de Gases Asociada a Espectrometría de Masas
HF:	Hellfrucht Frühstamm
HPL:	Hidroperóxido Liasa
HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
ICS:	Isocorismato Sintasa
INTA:	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
ISTA:	International Seed Testing Association
JA:	Ácido Jasmónico
JA-Ile:	Isoleucina

JAs:	Jasmonatos
LC-ESI-MS/MS:	Cromatografía Líquida Asociados a Espectrometría Masas
LOX:	Lipoxigenasa
ME-JA:	Metil-jasmónico
MeOH:	Metanol
MRM:	Monitoreo de Reacciones Múltiples
NCED:	9- <i>cis</i> -epoxycarotenoide dioxigenasa
OPDA:	12-Oxo-Fitodienoico
OPR:	OPDA Reductasa
PGR:	Poder Germinativo Relativo al Control
PICT:	Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica
PS:	Peso Seco
PSR:	Peso Seco Relativo
QTL:	Quantitative Traits Loci
R432:	Línea Tolerante
RAPD:	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism

RILs:	Líneas Endocriadas Recombinantes
SA:	Ácido Salicílico
SAG SA 2-O- -D-glucósido:	SA glucosilado
SAS:	Statistical Analysis System
Scan:	Detección de Barrido de Espectro de Iones
SIR:	Reacción Eeectiva de Iones
SNP:	Single Nucleotide Polymorphisms
SSR:	Simple Sequence Repeat
TRAPs:	Target Region Amplification Polymorphisms
ZEP:	Zeaxantina Epoxidasa
-LA:	-Ácido Linoleico

PRÓLOGO

Este trabajo de tesis estuvo enmarcado en las investigaciones que se desarrollaron dentro de los Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica (PICT), promovido por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (2009/2013) y cuya temática abordó la “Caracterización genómica funcional de girasol para su mejoramiento en características de tolerancia a estreses bióticos y abióticos utilizando herramientas moleculares”, a partir de lo cual este proyecto ha tenido un importante trabajo de colaboración con otros grupos integrantes de este proyecto.

Ha sido bien documentado que el estrés hídrico tiene efectos adversos sobre procesos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares a lo largo de la ontogenia de la planta. Albuquerque y Carvalho (2003) reportaron que el estrés hídrico en girasol ocasiona irregular germinación de semillas y desincronizado establecimiento de plántulas. En este sentido, se demostró una disminución en el porcentaje de germinación tanto de cultivares como de híbridos de girasol bajo condiciones de estrés hídrico generado por PEG-6000 (Ahmad y col., 2009; Vassilevska-Ivanova y col., 2014). Asimismo, este estrés impacta negativamente sobre el rendimiento de granos y el contenido de aceite de las semillas (Ahmad y col., 2009; Fernández-Moroni y col., 2012). Respecto a los temas que comprenden la caracterización del germoplasma de girasol para condiciones de estrés hídrico, nuestro grupo de trabajo comenzó evaluando a campo y en laboratorio once líneas endocriadas crecidas bajo condiciones de estrés hídrico e irrigación. En estrés hídrico impuesto a campo se registró menor rendimiento de granos y materia grasa para las líneas B59, R419 y B67, por lo tanto fueron caracterizadas como sensibles a estrés hídrico, comparado con las líneas B71, R432 y HAR4, las cuales fueron caracterizadas como tolerantes. En ensayos de laboratorio, B59 mostró una disminución importante en el poder germinativo a 200 y 400 mM de manitol (utilizado para simular la condición de estrés hídrico); mientras que en la línea R432 se observó reducción del porcentaje de germinación sólo a 400 mM de manitol (Andrade y col., 2009). A partir de estos resultados se decidió continuar la línea de investigación empleando las líneas B59 y R432, sensible y tolerante a estrés hídrico, respectivamente.

A partir de tales líneas sensibles (B59) y tolerantes (R432) a estrés hídrico, se obtuvo la generación F_1 y luego por autofecundación se obtuvieron las líneas F_2 donde fueron evaluadas con marcadores genéticos, e integrados a los resultados de las familias $F_{2:3}$ que fueron evaluadas por su poder germinativo en condiciones de estrés hídrico en referencia al control y obtenidas las contrastantes a las cuales se le realizaron análisis de *Bulk Segregant Analysis* (BSA).

En resumen, este trabajo plantea un abordaje integral desde estudios genéticos, de señalización que ocurre en la plántula a nivel de metabolitos con actividad hormonal y evaluación de respuestas fenotípicas para un carácter de relevancia para el cultivo de girasol, como es el estrés hídrico en las etapas tempranas del cultivo, lo cual entendemos aportará herramientas genéticas y moleculares para el mejoramiento asistido del mismo.

INTRODUCCIÓN

Sequía

Actualmente, existe un fuerte consenso científico con respecto al clima global, el mismo, se ve alterado significativamente como resultado del aumento de las concentraciones de gases de efecto invernadero, tales como el dióxido de carbono, metano, óxidos nitrosos y clorofluorocarbonos (Houghton y col., 1990, 1992; Nelson y col., 2009). Estos gases están atrapando una gran cantidad de la radiación infrarroja terrestre y se espera que incrementen la temperatura planetaria de 1,5 a 4,5°C en la próxima década. El crecimiento sin obstáculos de las emisiones de gases de efecto invernadero está aumentando la temperatura de la Tierra, las consecuencias incluyen deshielo de glaciares, abundantes precipitaciones, eventos climáticos extremos y estaciones cambiantes. En lo que respecta a la disponibilidad de agua para la agricultura, el calentamiento global está causando en zonas áridas una marcada disminución del agua edáfica. El incremento de la temperatura genera mayores tasas de evapotranspiración y menor nivel de humedad en los suelos. Una reducción en la frecuencia de las precipitaciones anuales causa periodos prolongados de sequías y los cambios en la distribución estacional de las precipitaciones ocasionan un desfase entre los ciclos de los cultivos y la disponibilidad hídrica de la zona (Byun y Wilhite, 1999; Nelson y col., 2009). En aquellas regiones en las que naturalmente ocurren periodos frecuentes de sequía, la falta de agua edáfica se ve agravada por los cambios climáticos generados por el calentamiento global (Fischer y col., 2001). La población de los países en desarrollo, que son ya vulnerables y con inseguridad alimentaria, es probable que sean los más afectados. En 2005, casi la mitad de la población económicamente activa, aproximadamente 2.5 billones de personas, se basó en la agricultura para su subsistencia. Hoy en día, el 75% de las personas pobres del mundo viven en zonas rurales (Nelson y col., 2009).

La sequía es una de las anomalías ambientales más difícil de evaluar por su gran complejidad, ya que depende de la escases o ausencia de precipitaciones, también se relaciona con la capacidad de almacenamiento del suelo y la ocurrencia del fenómeno en relación con el ciclo vegetativo anual (Glantz, 1994). La sequía es la responsable de la desertificación de grandes áreas en la superficie global y una de las causas predominante en las pérdidas de cultivos, que se traduce en la escasez de alimentos y energía. Por estos motivos, la sequía es una de las más importantes amenazas a la agricultura mundial y motiva a los científicos a revelar los mecanismos de adaptación de las plantas a los ambientes desfavorables.

Según el Servicio Meteorológico Nacional (1988) la sequía en términos generales, puede ser considerada como la insuficiente disponibilidad de agua en una región, por un

período prolongado para satisfacer las necesidades de los elementos bióticos locales. Estas necesidades dependen de la distribución de las poblaciones de plantas, animales, seres humanos, de su modo de vida y del uso de la tierra. De acuerdo con Singh (2000), la sequía es el principal factor abiótico, dado que afecta por encima de un tercio los suelos del mundo, seguido en orden de importancia por la deficiencia y toxicidad por minerales y en tercer lugar, el frío. Por otro lado, no sólo causa diferencias entre el rendimiento promedio y el rendimiento potencial, sino que además origina variaciones de rendimiento año a año y consecuentemente inestabilidad de este carácter (Monte, 1986; Parry y col., 2004; Rosegrant y col., 2005). La sequía pertenece al esquema climático normal de las regiones semiáridas, en consecuencia, está relacionada con la alta variabilidad de las precipitaciones. La variación de la precipitación en un lugar dado y entre épocas determinadas constituye el factor de impulso principal de las sequías. A su vez, dependen del condicionamiento impuesto por los cambios en la presión atmosférica con las consiguientes alteraciones en la circulación general de la atmósfera (Houghton y col., 1990; Haie y Keller, 2008).

Efecto de estrés hídrico en plantas

Un adecuado suministro de agua y nutrientes son los factores más importantes para asegurar el crecimiento óptimo de las plantas y la producción de cultivos. Por su parte, el estrés hídrico es el factor que más afecta el crecimiento y productividad de las plantas en las regiones áridas y semi-áridas del mundo (Roche y col., 2009; Zhang y col., 2006) que junto con la salinidad y la temperatura, definen la distribución de cultivos agrícolas. El carácter de tolerancia a estrés hídrico puede definirse como el o los mecanismos que causan una pérdida mínima de rendimiento en un ambiente de sequía, relativo al máximo rendimiento en un ambiente óptimo para el cultivo (Skoric, 2009). La tolerancia a estrés hídrico es un fenómeno multifacético en el que varias características influyen en el éxito de la planta, durante su periodo vegetativo (Ingram y Bartels, 1996; Khan y Khan, 2010). Las plantas responden al estrés hídrico a través de modificaciones morfológicas, fisiológicas y metabólicas que ocurren en todos sus órganos, estos cambios incluyen generación de especies reactivas del oxígeno (Papadakis y Roubelakis-Angelakis, 2005; Mittler y col., 2015) acumulación de solutos osmóticamente activos (Sánchez-Díaz y col., 2008; Zang y Komatsu, 2007), entre otros. La germinación es la etapa temprana más sensible del ciclo de vida de las plantas (Ashraf y Mehmood, 1990) y su establecimiento es muy susceptible a la sequía y otros problemas ambientales (Albuquerque y De Carvalho, 2003; Maraghni y col., 2010).

El estrés hídrico produce una importante reducción del poder germinativo en la mayoría de los cultivos que son sensibles a esta condición (Priano y Pilatti, 1989). Por

ello, la etapa de implantación, que comprende la siembra, la germinación, la emergencia y la aparición del primer par de hojas verdaderas, es sumamente útil al momento de estudiar los efectos de este tipo de estrés abiótico, dado que la plántula se nutre únicamente de sus reservas seminales. Componentes tales como número de capítulos por unidad de superficie, número de frutos llenos por capítulo y el peso individual de frutos se definen principalmente durante la germinación y la emergencia de la planta, ya que las pérdidas posteriores de plantas o capítulos son menos frecuentes y sólo se producen en casos de ataques por patógenos o por vuelco de las plantas (Pedraza y col., 2000). La germinación y la emergencia de las plántulas deben producirse en forma rápida y uniforme, para poder así, obtener un conjunto de plantas similares en tamaño y con una distribución por unidad de superficie que permita explorar óptimamente los recursos ambientales (Aguirrezábal y col., 2001). El mal tiempo y el suelo pueden causar un establecimiento no sincronizado de los cultivos (Mwale y col., 2003) y la sequía puede reducir el rendimiento y calidad de las semillas (Roche y col., 2009).

El porcentaje de germinación generalmente disminuye a medida que disminuye el potencial hídrico del suelo (Song y col., 2005), ya sea por sequía o por el aumento de la salinidad. Se determinó que el contacto semilla-suelo es el factor más importante para la transferencia rápida del agua del suelo a las semillas, por otra parte, en algunas especies, el 85% o más del agua absorbida por las semillas pueden atribuirse directamente al vapor de agua (Wuest, 2007).

El efecto de un déficit hídrico en la etapa vegetativa del cultivo puede reducir en forma importante la superficie transpiratoria, disminuyendo el área foliar principalmente a través de una disminución en la tasa de expansión de las hojas y en menor medida, en la tasa de aparición de las mismas. En este sentido se producen además, diversos cambios morfofisiológicos tales como cierre estomático y acumulación de solutos compatibles para mantener un bajo nivel de agua potencial evitando así la deshidratación. Además se sintetizan diversas proteínas protectoras, tales como dehidrinas y antioxidantes, a fin de restringir el daño a diversas proteínas y membranas celulares (Pardo, 2010). Un déficit hídrico en la etapa de post-floración reduce por su parte la superficie transpiratoria a través de una aceleración de la senescencia de las hojas. Sin embargo a pesar de las mencionadas adaptaciones, todos estos eventos conducen a una reducción en la producción de este cultivo (Aguirrezábal y col., 2001). Esta reducción está destinada a realizar una re-distribución de los recursos esenciales que pueden llegar a ser limitados en virtud de un estrés extremo (Granier y Tardieu, 1999; Skirycz y col., 2010). De acuerdo a lo expresado anteriormente, la identificación de caracteres útiles para la búsqueda de genotipos tolerantes a sequía es uno de los mayores desafíos de los fitomejoradores (Basal y col., 2005; Longenberger y col., 2006; Chaves y col., 2003). Una de las etapas

principales y necesarias para lograr comprender los mecanismos vegetales naturales de resistencia, es poder dilucidar la función de los productos de genes activados por factores de estrés. Muchos de los genes inducidos por proteínas que comparten características estructurales con proteínas descubiertas inicialmente en semillas fueron identificados posteriormente en tejidos de plantas sometidas a estrés hídrico, como el caso de *Pisum sativum* L. (Hernandez y col. 2000).

Aunque se han identificado un gran número de genes mediante la inducción de estrés hídrico en una amplia gama de especies de plantas, la base molecular para tolerancia al estrés hídrico sigue estando lejos de ser conocida completamente (Ingram y Bartels, 1996, Vinocur y Altman 2005, Umezawa y col., 2006, Nakashima y Yamaguchi-Shinozak 2009). En líneas generales, se ha desarrollado mejoramiento de girasol orientado a la tolerancia a sequía en distintas fuentes de germoplasma incluyendo líneas, variedades e híbridos cultivados, especies silvestres del género *Helianthus* y poblaciones mutageneizadas (Skoric, 2009). El uso de los híbridos *stay-green* en los programas de mejoramiento para tolerancia a sequía permitió obtener una mejor producción en girasoles comerciales (Vranceanu, 2000). Los aumentos más importantes en la tolerancia a sequía para girasol cultivado se han logrado usando introgresiones con especies silvestres principalmente *H. argophyllus* y en el futuro se espera incrementarla aún más incluyendo otras especies silvestres como *H. deserticola*, *H. hirsutus*, *H. maximiliani* y *H. tuberosus*, entre otros (Skoric, 2009).

En tal sentido, nuestro grupo logró caracterizar con ensayos a laboratorio y a campo, líneas de girasol con diversos tipos de respuestas frente a condiciones de estrés hídrico. Se identificaron, de esta manera, líneas sensibles (B59 y B67), líneas de respuesta intermedias (HA89 y RHA274), líneas tolerantes (R432, HAR4 y B71) (Andrade y col., 2009). Asimismo, se ha comprobado que la cantidad y distribución de agua tiene un impacto significativo sobre el aquenio y el rendimiento de aceite (Reddy y col., 2003; Iqbal y col., 2005); por el contrario, la calidad del aceite no es una característica significativamente afectada por la sequía (Petcu y col., 2001).

Debido a que el rendimiento de un cultivo y su resistencia a la sequía son procesos controlados por loci genéticos diferentes, incrementar la tolerancia a este tipo de estrés involucra identificar y transferir características fisiológicas responsables de la resistencia a fin de producir cultivares con alto rendimiento y agrónomicamente aceptables. De allí la necesidad de dilucidar los mecanismos que definen las respuestas fisiológicas de las plantas ante condiciones adversas y clarificar como operan los sistemas de ajustes en estos organismos.

Respuestas hormonales relacionadas a estrés hídrico

Actualmente se pone énfasis en el estudio de diversos procesos celulares que los vegetales utilizan para responder a las alteraciones del ambiente: alteraciones en el metabolismo de los fosfolípidos, síntesis de diversas proteínas, genes cuya transcripción es regulada por factores de estrés y modificaciones en los niveles de hormonas involucradas en respuesta a condiciones limitadas de agua como el ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA) (Perales y col., 2005; Seki y col., 2007; Dobra y col., 2010; Szalai y col., 2010; Han y col., 2012; Brossa y col., 2011; Wang y col., 2011^a; Djilianov y col., 2013; Szalai y col., 2010; Gruszka, 2013; Van Ha y col., 2014; Yamaguchi y col., 2014). Recientemente, en plantas de *Panicum virgatum* cv. Greenville se reportaron modificaciones en los niveles de ABA, SA y JA luego de 5 días de estrés hídrico generado por supresión de riego y posterior al período de rehidratación (Aimar y col., 2014), al mismo tiempo, estudios con plantas cultivadas (porta injertos de cítricos) evidenciaron cambios en los niveles hormonales y en metabolitos secundarios en raíces de plantas de distintos genotipos sometidas a estrés hídrico (Arbona y col., 2010). Las estructuras químicas de estas fitohormonas son bastante simples, pero su acción y efectos fisiológicos son muy complejos (Santner y col., 2009). La modificación química de las diversas hormonas vegetales mediante glicosilación, metilación, o conjugación de aminoácidos, contribuyen para modular su actividad reversiblemente o conferir el primer paso en su metabolismo irreversible (Bajguz, 2007; Ludwig-Müller, 2011). La participación de fitohormonas y su interacción en la transducción de señales en sistemas modelo y cultivos de interés agrícola bajo condiciones de estrés hídrico es un tema de creciente interés (Jaillais y Chory, 2010; Peleg y Blumwald, 2011).

Los jasmonatos (JAs) son compuestos que poseen homología estructural-funcional con eicosanoides de animales, los cuales se originan a partir del ácido araquidónico; este compuesto es el precursor de las prostaglandinas, hormonas que poseen funciones antiinflamatorias en mamíferos (Creelman y Mullet, 1997; Howe, 2004; Wasternack, 2007; Wasternack y Kombrink, 2010; Schaller y Stintzi, 2009; Wasternack y Hause, 2013; Wasternack, 2014). JA es una ciclopentanona que posee una cadena pentenil y una cadena carboxílica. Entre los cuatro enantiómeros posibles, el enantiómero (-)-JA tiene la configuración absoluta (3*R*, 7*R*), la forma (+)-7-iso-JA (3*R*, 7*R*) es nativa y fisiológicamente activa (Fig N° 1).

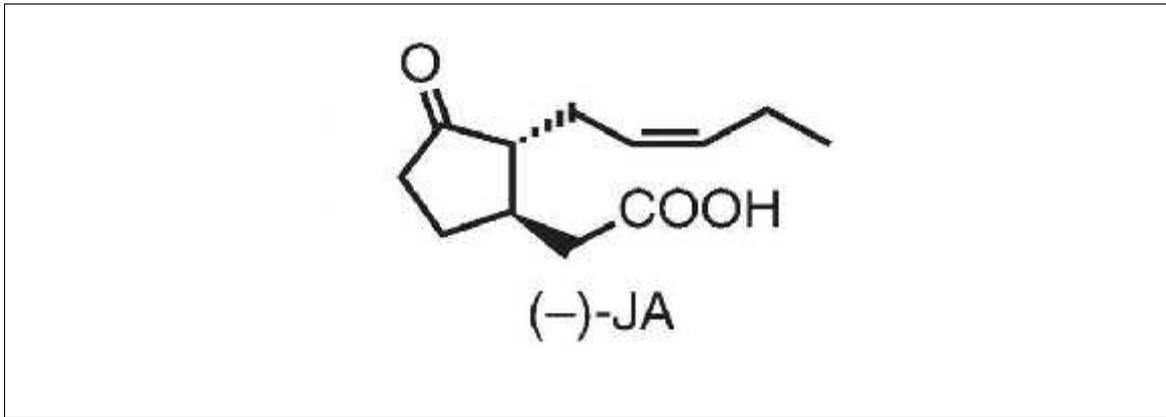


Fig N° 1 Estructura del ácido jasmónico modificado por Schillmiller y Howe, 2005; Wasternack, 2006.

JA y sus derivados se encuentran en las plantas en forma de ácido libre (ácido jasmónico), como forma metilada, metil-jasmónico (ME-JA), derivados hidroxilados 11-hidroxi-JA (11-OH-JA) y 12-hidroxi-JA (12-OH-JA), JA conjugado con aminoácidos tales como valina, leucina, tirosina e isoleucina (JA-Ile). Todos los compuestos mencionados anteriormente son los denominados “jasmonatos” (JAs). La ruta de biosíntesis, también llamada ruta de los octadecanoides, ha sido estudiada extensamente, llegándose a conocer hoy en día varias enzimas implicadas en diversos pasos de la misma (Vick y Zimmerman, 1984; Berger, 2002; Agrawal y col., 2004; Schaller y Stintzi, 2009; Acosta y Farmer, 2010; Wasternack y Kombrink, 2010; Kombrink 2012; Wasternack y Hause, 2013; Wasternack, 2014; Liu y col., 2015). El camino de biosíntesis de los JAs comienza a partir de ácido graso poliinsaturado ω -ácido linoleico (ω -LA). Este ácido graso puede ser sustrato de una 9-lipooxigenasa (9-LOX) o de una 13-lipooxigenasa (13-LOX) (Wasternack, 2014), enzimas que insertan un oxígeno en la posición 9 o 13 del ω -ácido linoleico, generando 9-hidroperóxido de ácido linolénico (9-HPOT) o 13-hidroperóxido de ácido linolénico (13-HPOT), dependiendo de la enzima que actúe. Aunque se conocen seis tipos de LOXs en *Arabidopsis*, solamente cuatro LOX2, LOX3, LOX4 y LOX6, son comprendidos en profundidad (Bannenber y col., 2009). Por su parte LOX2, se cree que participaría en respuesta a heridas mecánicas durante tiempos prolongados (Bell y col., 1995) además, estudios subsiguientes revelaron que LOX2 era responsable de la mayor parte de la formación de JA en la primera hora después de la lesión (Glauser y col., 2009; Schommer y col., 2008). Las restantes LOXs de *A. thaliana*, LOX1 y LOX5, no están implicadas en la biosíntesis de JA, sus productos están presentes en los mecanismos de defensa locales y sistémicos contra patógenos bacterianos (Vicente y col., 2012). Por otro lado, Solo la vía del 13-HPOT genera JA. Estos HPOT resultantes son convertidos por una óxido de aleno sintasa (AOS) (Knopf y col., 2012), en un óxido de aleno inestable que es ciclado por una óxido de aleno ciclasa (AOC) para formar el ácido 12-oxo-

fitodienoico (OPDA) (Stenzel y col., 2012; Wu y col., 2011; Wasternack y Hause, 2013; Wasternack, 2014). Recientemente, se demostraron las actividades de cuatro AOC en *A. thaliana* (Stenzel y col., 2012). AOC1, AOC2 y AOC3 se detectaron en tejidos de hojas jóvenes, mientras que AOC4 era preferentemente activo en las nervaduras principales de hojas totalmente desarrolladas. En las raíces, promotores de todos los AOC fueron de gran actividad en los tejidos meristemáticos y la zona de elongación, incluidos los primordios de raíces laterales (Stenzel y col., 2012).

El OPDA, por acción de una OPDA reductasa (OPR) y tres ciclos subsecuentes de ω -oxidación produce el ácido (+)-7-iso-jasmónico. Esta sustancia fisiológicamente activa es convertida rápidamente en su estereoisómero estable, el (-) JA, que luego es metabolizado dando origen a diferentes jasmonatos (Thines y col., 2007; Katsir y col., 2008; Schaller y col., 2005; Wasternack y Kombrink, 2010; Scherer y col., 2010; Bannenberg y col., 2009; Wasternack y Hause, 2013; Wasternack, 2014). La biosíntesis de los JAs ocurre en tres compartimentos celulares: Cloroplastos, donde JA es convertido a OPDA. Citoplasma, donde OPDA es reducido por una OPR reductasa. Peroxisoma, donde ocurren los tres pasos de ω -oxidación. Luego en el citoplasma JA puede ser modificado por metilación, hidroxilación o conjugación (Schaller y col., 2005; Seltsmann y col., 2010; Schaller y Stintzi, 2009; Wasternack y Kombrink, 2010; Kombrink, 2012; Wasternack, 2014) (Fig N° 2). La regulación de la biosíntesis de JA es determinada por un circuito de retroalimentación positiva, disponibilidad de sustrato y especificidad tisular, una regulación adicional es proporcionada por la acción simultánea de las vías LOX. Entre las diferentes vías de LOX (Feussner y Wasternack, 2002) las reacciones de AOS e hidroperóxido liasa (HPL) son concurrentes en el mismo sustrato, 13-LOX. La rama HPL conduce a oxylipinas volátiles y no volátiles, como por ejemplo, diversos tipos de aldehídos (Andreou y col., 2009). Se demostró que oxylipinas no volátiles, tales como el ácido azelaico, se sintetizaban en situaciones de estrés en plántulas de guisante (Mukhtarova y col., 2011), sugiriendo, por primera vez, un papel central del ácido azelaico como una señal de defensa (Jung y col., 2009; Dempsey y Klessig, 2012; Zoeller y col., 2012).

Los Jasmonatos y su equilibrio con JA-Ile regulan muchos aspectos del desarrollo y el crecimiento de plantas, como germinación de semillas, maduración de frutos, producción viable de polen, crecimiento y desarrollo de la raíz, abscisión y senescencia de las hojas (Creelman y Mullet, 1997; Delker y col., 2006; Li y col., 2005; Rao y col., 2001; Mandaokar y col., 2006; Schillmiller y Howe, 2005; Browse, 2009; Katsir y col., 2008; Kazan y Manners, 2008, 2011, 2012; Browse, 2009a; Grant y Jones, 2009; Koo y Howe, 2009; Kuppusamy y col., 2009; Wasternack y Kombrink, 2010; Ballare, 2011; Pauwels y

Goossens, 2011; Robert-Seilaniantz y col., 2011; Dave y Graham, 2012; Kombrink, 2012; Pieterse y col., 2012; Wasternack, 2014; Hilou y col., 2014).

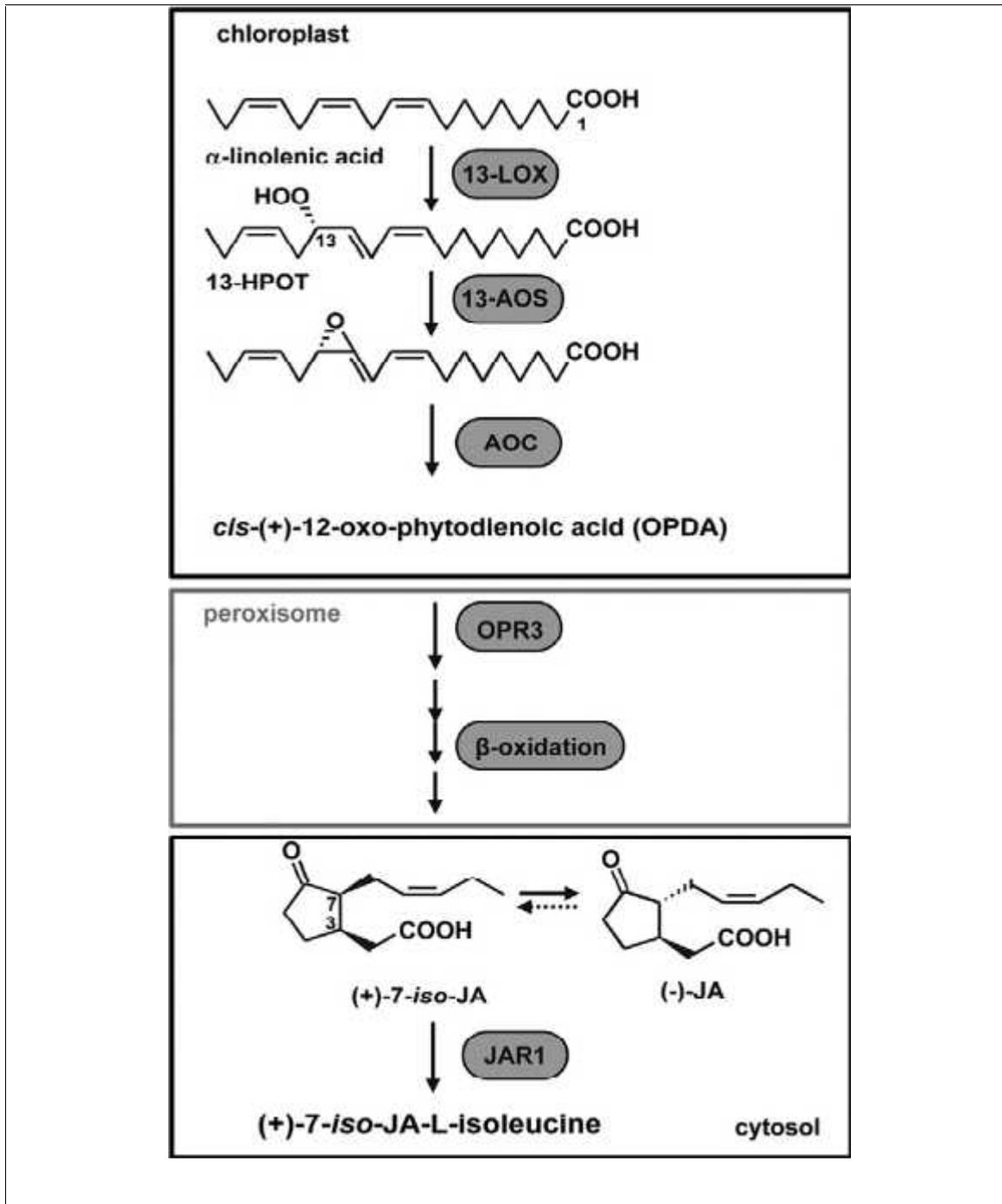


Fig N° 2. La biosíntesis de ácido jasmónico (JA) y (+)-7-iso-JA-L-isoleucina tiene lugar en tres diferentes compartimentos de una célula vegetal (Wasternack, 2014).

A través de numerosas investigaciones, diversos autores proponen que JA y sus derivados están implicados en la respuesta a estrés biótico y abiótico (Farmer y col., 2003, Howe, 2004; Schillmiller y Howe, 2005; Wasternack, 2006; Wasternack y Hause, 2013; Yoshida y col., 2009; Pauwels y col., 2008; Szczegieliak y col., 2007; Yun-xia y

col., 2010; Ismail y col., 2012; Wasternack y Hause, 2013; Wasternack, 2014; Hilou y col., 2014). Por otra parte se demostró que ante condiciones de sequía, se produce un incremento de JA, aumento en los niveles de transcriptos y las actividades de enzimas antioxidantes (Huang y col., 2008; Shan y Liang, 2010), por ejemplo, en arroz el contenido endógeno de JA incrementó marcadamente bajo estrés hídrico severo (Du y col., 2013).

En girasol Vigliocco y col., 2007, identificaron cambios en los patrones de Jasmonatos en semillas secas y embebidas por 72 horas, cuando las mismas tuvieron diferentes condiciones ambientales durante la embriogénesis.

El estrés hídrico aplicado a plántulas de maíz produjo un incremento en el contenido endógeno de ABA y JA (Xin y col., 1997). Lehmann y col., (1995) y Kramell y col., (2000) informaron que el contenido endógeno de JAs se incrementó rápidamente en hojas de cebada sometidas a estrés osmótico producido por adición 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. En este sentido, Gao y col., (2004) demostraron que JA está implicado en acumulación de betaína causado por efectos del estrés hídrico, un osmoprotector acumulando en las hojas de las plantas.

Otra de las hormonas involucradas en el proceso de estrés en plantas es ABA. Este compuesto muy ubicuo en la naturaleza, se encuentra en plantas superiores, algunos musgos, algas verdes, cianobacterias y varios hongos fitopatógenos. ABA desempeña un rol primordial en procesos normales del desarrollo de las plantas como por ejemplo, regulación del crecimiento, desarrollo de semillas, desarrollo vegetativo, senescencia foliar, apertura de estomas y respuesta de defensa ante patógenos (Wasilewska y col., 2008; Ton y col., 2009; Fan y col., 2009; Cutler y col., 2010; Hubbard y col., 2010; Popko y col., 2010; Wilkinson y Davies, 2010; Kanno y col., 2010; Zhang y Huang, 2013) y en repuesta a factores tales como salinidad, sequía, bajas temperaturas y estrés osmótico (Bartels y Hussain, 2011; Wasilewska y col., 2008; Leung y Giraudat, 1998; Zhou, 2002; Xiong y Zhu, 2003; Chinnusamy y col., 2008; Popko y col., 2010; Sirichandra y col., 2010; Wilkinson y Davies, 2010; Joshi-Saha y col., 2011; Cutler y col., 2010; Ye y col., 2012; Xu y col., 2013; Hong y col., 2013).

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. El contenido de ABA en los tejidos vegetales es el resultado de la combinación de diversos procesos, entre ellos transporte, biosíntesis y metabolismo (Zaharia y col., 2004; Nilson y Assmann, 2007) y los mismos están influenciados por factores ambientales tales como la luz y el estrés hídrico (Cutler y Krochko, 1999). El transporte de 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; Yang y col., 2000; 2006; Yang y Zeevaart, 2006; Hong y col., 2013; El-Maarouf-Bouteau y col., 2015). 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 y col., 1993; Griffiths y Bray, 1996). En las células de las plantas, ABA es sintetizado y degradado continuamente (Zhou y col., 2004; Jiang y Hartung, 2008; Tomokazu y Mitsunori 2011; Zhang y Huang, 2013). La respuesta producida por ABA finalmente conduce a cambios en la expresión génica. Aplicaciones exógenas de ABA, así como las condiciones adversas aumentan la concentración de ABA endógeno y redirigen la expresión de una parte del genoma de *Arabidopsis* (Chan y col., 2011; Chan y col., 2012; Hoth y col., 2002; Nemhauser y col., 2006; Hong y col., 2013). Diversas investigaciones demostraron que aplicaciones exógenas de ABA fueron capaces de promover la acumulación de materia seca en los órganos reproductores y su niveles estaban vinculadas con la tasa de crecimiento de las semillas o frutos (Schussler y col., 1991; Wang y col., 1987; Ross y Macwha, 1990; Kato y col., 1993; Wang y col., 1998; Yang y col., 2001). En plantas superiores, ABA es sintetizado a través del clivaje oxidativo del precursor carotenoides 40C (Nambara y Marion-Poll, 2005; Marion-Poll y Leung, 2006). El primer paso de la epoxidación de zeaxantina a anterazantina y de anterazantina a violaxantina ocurre en plástidos y es catalizado por zeaxantina epoxidasa (ZEP). Luego de una serie de modificaciones estructurales, violaxantina es convertida a 9-*cis*-epoxycarotenoide 9-*cis*-neoxantina por la enzima 9-*cis*-epoxycarotenoide dioxigenasa (NCED) produciendo una xantoxina, intermediario de 15C. 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) (Seo y col., 2004; Lefebvre y col., 2006; Finkelstein y Rock, 2002; Seo y Koshiba, 2002; Xiong y Zhu, 2003; Schwartz y Zeevaart, 2004; Seki y col., 2007; Seo y Koshiba, 2011; Tomokazu y Mitsunori 2011) (Fig N° 3).

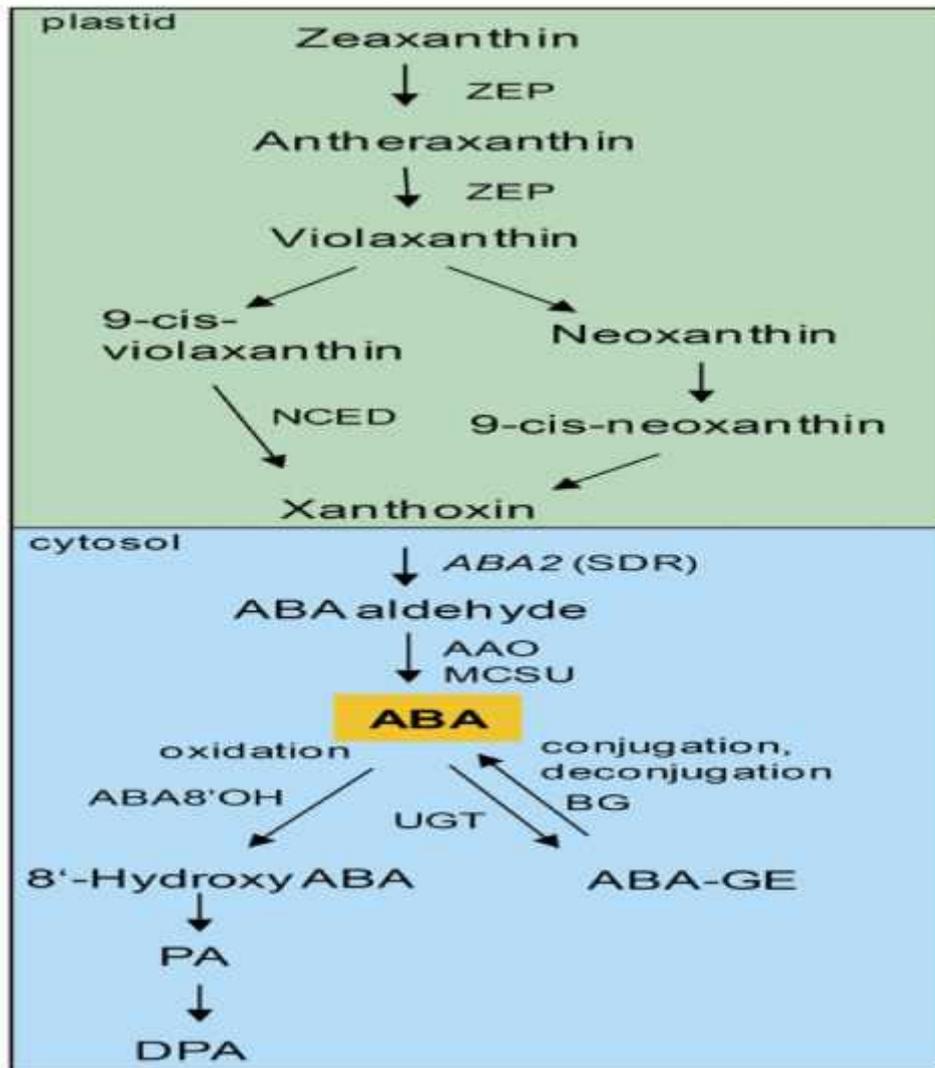


Fig N° 3. Vía de síntesis y localización de ABA (Seiler y col., 2011).

ABA desempeña un rol protector frente a distintos tipos de estrés ambiental. 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; Cutler y col., 2010).

Muchos investigadores han observado aumentos en el contenido de ABA endógeno en especies leñosas y herbáceas inducida por sequía y salinidad (Hassine y Lutts, 2010), congelamiento (Janowiak y col., 2002), deshidratación (Nayyar y Walia, 2004) y estrés osmótico (Hsu y col., 2003).

Frente a condiciones de estrés hídrico y estrés osmótico se ha visto un incremento en los niveles endógenos de ABA en diferentes especies vegetales, 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; Dombrowski, 2003; Pedranzani y col., 2003; Wasilewska y col., 2008; Sánchez-Díaz y

col., 2008; Zhang y Huang, 2013). En este sentido, ensayos de laboratorio realizados por Andrade y col., (2009), determinaron diferentes perfiles de ABA en líneas de girasol tolerantes y sensibles a estrés hídrico y el efecto de las condiciones ambientales en la embriogénesis de la semilla.

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).

Son diversos los efectos que tiene el ácido salicílico (SA) bajo condiciones normales de crecimiento, como por ejemplo, durante la germinación de semillas (Rajou y col., 2006), establecimiento de plántulas (Alonso-Ramírez y col., 2009), modulación en el crecimiento de diversas células (Vanacker y col., 2001; Bandurska y Cieslak, 2013), respuesta estomática (Mori y col., 2001; Lu y col., 2005; Kohli y col., 2013), senescencia (Rao y col., 2001; Rao y col., 2002; Ashraf y col., 2010), termotolerancia (Clarke y col., 2004) y la nodulación (Stacey y col., 2006). El 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 (Loake y Grant, 2007; Ryals y col., 1996; Parkhi y col., 2010; Zhang y col., 2010; Potlakayala y col., 2007; Vicente y Plasencia, 2011; Hao y col., 2012; Kohli y col., 2013). 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 ejemplo, estrés hídrico (Bhupinder y Usha, 2003; Shen y col., 2004; Németh y col., 2002; Krantev y col., 2006; Vlot y col., 2009), salino (El-Tayeb, 2005; Szepesi y col., 2009; Rajjou y col., 2006), frío (Wang y col., 2006), calor (Larkindale y Huang, 2004) por irradiación con UV (Senaratna y col., 2000; Larkindale y Knight, 2002; Clarke y col., 2004; Cristea y Drochoue, 1987; Rasquin, 1992; Garcion y col., 2008), metales pesados (Mishra y Choudhuri, 1999; Metwally y col., 2003; Pal y col., 2002; Yang y col., 2003; Bandurska y Cieslak, 2013). Diversos trabajos demostraron que la acción del SA se efectúa a través de la inhibición de la catalasa, enzima encargada de la producción de peróxido de hidrogeno, de esta manera el SA jugaría un rol antioxidante ante la producción de diversas especies reactivas del oxígeno (Horváth y col., 2002; Djilianov y col., 2011; Guozhang y col., 2012; Golam y Fujita 2013). Asimismo, se ha informado una mejor tolerancia a salinidad y sequía en cultivos de porotos y tomates en respuesta a aplicaciones de SA (Senaratna y col., 2000; Bandurska y Cieslak, 2013; Golam y Fujita, 2013). Es interesante señalar que aplicaciones exógenas de SA a híbridos de girasol

redujo los efectos del estrés hídrico y mejoró el rendimiento de los mismos (Hussain y col., 2008; Kohli y col., 2013).

La síntesis de SA en las plantas se realiza a partir del ácido cinámico por dos posibles vías (Shah, 2003). 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 y col., 1995; Chen y col., 2009). Alternativamente el ácido cinámico puede ser hidroxilado a ácido cumárico y luego descarboxilado a SA (Fig N° 4).

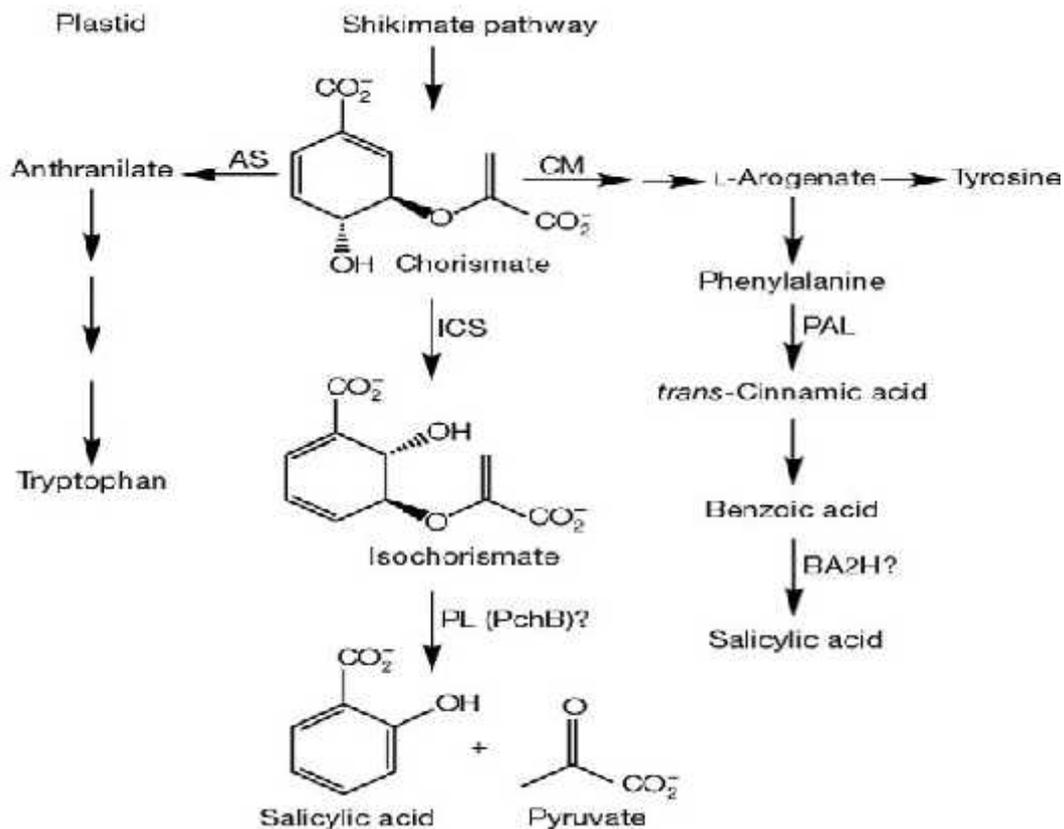


Fig N° 4. Vía de síntesis y localización de SA (Wildermuth M y col., 2001).

Respecto a este punto, se ha sugerido que la síntesis de SA en plántulas de tomate infectadas con *Agrobacterium tumefaciens* se realiza mediante la vía del ácido cumárico, mientras que plántulas no infectadas se realiza por medio de la vía de ácido benzoico (Chadha y Brwon, 1974).

Recientes estudios en *Arabidopsis*, mostraron que la vía de la fenilalanina no puede proveer todo el SA que se encuentra en las células, lo que sugiere que hay otra ruta principal para la biosíntesis de SA que tiene lugar en los cloroplastos, donde SA es sintetizado a partir corismato a través de isocorismato y este proceso es catalizado por la isocorismato sintasa (ICS) y piruvato isocorismato liasa, respectivamente. (Wildermuth y col., 2001; Métraux, 2002; Wildermuth, 2006; Mustafa y col., 2009; Catinot y col., 2008; Uddin y col., 2007; Kohli y col., 2013). La mayor parte del SA sintetizado en las plantas es glucosilado y/o metilado. La conjugación de glucosa y SA realizada en el grupo hidroxilo,

da como resultado la formación de SA glucosilado (SAG SA 2-O- -D-glucósido) como un conjugado importante, mientras que la conjugación de la glucosa y SA en el grupo carboxilo, produce el éster de glucosa, en cantidades menores (Fig N° 5). Estas reacciones de conjugación son catalizadas por glucosiltransferasas citosólicas que son inducidos por la aplicación de SA o ataque de patógenos en tabaco y plantas de *Arabidopsis* (Lee y Raskin, 1995; Song, 2006). SAG se transporta de forma activa desde el citosol a la vacuola en el caso de soja y tabaco, donde puede funcionar como una forma de almacenamiento inactivos que pueden liberar SA (Dean y Mills, 2004; Dean y col., 2005; Kohli y col., 2013).

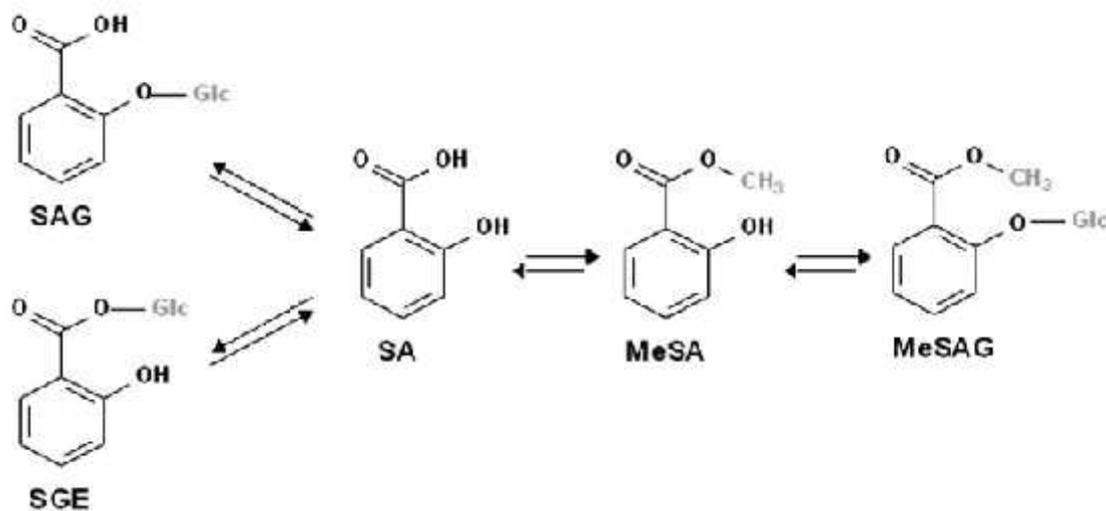


Fig N° 5. Estructuras del SA y sus derivados. SA: ácido salicílico; SAG: SA 2-O- -D-glucósido; SGE: Ester de glucosa SA; MeSA: metil-salicílico; MeSAG: metil-salicílico 2-O- -D-glucósido (Rivas-San Vicente y Plasencia 2011).

Uno de los derivados del SA, como el MeSA, que se obtiene por una carboxilo metiltransferasa SA, constituye un compuesto volátil que actúa a largas distancias induciendo en tabaco y *Arabidopsis* resistencia sistémica (Shulaev y col., 1997; Chen y col., 2003; Park y col., 2007). En este sentido, SA es parte de una red de transducción de señal extremadamente compleja, vinculados con vías de síntesis relacionadas con otras hormonas del estrés, como el JA (Navarro y col., 2008), ácidos giberélico (GA) (Alonso-Ramírez y col., 2009) y ABA (Mosher y col., 2010). Horváth y col., (2007), demostraron que SA puede llegar a ser un compuesto prometedor para reducir la susceptibilidad de diversos cultivos al estrés. El SA contribuye a promover la tolerancia de las plantas a la sequía (Hayat y col., 2010; Bandurska y Cieslak, 2013; Sánchez-Martín y col., 2015). En este sentido, plantas que fueron obtenidas de semillas empapadas en una solución de acetyl-SA mostraron una mayor tolerancia a sequía y una mayor acumulación de materia seca (Hamada, 1998; Hamada y Al-Hakimi, 2001; Korkmaz y col., 2007). En plantas de tomate y frijol, Senaratna y col., (2000) lograron mejorar la tolerancia a la sequía con la

aplicación exógena de SA en bajas concentraciones, pero no ocurrió lo mismo con altas concentraciones. De acuerdo a lo expresado anteriormente, Bandurska y Stroinski 2005; Bandurska y Cieslak, 2013, demostraron que aplicaciones exógenas de SA contribuyen a mitigar los efectos deletéreos del déficit de agua en membranas celulares de plantas de cebada (Chen y col., 2011; Bandurska y Cieslak 2013). Las respuestas morfológicas y fisiológicas de plantas trigo sugieren que el pre-tratamiento con concentraciones óptimas de SA, pueden modificar el metabolismo fisiológico y modular las vías de regulación, lo que no sólo mejoría el crecimiento, sino también una mayor tolerancia a la sequía (Guozhang y col., 2012).

Determinación de hormonas vegetales

La disponibilidad de un método sensible y de fácil utilización para cuantificar de forma simultánea varias clases de hormonas vegetales, facilita en gran medida la investigación de sus funciones (Aloni y col., 2006; Schmelz y col., 2004). Los métodos convencionales para medir las hormonas, como ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) o cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas (GC-MS) tienen una sensibilidad limitada o requieren un largo proceso de derivatización (Engelberth y col., 2003, Schmelz y col., 2003. Kowalczyk y col., 2001; Forcat y col., 2008; De Torres-Zabala y col., 2007; Truman y col., 2007). La derivatización es un aspecto importante en el análisis de hormonas vegetales mediante (GC-MS), ya que no sólo aumenta la volatilidad de los compuestos, sino que además mejora su estabilidad, facilitando su separación (Xiangqing y Xuemin, 2009). Sin embargo, GC-MS se limita a compuestos volátiles y como resultado es necesaria elevada purificación de las hormonas antes del análisis. Otra desventaja potencial en los procedimientos de GC-MS además de la purificación y derivatización es el uso de altas temperaturas, que pueden producir una degradación térmica de los compuestos lábiles (Pan y col., 2009).

Por otro lado, ELISA demostró en su momento ser una excelente técnica en cuanto a su especificidad y aplicación a extractos de baja pureza. Este método puede llegar a ser engañoso en algunas circunstancias debido a la reactividad cruzada con diversos anticuerpos, e interferir de manera potencial con los osmolitos a ser detectados (López-Carbonell y Jauregui, 2005; Du y col., 2012; Tarkowski y col., 2009; Bai y col., 2010). Ante las dificultades mencionadas hasta el momento en los diferentes métodos de análisis, la cromatografía líquida asociados a espectrometría masas (LC-ESI-MS/MS) se ha convertido en un método efectivo para el análisis simultáneo de diversas fitohormonas como el ABA, SA, JA y otros compuestos relacionados (Chiwocha y col., 2003; Pan y col., 2008; Mustafa y col., 2008; Zhang y col., 2008; Uddin y col., 2014; Li y col., 2011; Han y

col., 2012; Shichang y col., 2013). Además, este método no presenta las limitaciones descritas anteriormente (Gómez-Cadenas y col., 2002; Ross y col., 2004; López-Carbonell y col., 2005; Matsuda y col., 2005). Asimismo, antes del análisis de cuantificación e identificación todavía se requiere en algunos casos de una extracción eficiente y adecuados métodos de purificación, entre las cuales se pueden mencionar, cromatografía en capa fina, partición solvente-solvente, extracción en fase sólida, intercambio iónico y cromatografía de columna (Gaskin y MacMillan, 1991). Las hormonas vegetales son compuestos estructuralmente diversos, con diversas propiedades físico-químicas. La elección de los métodos extracción no depende sólo de los análisis a realizar, sino también de la matriz de los tejidos analizados. En la literatura publicada hasta el momento se mencionan diversos solventes de extracción tales como, metanol-agua-metanol, isopropanol o mezclas de isopropanol-agua (Pan y col., 2009; Chiwocha y col., 2003; Izumi y col., 2009; Chen y col., 2010)

Girasol

El girasol (*Helianthus annuus* L) pertenece a la familia *Asteraceae*, subfamilia *Asteroideae*, tribu *Heliantheae* y contiene especies diploides, tetraploides y hexaploides con número cromosómico básico $x=17$ (Seiler y Riesberg, 1997). Uno de sus representantes diploides más conocido por su importancia económica es el girasol cultivado (*Helianthus annuus* L. var. *macrocarpus*). Esta especie posee 34 cromosomas $2n=2x=34$ (Arumuganathan y Earle, 1991). Su centro de origen se encuentra en América del Norte, donde crecen unas 50 especies anuales y perennes, adaptadas a diversos hábitats y altamente variables en cuanto a caracteres morfológicos y fisiológicos. El girasol cultivado es de ciclo anual y se encuentra dentro del grupo de plantas autógamas. Es una planta que presenta ramificaciones, posee un capítulo con flores tubulosas en el centro y bilabiadas hacia afuera, las últimas femeninas o estériles y las primeras masculinas. El tallo es el órgano de sostén de las hojas y el capítulo. En la etapa de floración, puede medir de 1 a 3 metros en los cultivares que se siembran actualmente en la Argentina y el diámetro puede variar entre 1 a 5 cm dependiendo de las condiciones del cultivo (Aguirrezabal y col., 2001).

El sistema radical del girasol se encuentra constituido por un eje principal y por un conjunto de raíces laterales secundarias y terciarias. Bajo condiciones favorables, la raíz principal puede alcanzar profundidades mayores a los 2 metros, 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 (Aguirrezabal y col., 2001). 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 y col., 2000). En la hoja 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 y col., 1990). La semilla del girasol (botánicamente, un fruto denominado cipsela) es un fruto seco, uniseminado, con pericarpo (cáscara) separado de la verdadera semilla o pepita. El nombre de cipsela es más adecuado que el de aquenio dado que en las plantas compuestas los ovarios son bicarpelares e ínferos, mientras que el aquenio corresponde a un fruto derivado de ovarios unicarpelares y súperos. La pepita es la que contiene la mayor parte de la materia grasa o aceite (Aguirrezábal y col., 2001).

Argentina, el Este Europeo y la Unión Soviética, son los principales centros de producción de girasol. Además, dicho cultivo se está expandiendo en las regiones áridas del Mediterráneo y Norte de África, ello a partir de que esta especie es moderadamente tolerante a condiciones de estrés por sequía, salinidad y tiene importancia agronómica (Connor y Hall, 1997; Miller, 1995). Esta especie es la segunda oleaginosa en importancia a escala nacional y ocupa actualmente el tercer lugar en área sembrada, luego de la soja y el maíz. Se la utiliza principalmente para la producción de aceites y en menor medida para confitería, alimentación de aves y como ornamental.

La República Argentina en la campaña 2012/2013 integró el selecto lote de los cuatro principales países productores de semilla de girasol, con una producción de aproximadamente 3.100.000 toneladas. Nuestro país, el cual produce cerca del 9% del total mundial, se encuentra ubicado en el cuarto lugar y fue superado por Ucrania, con 8,3 millones de toneladas en dicha campaña, Rusia, con casi 8 millones y la Unión Europea con, 6,9 millones de toneladas. Según datos de OIL Word, presentados en la figura N° 6 para la campaña 2013/2014, este posicionamiento a nivel países no sufrió variaciones, por lo que se presupone que nuestro país permanecerá en el cuarto lugar (Informativo semanal, Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014/2015).

Posición	Países	2013/2014 (proyectado)	2012/2013 (estimado)	2011/2012 (Final)
1°	Ucrania	9.600	8.387	9.500
2°	Rusia	9.000	7.993	9.500
3°	Unión Europea (EU-27)	8.575	6.913	8.298
4°	Argentina	3.500	3.100	3.775
5°	China	1.750	1.730	1.700
6°	Turquia	1.450	1.100	940
7°	USA	1.020	1.264	925
8°	Otros países	5.304	4.972	4.926
	TOTAL MUNDIAL	40.199	35.459	39.564

Fig N° 6. Producción mundial de semillas de girasol (miles de toneladas). Fuente: Informativo semanal, Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014/2015.

Algunas cuestiones interesantes de este mercado surgen del análisis de la molienda de esta oleaginosa en los principales países productores y de la relación con sus respectivas producciones. Como puede observarse en las figura N° 7 y 8, los cuatro principales países productores de semilla de girasol (Ucrania, Rusia, Unión Europea y Argentina) cuentan con una particularidad en común: la mayor parte de la producción nacional está destinada a la industrialización para la obtención de aceite y harina de girasol, tanto para exportación como para su uso en el mercado doméstico (Informativo semanal, Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014/2015).

Posición	Países	2013/2014 (proyectado)	2012/2013 (estimado)	2011/2012 (Final)
1°	Ucrania	9.240	8.180	9.179
2°	Rusia	8.400	7.630	8.628
3°	Unión Europea (EU-27)	6.950	5.990	6.855
4°	Argentina	3.275	2.955	3.751
5°	China	670	670	626
6°	Turquía	1.750	1.640	1.695
7°	USA	420	475	355
8°	Otros países	5.040	4.505	5.026
	TOTAL MUNDIAL	35.745	32.045	36.115

Fig N° 7. Molienda de semillas de girasol (miles de toneladas). Fuente: Informativo semanal, Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014/2015.

Posición	Países	2013/2014 (proyectado)	2012/2013 (estimado)	2011/2012 (Final)
1°	Ucrania	96%	98%	97%
2°	Rusia	93%	95%	91%
3°	Unión Europea (EU-27)	81%	87%	83%
4°	Argentina	94%	95%	99%
5°	China	38%	39%	37%
6°	Turquía	121%	149%	180%
7°	USA	41%	38%	38%
8°	Otros países	95%	91%	102%
	TOTAL MUNDIAL	89%	90%	91%

Fig N° 8. Relación molienda/producción de semillas de girasol (miles de toneladas). Fuente: Informativo semanal, Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014/2015.

En efecto, Ucrania, Rusia, Unión Europea y Argentina muelen anualmente más del 80% de sus respectivas producciones. En cambio China, quien ocupa el quinto lugar en el ranking, muele menos del 40% de su cosecha, exportando cerca de 170.000 toneladas de semilla sin procesar. Estas ventas al exterior de semilla representan cerca del 10% de su producción, aproximadamente 1.750.000 toneladas (Informativo semanal, Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014/2015).

	Area Harvested	Beginning Stocks	Production	Imports	Exports	Domestic Consumpti	Ending Stocks
Oilseed, Sunflowerseed							
2001/02	18.84	1.92	21.42	1.11	1.20	21.33	1.92
2002/03	20.18	1.92	23.95	1.37	1.55	23.22	2.48
2003/04	23.00	2.48	26.79	2.19	2.26	25.97	3.22
2004/05	20.82	3.22	25.33	1.14	1.23	25.60	2.86
2005/06	22.78	2.86	30.24	1.38	1.52	29.57	3.40
2006/07	23.50	3.40	30.28	1.77	1.91	29.49	4.05
2007/08	20.99	4.05	27.34	1.23	1.46	27.47	3.69
2008/09	23.78	3.69	33.54	1.86	2.14	32.96	3.99
2009/10	23.10	3.99	32.13	1.48	1.56	33.29	2.76
2010/11	23.08	2.76	33.35	1.57	1.79	33.55	2.34
2011/12	24.84	2.34	39.67	1.64	1.93	39.70	2.02
2012/13	23.84	2.02	36.06	1.27	1.48	35.73	2.14
2013/14	24.62	2.14	42.86	1.83	2.01	41.95	2.86
2014/15	24.49	2.86	40.75	1.80	2.06	41.12	2.24
Oil, Sunflowerseed							
2001/02	nr	1.01	7.44	1.81	1.93	7.67	0.66
2002/03	nr	0.66	8.12	1.99	2.31	7.73	0.73
2003/04	nr	0.73	9.19	1.96	2.68	8.48	0.73
2004/05	nr	0.73	9.15	2.17	2.57	8.52	0.95
2005/06	nr	0.95	10.66	3.30	3.92	9.67	1.12
2006/07	nr	1.12	10.78	3.32	4.05	10.26	0.92
2007/08	nr	0.92	10.14	2.73	3.51	9.13	1.01
2008/09	nr	1.01	12.08	4.05	4.50	10.87	1.76
2009/10	nr	1.76	12.28	3.73	4.47	11.79	1.51
2010/11	nr	1.51	12.42	3.65	4.52	11.82	1.24
2011/12	nr	1.24	14.87	5.66	6.40	13.16	2.21
2012/13	nr	2.21	13.45	4.88	5.43	13.73	1.89
2013/14	nr	1.89	15.83	6.11	6.83	14.62	2.37
2014/15	nr	2.37	15.52	6.34	6.90	15.70	2.14

Fig N° 9. Girasol y productos de alimentación y distribución (millones de toneladas métricas).

De acuerdo a lo observado en el figura N° 9, para la campaña 2014/2015, en lo que respecta a la semillas de girasol, el área cosechada a nivel mundial se encuentra alrededor de las 24.49 millones de hectáreas, mientras que la producción, importación y exportación esta alrededor de 40.75, 1.80, 2.06, millones de toneladas respectivamente. En este mismo sentido se puede observar que la producción, importación y exportación de aceite de girasol obtenida para la campaña 2014/2015, se encuentra alrededor de 15.52, 6.34, 6.90 millones de toneladas respectivamente.

Marketing Year	Oilseed, Sunflowerseed			Meal, Sunflowerseed			Oil, Sunflowerseed			
	2012/13	2013/14	2014/15	2012/13	2013/14	2014/15	2012/13	2013/14	2014/15	
Production										
Argentina	(Mar-Feb)	3,120	2,300	2,800	1,021	1,200	1,220	990	1,180	1,180
Russia	(Sep-Aug)	7,978	10,554	10,204	2,005	2,440	1,029	1,117	1,021	1,420
Turkey	(Sep-Aug)	1,170	1,400	1,153	800	819	773	730	518	867
Ukraine	(May-Apr)	9,000	11,600	10,000	3,807	4,355	4,185	3,815	4,815	4,175
European Union	(Oct-Sep)	7,055	8,713	8,100	3,570	3,400	3,785	2,780	2,837	2,825
Other		7,807	8,230	8,307	2,560	2,823	2,800	2,210	2,472	2,451
World Total		36,090	42,856	40,751	14,251	16,637	16,291	13,951	15,825	15,519
Imports										
Argentina	(Mar-Feb)	9	8	7	0	0	0	0	0	0
Russia	(Sep-Aug)	28	35	30	0	0	0	21	10	10
Turkey	(Sep-Aug)	628	850	850	432	620	650	657	750	680
Ukraine	(May-Apr)	20	10	10	2	0	0	1	0	0
European Union	(Oct-Sep)	209	280	250	3,030	3,600	3,400	942	1,000	950
Other		378	642	657	1,200	1,532	1,642	3,263	4,353	4,699
World Total		1,272	1,825	1,804	4,664	5,752	5,692	4,884	6,113	6,339
Domestic Consumption										
Argentina	(Mar-Feb)	2,374	2,780	2,830	745	775	800	652	722	732
Russia	(Sep-Aug)	8,046	10,020	10,230	1,474	1,823	1,920	2,120	2,218	2,300
Turkey	(Sep-Aug)	1,807	2,157	2,038	1,208	1,419	1,434	994	1,130	1,240
Ukraine	(May-Apr)	8,710	11,045	10,165	466	501	520	570	590	600
European Union	(Oct-Sep)	7,162	7,757	7,700	7,060	7,175	7,031	3,513	3,648	3,673
Other		7,634	8,193	8,153	3,538	4,120	4,172	5,380	6,314	6,650
World Total		35,733	41,952	41,116	14,491	15,813	15,877	13,229	14,622	15,195

Fig N° 10. Girasol y productos. Suministro y distribución (millones de toneladas métricas).

Según lo observado en el figura N° 10, en la campaña 2014/2015 la producción de aceite de girasol en el mundo, se encuentra alrededor de las 15.51 millones de toneladas, una cifra similar se manifiesta en el consumo doméstico de los distintos países observados en el cuadro, mientras que la importación esta alrededor de 6.33 millones de toneladas.

Analizando ahora el mercado mundial de aceite de girasol, (Figura N° 11) también se desprenden interesantes conclusiones. Ucrania, quien es el principal país productor de aceite de girasol con un total de 3,5 millones de toneladas (Campaña 2012/2013), es la nación que mayor porcentaje de su producción destina a las exportaciones de este producto: Un 86% aproximadamente (3 millones de toneladas). Le sigue Argentina que en la campaña citada tuvo una producción de 1,2 millones de toneladas de aceite de girasol y exportó 700.000 toneladas, un 57% de la producción total. Son los dos países que evidencian una clara estrategia exportadora en aceite de girasol (Informativo semanal, Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014/2015).

Posición	Países	Producción semilla girasol 2012/2013 (estimado)	Crushing 2012/2013 (estimado)	Producción Aceite girasol 2012/2013 (estimado)	Importación de Aceite girasol 2012/2013 (estimado)	Exportación Aceite girasol 2012/2013 (estimado)	Consumo Interno Aceite girasol (Residual) 2012/2013 (estimado)	Relación Export./Producción Aceite girasol 2012/2013 (estimado)	Relación Consumo Interno/Producción Aceite girasol 2012/2013 (estimado)
1°	Ucrania	8.387	8.180	3.531	-	3.000	502	86%	24%
2°	Rusia	7.993	7.630	3.232	17	1.085	2.165	34%	67%
3°	Unión Europea (EU-27)	5.913	5.990	2.519	920	285	3.200	9%	129%
4°	Argentina	3.100	2.955	1.224		700	578	57%	47%
5°	China	1.730	670	183	340	-	486	0%	266%
6°	Turquía	1.100	1.640	683	540	500	830	73%	122%
7°	USA	1.264	475	197	-	25	267	13%	105%
8°	Otros países	4.972	4.505	1.777	4.258	520	5.736		
	TOTAL MUNDIAL	35.459	32.045	13.346	6.175	6.115	13.744		

Fig N° 11. Indicadores de los principales productores de aceite de girasol en el mundo (miles de toneladas). Fuente: Informativo semanal, Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014/2015.

Distinto es el caso de Rusia, segundo productor mundial de aceite de girasol, quien tiene autosuficiencia para abastecer a su mercado interno pero el elevado volumen de compras locales le demanda el 67% de su producción anual. En la figura N° 12, se pueden observar distintos datos referidos al mercado de la harina de girasol a nivel mundial en la última campaña 2012/2013. Allí vemos que se mantiene el mismo lugar que tenía la República Argentina en aceite de girasol: Cuarto, con una producción en la campaña 2012/2013 de 1.277.000 toneladas de harina de girasol. Esta cifra está muy por debajo de la producción de Ucrania (3,5 millones de toneladas), Rusia (3,3 millones de toneladas) y de la Unión Europea (3,1 millones de toneladas) (Informativo semanal, Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014/2015).

Posición	Países	Producción semilla girasol 2012/2013 (estimado)	Crushing 2012/2013 (estimado)	Producción Harina de girasol 2012/2013 (Oct-Set)	Importación de Harinas de girasol 2012/2013 (Oct-Set)	Exportación Harina de girasol 2012/2013 (Oct-Set)	Consumo interno Harina de girasol (Residual) 2012/2013 (Oct-Set)	Relación Exp./Prod. Harina girasol 2012/2013 (Oct-Set)	Relación Cons.Int./Prod. Harina girasol 2012/2013 (Oct-Set)
1°	Ucrania	8.387	8.180	3.521	0	3.175	345	90%	70%
2°	Rusia	7.993	7.630	3.363	0	1.360	2.003	40%	60%
3°	UE-27	6.913	5.990	3.148	3.255	147	6.255	5%	199%
4°	Argentina	3.100	2.955	1.277	0	590	747	42%	58%
5°	China	1.730	670	381	0	0	381	0%	100%
6°	Turquía	1.100	1.640	649	440	0	1.289	0%	152%
7°	USA	1.264	475	242	0	0	229	0%	95%
8°	Otros países	4.972	4.505	861	1.850	323	3.668		
	TOTAL MUNDIAL	35.459	32.045	14.883	5.545	5.535	14.977		

Fig N° 12. Indicadores de los principales productores de harina de girasol en el mundo (miles de toneladas). Fuente: Informativo semanal, Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014/2015.

Lo llamativo es que Argentina tenía, hace 14 años atrás, en 1999, una producción de harina de girasol un 58% más alta que la registrada en el año 2012 y un coeficiente de exportación del orden del 90%, tal como hoy muestra el país líder en producción y

exportaciones que es Ucrania (Informativo semanal, Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014/2015).

Hoy en día, la creciente demanda de aceites en el mundo, el auge del biodiesel y la nueva tendencia de las empresas a utilizar aceites con alto contenido de ácidos grasos insaturados, beneficiosos para la salud humana, han llevado a que el girasol se posicione fuertemente y genere importantes expectativas en Argentina a fin de cubrir la demanda mundial. El aceite de semilla de girasol es esencialmente libre de ácido linolénico en comparación con el de soja y de semilla de colza (canola), que contienen entre un 3-10% de este ácido. Esto proporciona una cierta estabilidad oxidativa, pero no aporta valiosos ácidos grasos como los omega-3 necesaria para la salud y nutrición. Los aceites de girasol se han desarrollado con una mejora de tocoferol y con un aumento en la cantidad de ácidos saturado. Estos aceites no requieren hidrogenación y sirven como reemplazos de grasa *trans* en muchas aplicaciones de alimentos incluidos las grasas de fritura, aceites de pulverización para horneados, aceites de ensalada y mantecas para hornear.

En Argentina, el área potencial de cultivo de girasol se extiende desde el norte de Chaco hasta el sur de la región pampeana (Fig N° 13). Se destaca una marcada expansión del cultivo en el sudeste de Buenos Aires y en el norte del país. Así, actualmente las principales zonas girasoleras se ubican en el sur-sudeste de Buenos Aires, en las regiones semiárida y sub-húmeda pampeana (oeste de Buenos Aires, La Pampa, sur de San Luis y Córdoba) y en el norte del país (Chaco, Santiago del Estero, Santa Fé y Entre Ríos). En el área agrícola de nuestro país, el cultivo de girasol soporta con cierta frecuencia periodos de estrés hídrico, problemática que se acentúa hacia la zona oeste. Esta situación se ha incrementado debido a la expansión del cultivo de la soja y la ocupación por parte del mismo de las áreas más productivas de la Pampa húmeda.

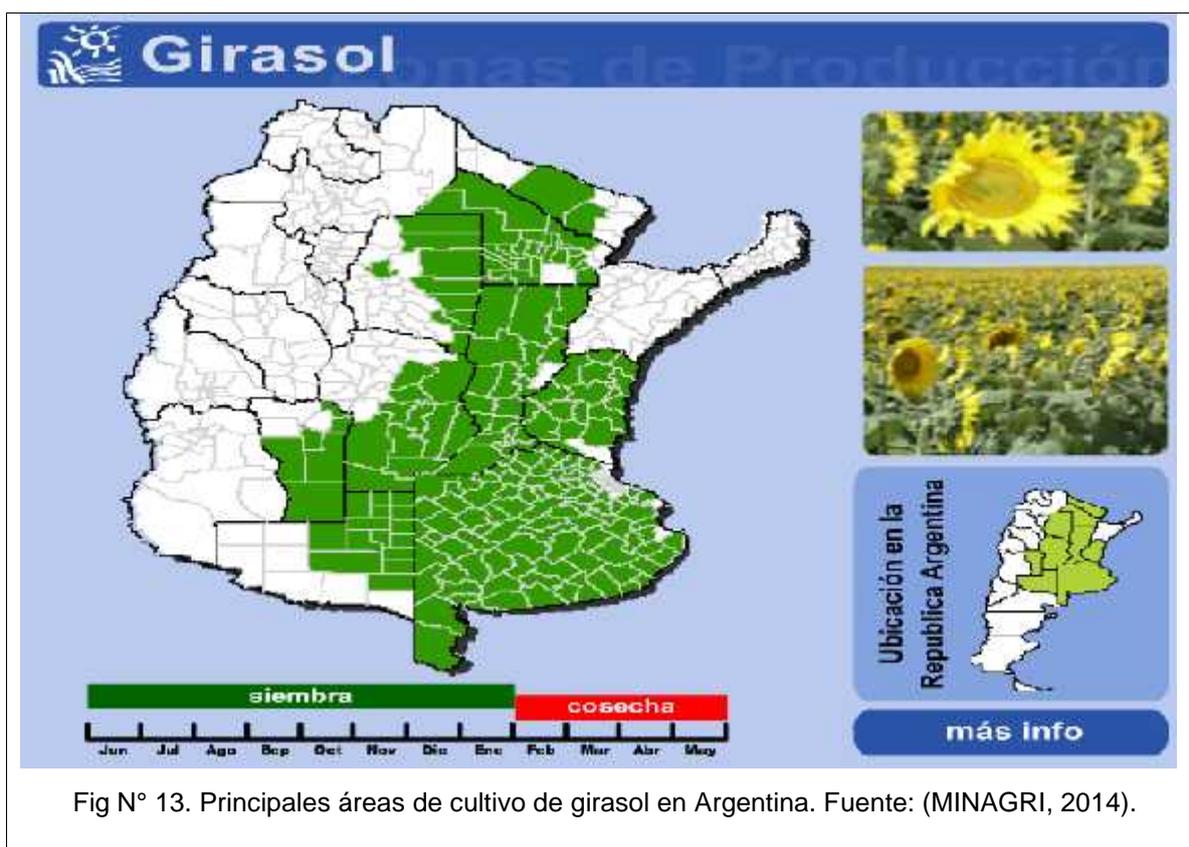


Fig N° 13. Principales áreas de cultivo de girasol en Argentina. Fuente: (MINAGRI, 2014).

En la campaña 2013/2014 Argentina tuvo una superficie sembrada de 1.313.195 hectáreas, de las cuales se cosecharon 1.261.640 hectáreas, con una producción total de 2.063.410 toneladas, lo que equivale a un rendimiento por hectárea de 1.635 Kg. (MINAGRI, 2014) (Fig N° 14). La producción mundial de girasol se presentó en baja para la campaña agrícola 2014/2015, ello a partir de una disminución de la superficie implantada en la UE, Rusia y Turquía, lo cual no ocurrió en nuestro país y en EEUU donde se esperan incrementos en el área, pero que no compensaría la reducción a nivel mundial, a esto hay que sumar una tendencia en baja de los rendimientos en Ucrania. Todo ello, sumado a un aumento en la demanda de Medio Oriente, África del Norte, China e India, señalan que se puede esperar un incremento en el comercio de aceite de semillas de girasol a nivel mundial (Oilseeds, 2014). Ante este panorama, se espera que este cultivo a nivel nacional mejore su situación y con ello los sectores económicos como la industria semillera e indirectamente a la industria aceitera y sus complementarias como por ejemplo el biodiesel. Se debe tener presente que la cadena del girasol moviliza aproximadamente U\$S 1402 millones y produce un valor agregado de U\$S 650 millones anuales.

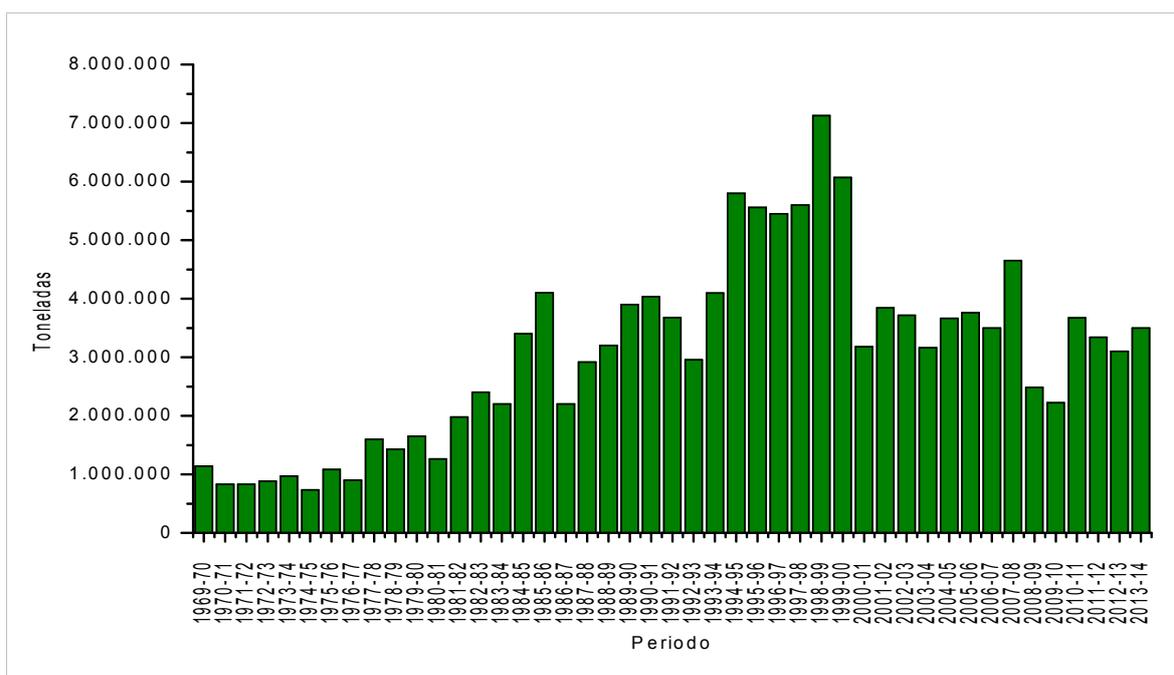


Fig N° 14. Producción de girasol en Argentina 1969-2014 Fuente: (MINAGRI, 2014; Informativo semanal, Bolsa de Comercio de Rosario, Enero 2014).

El siglo XXI comenzó con una gran expansión del cultivo de soja, lo que incidió negativamente en el crecimiento del cultivo del girasol. En las últimas cinco campañas (2009/13) la superficie implantada con girasol fue de 1.625.865 ha., con una producción total media de 2.882.426 toneladas (MINAGRI, 2014). En los últimos años, debido al avance de la soja, el cultivo de girasol ha sumado áreas marginales al sistema agrícola argentino (Adreani, 2008). Estas zonas se caracterizan por un régimen hídrico con ciertas particularidades tales como deficiencia hídrica durante el ciclo de cultivo e irregularidad en la distribución de las precipitaciones ocurridas en un determinado año. Asimismo, el uso generalizado de fertilizantes químicos produjo cambios físico-químicos en suelos y napas, potenciando los efectos de la sequía. A nivel regional (región pampeana sub-húmeda-semiárida), el reemplazo por soja en zonas tradicionales y de altos potenciales de rinde, desplazó a dicho cultivo a áreas marginales (Adreani, 2008), exponiéndolo a etapas de estrés hídrico durante el ciclo del cultivo, aun siendo el girasol relativamente tolerante a sequía debido a la capacidad de su sistema radical de absorber agua de horizontes profundos del suelo, sin limitación de penetración de las raíces. En cualquier estadio de desarrollo de la planta, un déficit de humedad en el suelo puede tener un impacto negativo sobre el rendimiento del girasol, pero la severidad del efecto de la sequía depende del estadio de desarrollo en el que se encuentren las plantas. Las mayores reducciones del rendimiento se observan cuando la sequía ocurre desde el período de floración hasta la maduración de las semillas. Los efectos de la sequía sobre la calidad de las semillas de girasol son mayores después de la floración (Robel, 1967).

Recursos genéticos de girasol y su caracterización

Aunque se ha avanzado considerablemente para aumentar el rendimiento de los cultivos a través del mejoramiento convencional, el objetivo de mejorar la resistencia de los cultivos a las presiones abióticas tiene un éxito limitado debido al complejo multigénico, naturaleza de los caracteres y la variación genética en el estrecho banco de genes de los principales cultivos de importancia agronómica. Se ha demostrado que numerosos genes y proteínas afectan la tolerancia a condiciones de estrés en una gran variedad de especies de plantas, que en conjunto componen un complejo rompecabezas con una gran cantidad de elementos individuales integrantes de un modelo holístico (Yu y Buckler, 2006; Wright, 1978). El uso de especies silvestres como fuente de recursos genéticos para tolerancia a estrés es un proceso muy laborioso, altamente demandante en tiempo y por otra parte conlleva el riesgo de introducción de genes no deseables ligados a los genes de tolerancia introgressados. (Tajima y col., 1983; Tang y col., 2003; Van y col., 2005).

Los bancos de germoplasma ofrecen una valiosa fuente de diversidad alélica para el futuro mejoramiento genético de los cultivos. En Argentina, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) es sede del Banco base de germoplasma de girasol en EEA Balcarce y del Banco activo en la EEA Manfredi.

Para un aprovechamiento óptimo de los recursos genéticos, la caracterización fenotípica de los materiales conservados (resistencia a patógenos, índices de calidad química, nutricional y rendimiento, entre otros), debe ser acompañada por la caracterización genotípica de los mismos (Jansson y Buckler, 2007). Para completar la compleja constitución del germoplasma cultivado, la dinámica de co-evolución implicó que los mejoradores apelaran frecuentemente a cruzamientos amplios buscando diversidad genética, incluyendo especies silvestres emparentadas para incorporar genes de resistencia, los cuales suelen venir acompañados de amplios segmentos cromosómicos (Anderson y col., 2004; Ariel y col., 2007). El método tradicional para la identificación de cultivares, basado en características morfológicas de las plantas, depende de las condiciones ambientales, del estado nutricional y de salud de los individuos analizados (Hvarleva y col., 2007).

En la actualidad, la evaluación precisa de la diversidad genética y el control de los genotipos usados en los programas de mejoramiento depende del desarrollo y aplicación de marcadores moleculares confiables. Los genotipos cultivados actualmente, son el resultado directo de la acumulación de alelos benéficos en genes que controlan caracteres de interés agronómico. Estos caracteres genéticos pueden estar controlados por uno o pocos genes, o poseer un control complejo que involucra muchos genes, denominados loci de caracteres cuantitativos o QTL (Quantitative Traits Loci), a menudo

afectados por el ambiente. Los marcadores moleculares ligados genéticamente a un QTL de interés aumentan la eficiencia del mejoramiento a través de la selección indirecta e incrementan la capacidad de seleccionar grupos de genes de resistencia favoreciendo la acumulación de estos (Asíns, 2002). Un aspecto importante en la detección de QTL por medio de marcadores genéticos, radica en la necesidad de tener una población que se encuentre en desequilibrio de ligamiento, caso contrario, los alelos de los *loci* marcadores y de los poligenes ocurrirán en combinaciones equivalentes y presentaran distribuciones independientes impidiendo, por lo tanto, la detección de los QTL de interés. Por esta razón es necesaria la generación de poblaciones especiales, como poblaciones derivadas de retrocruzas, F_2 , F_3 , líneas endocriadas recombinantes (RILs), entre otras (Schuster y Cruz, 2004). La disponibilidad de un gran número de marcadores (loci) polimórficos, no afectados por el medio ambiente, neutros, sin efectos deletéreos y cuya herencia puede determinarse con relativa facilidad, simplificó enormemente los análisis genéticos en especies vegetales y animales (Biasutti y Galiñanes, 2001; Meksem y Kahl, 2005).

Un marcador genético es un carácter cuantificable que puede detectar variación ya sea en una proteína o en una secuencia de ADN. Una diferencia, bien sea fenotípica o genotípica, puede actuar como marcador genético si identifica en un individuo características del genotipo, del fenotipo o de ambos y si además, puede hacerse seguimiento a su herencia a través de varias generaciones (Nordborg y col., 2002; Plunknett y col., 1987; Gevaert 2011).

Los polimorfismos basados en proteínas han sido de gran utilidad en las investigaciones realizadas en plantas, pero con el desarrollo de las tecnologías basadas en ADN, la investigación en esta área se ha visto favorecida con la disponibilidad de una mayor cantidad de marcadores, posibilitando una mayor cobertura del genoma de una especie (Pérez-Molphe-Balch y col., 1996). Los marcadores moleculares son simplemente segmentos de ADN con una ubicación específica en un cromosoma (punto de referencia) cuya herencia puede seguirse en individuos de una población. La secuencia puede pertenecer a regiones codificantes (genes) o sin función conocida. El marcador ideal debería ser altamente polimórfico (dentro y entre especies), de herencia mendeliana no epistática, deben encontrarse en número ilimitado, insensible a los efectos ambientales, co-dominante (capaz de diferenciar individuos heterocigotas de homocigotas), de rápida identificación, simple análisis y de detección en los estadios tempranos de la planta. Por lo tanto, a la hora de realizar un proceso de caracterización y/o selección de un determinado cultivo o variedad, este proceso se vuelve más eficiente a través del uso de marcadores moleculares, definidos como caracteres que presentan

polimorfismo o variabilidad experimentalmente detectable en individuos de una población segregante y un tipo de herencia predecible según las leyes de Mendel.

En las últimas dos décadas el uso de marcadores de ADN para el estudio de diversidad genética de cultivos comenzó a ser rutinario. Las técnicas que se han desarrollado otorgaron mayor precisión, rapidez y economía para la evaluación de variaciones genéticas. Los distintos marcadores (RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism* o Polimorfismo de Longitud del Fragmento Digerido, RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA* o Polimorfismo en la Amplificación Aleatoria de ADN, AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism* o Polimorfismo en la Longitud del Fragmento Amplificado, SSR: *Simple Sequence Repeat* o Secuencias Repetidas Simples, SNP: *Single Nucleotide Polymorphisms* o Polimorfismos de Nucleótido Simple e Indel: *Insertion/Deletion* o pequeñas inserciones o deleciones) difieren con respecto a características tales como abundancia en el genoma, nivel de polimorfismo detectado, especificidad de los loci analizados, reproducibilidad, requerimientos técnicos e inversión económica (Young y Tanksley, 1989; Gedil y col., 2001; Gianniny y col., 2004; Pejic y col., 1998; Deshmukh y col., 2010). Los marcadores de ADN tienen aplicaciones diversas como, la identificación de caracteres genéticos simples, el análisis de loci de caracteres cuantitativos, la aplicación de estrategias de mejoramiento molecular a través de la selección e introgresión asistida por marcadores moleculares y la construcción de mapas de ligamiento genético.

La identificación de los loci que determinan los componentes genéticos de la germinación de las semillas, permitiría a los fitomejoradores seleccionar específicamente los alelos que contribuyen a la mejora en la germinación de las semillas. La disponibilidad de marcadores moleculares específicos de locus para la germinación de la semilla sería de gran beneficio, proporcionando el potencial para la detección más rápida de combinaciones beneficiosas de alelos en los programas de mejoramiento.

Los mapas basados en marcadores moleculares han sido desarrollados para la mayoría de las principales especies cultivadas. Estos mapas permiten la localización de loci que están relacionados con caracteres agrónomicamente importantes, permiten hacer mapeo comparativo y selección asistida por marcadores y clonado posicional, dependiendo del nivel de saturación del mismo. Existen actualmente numerosos ejemplos de mapeo de QTL en diversas especies (Allinne y col., 2009; Baxter y col., 2005; Causse y col., 2004; Doebley y col., 2006; Ebrahimi y col., 2008; Haddadi y col., 2010; Poormohammad Kiani y col., 2007; Poormohammad Kiani y col., 2009) entre otros. En girasol, los marcadores moleculares han sido empleados para la caracterización genética de líneas, cultivares y especies silvestres (Brunel, 1994; Burke y col., 2002; Ellis y col., 2006; Liu y Burke, 2006; Paniego y col., 2002; Solodenko y Sivolap, 2005; Tang y Knapp,

2003; Yu y col., 2002). Las primeras descripciones del mapa de ligamiento de girasol fueron reportadas en 1995 por Gentzbittel y col., (1995) y Berry y col., (1995), ambas basadas en la segregación de marcadores de tipo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Desde entonces, diversos mapas de ligamiento de diferente longitud, densidad y tipo de marcador molecular han sido desarrollados para girasol, ya sea basados en RFLP (Berry y col., 1996, 1997; Jan y col., 1998; Gentzbittel y col., 1999), RAPD (Rieseberg y col., 1993; Rieseberg, 1998) AFLPs (Peerbolte y Peleman 1996; Flores Berrios y col., 2000; Gedil y col., 2001; Al-Chaarani y col., 2002), DALPs (Direct Amplification of Length Polymorphisms) (Langar y col., 2003), o TRAPs (Target Region Amplification Polymorphisms), que usan información contenida en las bases de datos de EST para generar marcadores polimórficos alrededor de secuencias génicas blanco (Hu y Vick 2003). Del mismo modo, el desarrollo de marcadores tipo microsatélite (SSR) para el cultivo posibilitó la generación de mapas públicos de referencia, capaces de unificar los mapas desarrollados previamente (Flores Berrios y col., 2000; Paniego y col., 2002, 2007; Tang y col., 2002; Yu y col., 2003; Al-Chaarani y col., 2004; Kiani y col., 2007). Todos los mapas genéticos desarrollados hasta el momento se encuentran accesibles a través de a base de datos cMap de girasol (<http://www.sunflower.uga.edu/cmap/>).

Estos mapas basados en SSR han sido usados para identificar loci responsables de la determinación de caracteres cuantitativos (QTL) involucrados en numerosos rasgos de importancia agronómica (Tang y col., 2006; Kiani y col., 2007; Wills y Burke 2007; Ebrahimi y col., 2008; Poormohammad Kiani y col., 2009; Haddadi et al. 2010), así como también para investigar variaciones entre la estructura genómica de girasol y la de otras especies del género *Helianthus* (Burke y col., 2002; Heesacker y col., 2008).

En el último tiempo, las nuevas tecnologías de secuenciación y plataformas de genotipificación de alta procesividad han permitido la interrogación simultánea de miles de SNPs distribuidos a lo largo del genoma (Gupta y col., 2008), haciendo posible de este modo el desarrollo de mapas genéticos altamente saturados. Un panel de genotipificación de 10K SNPs de tecnología Infinium de Illumina fue desarrollado recientemente (Bachlava y col., 2012) y utilizado en diversas poblaciones, con el fin de constituir un mapa de ligamiento consenso del genoma de girasol (Bowers y col., 2012). Este mapa genético de alta densidad tiene el potencial de facilitar el ensamblado de secuencias del genoma de girasol (Kane y col., 2011), al tiempo que permite la caracterización genotípica eficiente de colecciones de germoplasma, y provee una herramienta importante para estudios genómicos en el cultivo.

El mapeo genético, integrando la genotificación y fenotipificación de un número elevado de individuos, implica una tarea tediosa y relativamente costosa, por lo cual una opción es realizar una agrupación de individuos basada en expresiones fenotípicas

extremas, ya sea de alta o baja expresión, lo cual reduce la extracción de ADN a dos grupos y de esta manera el proceso de genotipificación de las plantas se reduce a sólo dos muestras de ADN a analizar en lugar de tener que analizar el ADN por separado de cada individuo. Este procedimiento se lo conoce como análisis de segregantes agrupados (Bulked Segregant Analysis o BSA) y fue desarrollado por Michelmore y col., (1991) con RAPDs en lechuga (*Lactuca spp.*). Esta técnica ha sido utilizada para la identificación de marcadores moleculares ligados a un carácter monogénico, dominante o recesivo (Fig N° 15).

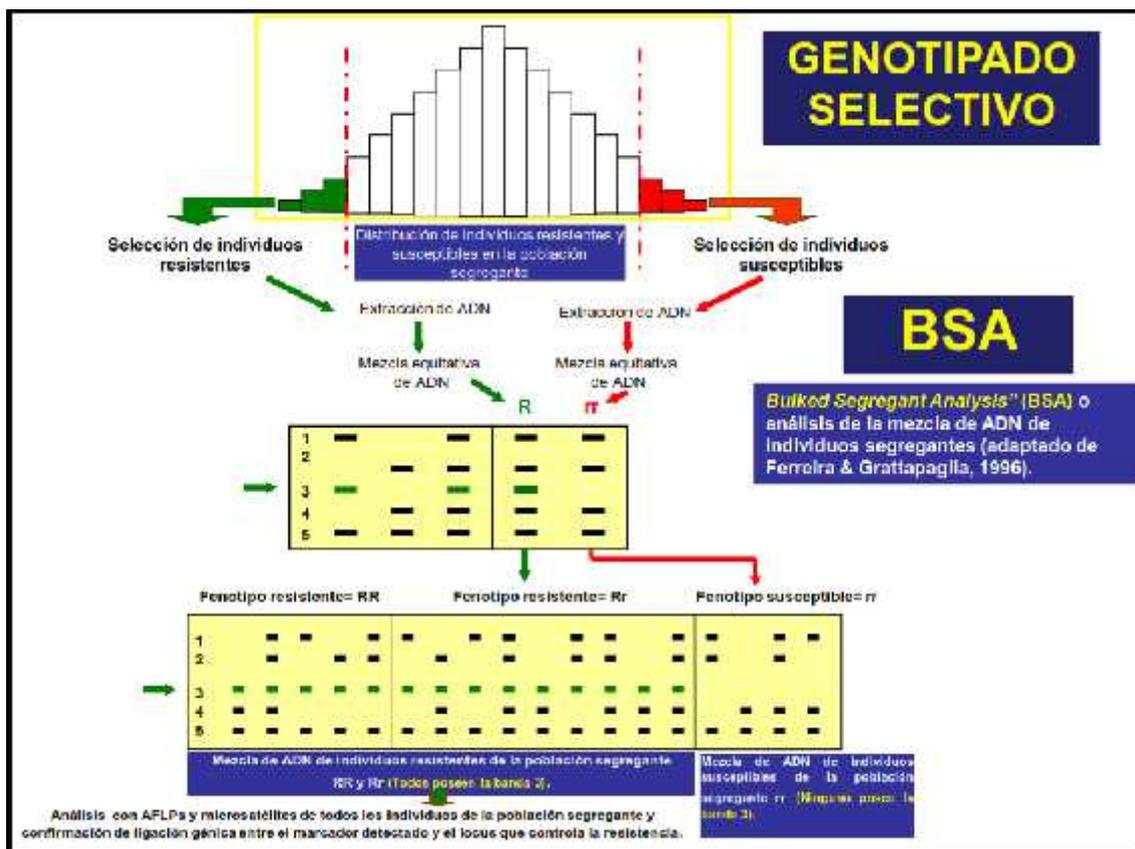


Fig N° 15. Representación diagramática del empleo de BSA para mapear genes de resistencia a enfermedades. (Marcador dominante) (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

El método consiste en comparar 2 grupos de muestras de ADN de individuos pertenecientes a una población segregante. En cada grupo fenotípico los individuos son idénticos para un carácter o gen de interés pero no para otros genes, siendo el comportamiento para el carácter en evaluación contrastante. La aplicación de BSA en genomas pequeños como el de *Saccharomyces cerevisiae*, permitió descubrir un gen de la xilitol deshidrogenasa, responsable de la utilización de xilosa (Wenger y col., 2010). Recientemente, BSA se ha aplicado para los rasgos cuantitativos, como QTL para tolerancia al calor en arroz (Zhang y col., 2009), tolerancia a estrés salino en algodón

egipcio (El-Kadi y col., 2006), la tolerancia a la sequía en el trigo y el maíz (Altinkum y Gozukirmizi, 2003; Quarrie y col., 1999; Kanagaraj y col., 2010; Venuprasad y col., 2009; Vikram y col., 2011), así como QTL para rendimiento de grano en condiciones de sequía en el maíz y arroz (Quarrie y col., 1999; Venuprasad y col., 2009, 2011; Vikram y col., 2011).

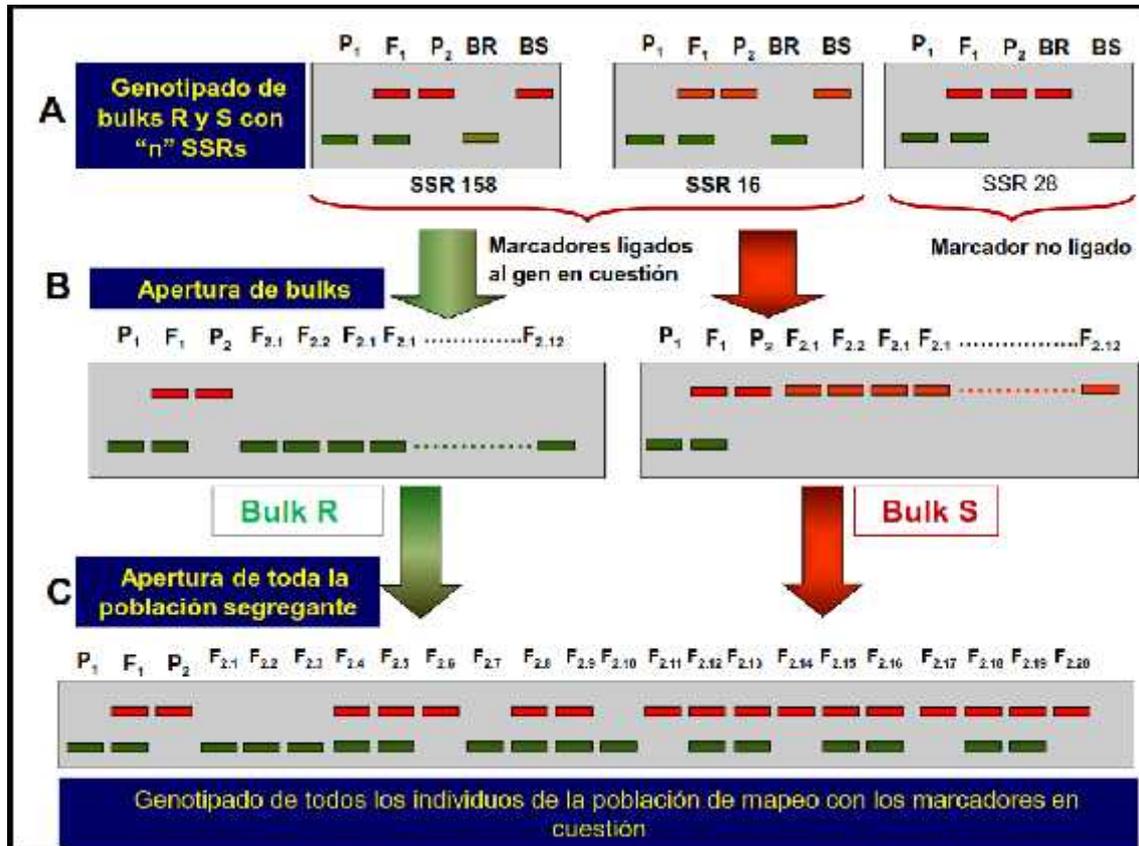


Fig N° 16. BSA. Ejemplo para un marcador co-dominante (microsatélite) (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

En la figura N° 16 se muestra el esquema de uso de BSA para el mapeo de genes candidatos para un carácter de interés como por ejemplo resistencia a enfermedades. La selección de individuos para la realización de los bulks, es realizada mediante la identificación de dos fenotipos extremos del carácter (resistencia y sensibilidad (R o S) de una población segregante. Tanto el ADN de las líneas progenitoras, como el de los dos bulks son analizados con un cierto número de marcadores moleculares, con una posterior selección de aquellos que presenten la presencia de bandas en una muestra y la ausencia de estas bandas en otra muestra. Asimismo es posible detectar, preliminarmente ligamiento genético entre un marcador polimórfico y el locus diana. Posteriormente ese ligamiento es confirmado mediante el análisis de co-segregación entre un marcador y el grado de resistencia en todos los individuos de la población

segregante. Confirmado el ligamiento, es posible calcular una frecuencia de recombinación entre un marcador y el locus diana. La utilización de esta técnica no se limita a la detección de genes de resistencia a enfermedades. También es posible aplicar esta estrategia para identificación de genes de efecto mayor que condicionan diversos caracteres de interés agronómicos, tales como resistencia a diversos tipos de estrés abióticos (salinidad, sequia, acidez etc., Cai y col., 2003; Asnaghi y col., 2004; He y col., 2010; Geng y col., 2016).

HIPÓTESIS PROPUESTA

La evaluación fenotípica de variables fisiológicas y hormonales en una población de mapeo compuesta por 105 familias $F_{2:3}$ de girasol, derivadas del cruzamiento entre las líneas endogámicas parentales R432 y B59, (tolerante y sensible a sequía respectivamente), expuestas a condiciones de estrés hídrico en germinación y/o crecimiento y la evaluación genotípica mediante marcadores moleculares neutros de las plantas F_2 de dicha población, posibilitará identificar regiones genómicas responsables de la tolerancia al estrés hídrico.

Asimismo, es posible asociar la respuesta fisiológica y hormonal de las familias $F_{2:3}$ contrastantes a estrés hídrico con patrones de comportamiento en respuesta a condiciones de estrés hídrico durante germinación y crecimiento vegetativo de líneas recombinantes F_6 .

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo es evaluar la respuesta a estrés hídrico en una población de mapeo $F_{2:3}$ de girasol (*Helianthus annuus* L.) derivada del cruzamiento de dos líneas endocriadas contrastantes para el carácter tolerancia a sequía, durante las etapas de germinación y crecimiento vegetativo e identificar regiones gnómicas asociadas al carácter

Teniendo en cuenta que la germinación y el crecimiento vegetativo temprano son estadios críticos para lograr el establecimiento de la planta y que el crecimiento vegetativo define la superficie foliar transpirante, se propone evaluar variables fisiológicas y hormonales en plántulas de 11 días de edad pertenecientes a familias $F_{2:3}$ y en líneas endocriadas recombinantes F_6 (RILs) provenientes del cruzamiento de las líneas endocriadas de girasol en la fase fenológica de crecimiento vegetativo (V8), caracterizadas a campo y laboratorio como tolerante (R432) y sensible (B59) a estrés hídrico (Andrade y col. 2008), respectivamente.

Con la finalidad de definir asociaciones de respuestas fisiológicas en las plantas de girasol sometidas a condiciones de estrés hídrico se propone un análisis conjunto de las determinaciones fenotípicas (fisiológicas y hormonales) obtenidas de la evaluación de las familias segregantes $F_{2:3}$ con comportamiento contrastante a la sequía y de tales líneas en F_6 ,

Asimismo, para la identificación de regiones genómicas asociadas al carácter se propone un abordaje genético mediante la utilización de marcadores moleculares neutros destinado a analizar los grupos de individuos F_2 extremos (tolerantes y sensibles a estrés hídrico) pertenecientes a la población de mapeo, utilizando el análisis de muestras de ADN agrupadas de individuos segregantes (BSA),

OBJETIVOS ESPECÍFICOS PROPUESTOS

1. Evaluación comparativa de metodologías para la determinación de fitohormonas por espectrometría de masa en tándem acoplada a cromatografía líquida de alta presión (LC-MS/MS).
2. Determinar el poder germinativo relativo y peso seco relativo en las familias $F_{2:3}$ (R432 x B59), generadas a partir del cruzamiento de líneas endocriadas parentales tolerantes y sensibles al estrés hídrico respectivamente, sometidas a restricción hídrica.
3. Determinar y comparar los niveles endógenos de ABA, JA y SA en las familias $F_{2:3}$ (R432 x B59), sometidas a restricción hídrica.
4. Evaluar marcadores polimórficos *SSR* (*Simple Sequence Repeats*) en germoplasma de girasol y caracterización genotípica de las líneas endocriadas parentales, B59 y R432 (sensible y tolerante al estrés hídrico, respectivamente).
5. Detectar polimorfismos mediante marcadores *SSR*, en muestras de ADN agrupadas (*bulks*) de individuos F_2 extremos para el carácter tolerancia al estrés hídrico.
6. Determinar variables ecofisiológicas en líneas endocriadas recombinantes (RILs) F_6 (R432 x B59), sometidas a restricción hídrica.
7. Determinar y comparar los niveles endógenos de ABA, JA y SA en RILs (R432 x B59), sometidas a restricción hídrica.
8. Integrar los resultados fenotípicos de las evaluaciones a estrés de las familias $F_{2:3}$, con las determinaciones de los *SSR* en la población F_2 (B59 x R432) mediante el uso análisis de segregantes agrupados (Bulked Segregant Analysis o BSA).

9. Evaluar asociaciones del comportamiento fenotípico de los grupos “bulks” contrastantes a estrés hídrico de las familias $F_{2:3}$ durante el estadio de plántula y de sus líneas RILs (F_6) durante crecimiento vegetativo pre-antesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

SECCIÓN A.

Evaluación de la metodología utilizada en la determinación de hormonas vegetales.

A.1. Material vegetal.

Las semillas pertenecientes al híbrido Paraíso 24 (Nidera) se colocaron en bandejas plásticas sobre arena fina previamente esterilizada en un número de 25 por repetición. El contenido hídrico del sustrato en el momento de la siembra fue de 60% de la capacidad de campo, realizándose posteriores riegos por capilaridad 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.

Las bandejas fueron colocadas en una cámara de crecimiento CONVIRON E15 programada con 16 h de iluminación a 28°C y 8 h de oscuridad a 20°C. En estos ensayos se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 4 repeticiones.

Se cosecharon plántulas normales (ISTA, 2006), con 10 días de edad, las mismas fueron colocadas en N₂ líquido y luego liofilizadas, constituyendo cada bandeja una réplica biológica.

A.2. Extracción y purificación de hormonas vegetales.

Se evaluaron metodologías de extracción y purificación usando columnas de intercambio aniónico (Sephadex A-25), ello por la técnica de Miersch y col., (2008) para determinar ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA), de partición líquido-líquido según la técnica de Durgbanshi y col., (2005) para cuantificar JA, SA y ácido abscísico (ABA) y mini-columnas de intercambio aniónico amino (NH₂), según la técnica de Luna y col., (1993) para evaluar ABA.

A.2.1 Método de extracción y purificación de Durgbanshi A y col., (2005).

Para la extracción se utilizó 0.2 g de peso seco del material a procesar al cual se le añadió nitrógeno líquido en un mortero y se realizó la extracción con 5 ml agua desionizada y luego 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 (²H₂) SA. Se realizó la homogenización por Ultra-Turrax T50 (IKA, Germany) durante 40 s y luego se lo centrifugo (15 min a 5000 rpm). Se colectó el sobrenadante en tubos falcón y se ajustó 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 s. Luego de la formación de las fases se descartó la fase

acuosa y se tomó la fase orgánica, este paso se realizó 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 se filtró 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 fueron disueltas en MeOH al 100% e inyectadas al cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) Alliance 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 y luego de 1 min el sistema fue restituido a las condiciones iniciales de corrida. El flujo de corrida fue de 0.2 ml min⁻¹ y la columna utilizada fue de fase reversa C18 de 100 mm x 2,1 mm 3-m., de marca RESTEK.

A.2.2 Método de extracción y purificación de Miersch O. y col., (2008).

Para la extracción se utilizó 0.2 g de peso seco de material a procesar al cual se le añadió nitrógeno líquido en un mortero y se realizó la extracción con 10 ml de MeOH y luego se transfirió la mezcla obtenida a un tubo falcón, donde se agregaron 50 ng de los estándares internos deuterados (²H₆) JA, (²H₆) ABA y (²H₂) SA Se realizó la homogenización por Ultra-Turrax T50 (IKA, Germany) durante 40 s y a continuación se filtró a través de una columna con un filtro de celulosa evaporándose luego a sequedad. Para la purificación se utilizó el extracto del filtrado y el mismo fue pasado a través de columnas de DEAE-Sephadex A25 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Suecia). El extracto seco obtenido se resuspendió en 10 ml de MeOH y purifico en una columna conteniendo 3 ml de DEAE-Sephadex A25 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Suecia) en MeOH 100%, previamente lavada con 10 ml de MeOH 100%. Luego se agregó la muestra a la columna, diluida en un volumen máximo de 10 ml de MeOH. La elución se realizó con 3 ml de MeOH y 3 ml de 0.1 N AcH en 100% MeOH, descartándose ambas fracciones. Posteriormente se agregaron 3 ml 1 N AcH en 100% MeOH y 3 ml de 1.5 N AcH en 100% MeOH. Estas dos fracciones donde eluyen los compuestos ácidos como el JA y SA, se recolectaron y llevaron a sequedad en evaporador rotativo. Las muestras fueron disueltas en MeOH al 100% e inyectadas al HPLC Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, USA.) según las condiciones indicadas con anterioridad.

A.2.3 Método de extracción y purificación de Luna MV y col., (1993).

Para la extracción se utilizó 0.2 g de peso seco del material a procesar al cual se le añadió nitrógeno líquido en un mortero y se realizó la extracción con 20 ml de buffer imidazol (pH 7) como solvente de extracción. Se adicionó 2, 6-di-tert-butil-p-kresol (BHT)

como antioxidante y como estándar interno deuterado se agregó 50 ng de ($^2\text{H}_6$) ABA. La reacción se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C a fin de completar la extracción y permitir la estabilización del estándar. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 5000 rpm, se recogió el sobrenadante y se procedió a la evaporación de la fase isopropanol conservando la fase acuosa. La purificación de la fase acuosa se realizó a través de una mini-columna de intercambio aniónico conteniendo sílica gel como soporte sólido (BAKERBOND speTM Amino (NH_2), Mallinckrodt Baker, Inc., USA), y previamente activada con MeOH 100%, agua desionizada y buffer imidazol 0.02 M. Se cargó la muestra en la columna y secuencialmente fue eluida con 6 ml de hexano e iguales cantidades de acetato de etilo y acetonitrilo. Estas fracciones fueron descartadas. Posteriormente se eluyó el ABA con una mezcla metanol-acético (95:5 v/v). Esta fracción se recolectó y llevó a sequedad en evaporador rotativo al vacío. Las muestras fueron disueltas en MeOH al 100% e inyectadas al HPLC Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, USA.) según las condiciones indicadas con anterioridad.

A.3. Identificación y cuantificación de hormonas vegetales.

Se realizó a través de un espectrómetro de masas con un triple cuádrupolo (Quattro Ultima, Micromass, Manchester, Reino Unido), acoplado al HPLC Alianza 2695 (Waters, Milford, MA, EE.UU).

Se debieron realizar ensayos preliminares a fin de determinar las condiciones óptimas para cada una de las fitohormonas evaluadas, las mismas consistieron en evaluar:

a) Fuente de ionización: Se evaluó el sistema de electrospray en ionización negativa y positiva; ensayando distintos parámetros asociados a la misma que consisten en ajustar el Voltaje del capilar, energía de cono, temperatura de fuente y de desolvatación, flujo de N_2 gaseoso en cono y desolvatación.

b) Energía de Colisión:

c) Modos de identificación y cuantificación: Se evaluaron los diferentes métodos de identificación y cuantificación para ABA, JA y SA, con una inyección en el LC-MSMS por muestra biológica Tales métodos son **Scan** (Detección de barrido de espectro de iones), **SIR** (Reacción selectiva de iones), **Daughter Scan** (Fragmentos generados de la ruptura de compuestos parentales) y **MRM** (Monitoreo de Reacciones Múltiples). El software utilizado en el control del LC-MS/MS fue el MassLynx TM v. 4.1, (Micromass, Manchester, Reino Unido).

A.4. 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 ($p = 0.05$). El software empleado fue STATGRAPHICS Plus Versión 5.1 (2002).

SECCIÓN B.

Caracterización fenotípica.

B. 1. Evaluación fenotípica de familias $F_{2:3}$

B.1. 1. Material vegetal.

Se trabajó con líneas endocriadas de girasol tolerante (R432) y sensible (B59) al estrés hídrico, cedidas por el programa de mejoramiento genético de girasol perteneciente a la EEA Manfredi-INTA. Tales líneas fueron seleccionadas a partir de ensayos a campo y en laboratorio (Andrade y col., 2009). A partir de estas líneas endocriadas contrastantes a estrés hídrico y mediante el cruzamiento de las mismas, se obtuvo la generación híbrida F_1 . A partir de la autofecundación controlada de ésta se obtuvieron las plantas F_2 , finalmente sucesivas generaciones de autofecundación controlada posibilitaron obtener las familias $F_{2:3}$ y las líneas endocriadas recombinantes F_6 (RILs) (Bert y col., 2004); Rachid Al-Chaarani y col., 2002).

B.1.1. 2. Condiciones de crecimiento de líneas parentales y sus Familias $F_{2:3}$.

Las semillas pertenecientes a cada familia $F_{2:3}$ (R432 x B59) (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 por capilaridad 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.

Los tratamientos de estrés hídrico fueron realizados con una solución de 400 mM de manitol generados al momento de la siembra, llevando al sustrato a un 60 % de la capacidad de campo con la solución antes mencionada, generando un potencial osmótico de -0,98 Mpa. En este caso, también se realizaron riegos por capilaridad a los 4, 7 y 10 días de la siembra con manitol 400 mM.

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

B.1.1.3 Parámetros de caracterización fenotípica de líneas parentales y sus familias

F_{2:3}.

B.1.1.3.1 Evaluación del recuento final de germinación.

Se realizó la evaluación del poder germinativo relativo al control (PGR) de 105 familias F_{2:3}. El Poder Germinación relativo al control (PGR), permite comparar entre las diferentes líneas parentales y sus familias F_{2:3} el cual se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{PGR (\%)} = \text{RFG}_{400\text{mM}} (\%) / \text{RFG}_{\text{Control}} (\%) \times 100$$

Siendo RFG: Recuento Final de Germinación.

La evaluación del poder germinación relativo (PGR), se realizó a los 11 días post-siembra en aquellas plántulas cuya longitud de la parte aérea y/o radical sea de 0.5 cm o mayor, descartándose las que presenten distintas anomalías según lo tipificado en el Handbook For Seedling Evaluation, editado por el International Seed Testing Association (ISTA 2006). Desde el punto de vista de la tecnología de semillas, germinación es entendida 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 en condiciones favorables de crecimiento, entendiéndose como planta normal a aquellas plántulas que presenta la capacidad de continuar con su desarrollo (Peretti 1994; ISTA 2006).

B.1.1.3.2 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 (PSR) a través de la siguiente fórmula:

$$\text{PSR (\%)} = \text{PS}_{400\text{mM}} (\text{mg}) / \text{PS}_{\text{Control}} (\text{mg}) \times 100$$

B.1.2 Evaluación de crecimiento de líneas F₆ (R432 x B59).

B.1.2.1 Material vegetal.

Las RILs F₆ evaluadas son el resultado de las sucesivas autofecundaciones de líneas F_{2:3}. A partir de ello, alguna de las familias F_{2:3} que se encontraron en los extremos

tolerantes ó sensibles a estrés hídrico (según PGR), no pudieron ser evaluadas en F₆ por no contarse con suficiente cantidad de semillas.

B.1.2.2 Condiciones de crecimiento de RILs.

A fin de determinar la respuesta de las distintas líneas F₆ (R432 x B59) ante condiciones de estrés hídrico impuesto en estado vegetativo, se utilizó el método de Pereyra-Irujo y col (2007). Tal metodología consiste en colocar las semillas en macetas de caño de PVC en invernadero con ventilación y calefacción automatizadas y fotoperiodo de 14 h. Las macetas tenían una capacidad de 2600 cm³ (10.3 cm de diámetro y 32 cm de alto). Para un correcto manejo del agua, las macetas se taparon con nylon y con 50 g de perlita, para que solo ocurra transpiración por parte de la planta y disminuir al mínimo la evaporación del suelo. Se utilizó como sustrato suelo homogéneo de la misma estación experimental (INTA Manfredi). Las macetas se colocaron sobre mesadas a una distancia no menor de 18 cm entre ellas dentro de una misma fila y de 23 cm entre filas (tomados desde el centro de la maceta). Una vez colocado el sustrato dentro de las macetas, se colocó agua hasta obtener la capacidad de campo del mismo, condición en la cual se realizó la siembra de las de los distintos genotipos a evaluar.

B.1.2.3 Caracterización fenotípica de RILs.

Los tratamientos realizados consistieron en dos regímenes hídricos contrastantes:

a) Control: Contenido de humedad próximo a Capacidad de Campo (CC) durante todo el ensayo. En este tratamiento, el potencial agua del suelo se mantuvo en -0.05 MPa mediante el pesaje de las macetas y riegos controlados.

b) Imposición de estrés hídrico en período vegetativo tardío (estadio de 8 hojas expandidas: V₈). El estrés fue impuesto desde el estadio fenológico V₈ y por 15 días posteriores. El potencial hídrico previo al inicio del déficit hídrico fue de -0.05 MPa y en el momento en que las plantas alcanzaron el estadio V₈, se suspendió el riego hasta que el potencial hídrico del suelo alcanzo a -0.65 MPa. Para acelerar el descenso en el contenido de agua del sustrato y acortar los tiempos de la experiencia, se realizó la siembra de maíz en cada una de las macetas que recibirían el tratamiento de déficit hídrico, una semana después de haber sembrado el genotipo a evaluar, de acuerdo a lo descrito por Pereyra-Irujo y col. (2007). Una vez lograda esta condición se comenzó con el pesaje de las macetas y los riegos correspondientes para mantener el sustrato en un potencial agua de -0.65 MPa. Una vez finalizado el tratamiento, las plantas sometidas a estrés hídrico fueron regadas hasta lograr nuevamente un potencial hídrico de -0.05 MPa. Esto se realizó lentamente, debido a que el suelo seco posee menor conductividad

hidráulica y el agua podría escurrir más fácilmente en las paredes laterales de la maceta. Para alcanzar los pesos objetivos deseados en cada tratamiento se realizó un registro diario del peso de las mismas y el riego correspondiente. El peso objetivo se corrigió aproximadamente cada quince días, con el peso fresco de las plantas de muestreos destructivos y no destructivos. Las variables registradas durante estos ensayos fueron las siguientes:

Fenología: Usando la clave de Schneiter y Miller (1981), semanalmente se analizó el crecimiento de las plantas para determinar así el periodo óptimo para la iniciación del estrés, como se mencionó anteriormente, en estadio V_8 .

Peso fresco: Al finalizar el ensayo se realizó un muestreo destructivo de las plantas sometidas a los distintos tratamientos a las cuales se les determinó peso fresco por planta (g / planta).

Peso seco: Las muestras obtenidas anteriormente se colocaron en estufa de secado hasta obtener peso constante.

Muestreo para análisis hormonal: Al finalizar el período de estrés se toman muestras de tejido (última hoja expandida) para determinación de las hormonas ABA, SA y JA.

B.1.3 Análisis estadísticos.

El análisis estadístico de los resultados, para los caracteres PGR y PSR, se realizó mediante un Análisis de la Varianza (ANOVA), utilizando a posteriori un Test de comparación de medias Tukey ($p = 0.05$). El software empleado fue el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS). Versión 8.11. 1999. (SAS Institute Inc. USA.).

SECCIÓN C.

Determinaciones de hormonas vegetales

C.1. Material vegetal.

Las determinaciones hormonales fueron realizadas en las familias $F_{2:3}$ (R432 x B59) de girasol tolerantes (252, 324, 108, 224, 283 y 117) y sensibles a estrés hídrico (138, 300, 139, 212, 148, 256 y 95), respectivamente según los parámetros evaluados de PGR y PSR. Las condiciones de crecimiento se corresponden con las descritas en el ítem B.1.1. Para el caso de líneas RILs, fueron evaluadas las líneas tolerantes 128, 252, 283 y 224 y sensibles 95, 300, 139, 256 y 148.

C.2. Extracción y purificación de hormonas vegetales.

Las mismas se realizaron para JA, SA y ABA mediante la técnica de Durgbanshi y col., (2005) en plántulas de 11 días de edad, con un total de cuatro repeticiones por cada F_{2:3} analizada. Las muestras fueron disueltas en MeOH al 100% e inyectadas al cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) Alliance 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 min por corrida y luego de 1 min el sistema fue restituido a las condiciones iniciales de corrida lo que permitió que se equilibre la columna. El flujo de corrida fue de 0.2 ml min⁻¹, la columna utilizada fue de fase reversa C18 de 100 mm x 2,1 mm 3-m., marca RESTEK.

C.3. Identificación y cuantificación de hormonas vegetales.

Se realizó utilizando un espectrómetro de masas con un triple cuádruplo (Quattro Ultima, Micromass, Manchester, Reino Unido), acoplado al HPLC mencionado en el párrafo anterior. La fuente de ionización utilizada fue electrospray negativo (ESI-) con un voltaje de capilar: (kVol) 3.25, energía de cono 35, temperaturas de la fuente 120°C y temperatura de desolvatación 350°C, flujo de gas de cono 102 (L/h) y flujo de gas de desolvatación 692 (L/h). Se utilizó para la detección de iones el modo **MRM** (Monitoreo de Reacciones Múltiples), siendo las transiciones utilizadas para ABA 263>153, SA 137>93 y JA 209>59, mientras que para los estándares internos se presentan las siguientes transiciones ABA (²H₆) 269>159, SA (²H₂) 141>97 JA (²H₆) 215>59, y los tiempos de aparición cromatográfica fueron para: ABA de 9,40 min; JA de 14,2 min y SA de 5,6 min. 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, se obtuvieron los valores en pmol. hormona /g. peso seco⁻¹.

C.4 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 = 0.05). El software empleado fue InfoStat. Versión E.

SECCIÓN D.

Caracterización genotípica

D.1. Determinación de polimorfismos de ADN a través de SSR.

D.1.1. Extracción de ADN.

El ADN se extrajo de hojas provenientes de plantas de girasol en estado vegetativo, pertenecientes a las líneas parentales como a las plantas F₂, las cuales fueron utilizadas para realizar el análisis molecular (BSA). Para la extracción de DNA, se utilizaron hojas jóvenes no lesionadas por agentes patógenos ni insectos. Las hojas fueron liofilizadas luego del muestreo y se almacenaron en cámara a 4°C. La extracción se llevó a cabo utilizando el *kit* de extracción *Nucleo Spin Plant II* (Macherey-Nagel, Germany), empleando como agente extractivo el bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) (Hoisington y col. 1994).

D.1.2. Cuantificación del ADN.

El ADN genómico se cuantificó empleando un fluorómetro Versaflúor (Biorad) mediante el uso del reactivo Hoechst N° 33258, estableciendo una curva patrón con estándares de ADN de timo de ternero (Biorad) de concentraciones conocidas. Para determinar la calidad del ADN genómico obtenido se empleó electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,8% (p/v) y tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml), utilizando como referencia concentraciones conocidas de ADN de timo de ternero (Biorad). Se sembró un volumen de muestra de 5 µl, incluyendo 2 µl de buffer de siembra (Ver anexo). La electroforesis se llevó a cabo en buffer TAE 1X a un voltaje constante de 5 Volts/cm durante 20 min. La visualización del ADN se realizó por transiluminación con luz UV, en digitalizador de imágenes acoplado a PC con el programa Gene Quantitive (Biorad).

D.1.3. Amplificación por PCR.

La mezcla de reacción para la amplificación por PCR de todos los individuos estudiados se preparó como se indica a continuación.

<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
Buffer con (NH ₄) ₂ SO ₄ [10X] (Invitrogen)	1,20 µl
MgCl ₂ [50 mM]	0,36 µl
Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) [10 mM]	0,24 µl
Iniciadores Forward+ Reverse [5 µM]	0,30 µl
Taq Polimerasa Platinum (Invitrogen) [5 U/µl]	0,10 µl
H ₂ O Mili-Q o tri destilada estéril	8,80 µl
ADN [15 ng /µl]	1,00 µl

Las amplificaciones se realizaron en placa de 96 pocillos empleando un termociclador GeneAmp system 9700 (*Applied Biosystems*) con el programa de amplificación descrito a continuación.

<u>Etapas del programa</u>	<u>Tiempo</u>
Desnaturalización inicial a 94 °C	4 min
<u>Touchdown (12 ciclos)</u>	
Desnaturalización a 94 °C	45 s
Hibridación a 64 °C (-1°C/ciclo)	45 s
Elongación a 72 °C	45 s
<u>Amplificación (35 ciclos)</u>	
Desnaturalización a 94 °C	45 s
Hibridación a 52 °C	45 s
Elongación a 72 °C	45 s
Extensión final a 72 °C	10 min
Mantenimiento a 15 °C	

Todos los iniciadores, HA generados por INTA Castelar (Paniego y col., 2002, Kiani y col., 2007) y ORS, desarrollados en la Universidad Estatal de Oregon, Department of Crop and Soil Science (Tang y col., 2002 y 2003; Yu y col., 2003) empleados en este trabajo se marcaron en el extremo 5' del iniciador Forward con alguno de los siguientes fluoróforos: 6-FAM (azul), HEX (verde) o NED (amarillo).

La presencia de producto de amplificación luego de la reacción de PCR fue verificada mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% (p/v) y tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Se sembró un volumen de muestra de 5 µl, incluyendo 2 µl de buffer de siembra. La electroforesis se llevó a cabo en buffer TAE 1X a un voltaje constante de 5 Volts/cm durante 20 min. La visualización del ADN se realizó por transiluminación con luz UV, en digitalizador de imágenes acoplado a PC con el programa Gene Quantitive (Biorad). Se utilizaron dos marcadores de peso molecular conocido (10 y 25 pb, Invitrogen). Para la observación de los mismos fragmentos de PCR con la fluorescencia correspondiente según el fluoróforo marcador, se empleó el equipo Typhoon (Amersham).

D.1.4. Electroforesis capilar.

La separación de los productos de amplificación se efectuó mediante electroforesis capilar en secuenciador ABI 3130xl que mide la fluorescencia inducida por

láser usando un detector de múltiples longitudes de onda. Se empleó como estándar de peso molecular el compuesto GeneScan 500 (-250) ROX (6-carboxil-X-rodamina) que está constituido por un conjunto de fragmentos de tamaño conocido marcados con un fluoróforo de color rojo (Applied Biosystems). Las muestras se prepararon con 10 µl de formamida (HiDi Formamide) como agente desnaturizante y 0,1 µl de GeneScan 500 (-250) ROX por cada placa de 96 pocillos. Se adicionaron 2 µl de las muestras (en una dilución adecuada para favorecer la visualización de los picos fluorescentes), se centrifugó, se desnaturizó a 94°C 5 min y se centrifugó nuevamente previo a la inyección de las muestras en el equipo. Los datos colectados en forma de electroferogramas fueron analizados automáticamente con el programa Genemapper 3.4 y 4.0 (Applied Biosystems) con el objeto de clasificar los alelos detectados según sus pesos moleculares. Los criterios empleados para definir los alelos en base a los picos detectados por el programa se detallan a continuación:

D.1.4.1. Intensidad de fluorescencia: El valor mínimo de la misma deberá ser de 100, correspondiendo así a un posible alelo del marcador analizado. Cuando existen dos alelos de la misma forma, para determinar si el genotipo del individuo es realmente heterocigota, la fluorescencia del pico principal del segundo alelo deberá ser como mínimo 1/3 de la fluorescencia del pico principal del primer alelo (el de mayor intensidad). Cuando un alelo excede la fluorescencia (desde aproximadamente 8000 o más), se suele quebrar el pico principal originando dos picos solapados que podrían generar perfiles falsos.

D.1.4.2. Forma del alelo: Deberá ser constante en todas las muestras analizadas, lo cual es una medida de la certeza en cuanto a la especificidad del alelo detectado. HA89. El alelo tomará el número de pares de bases del pico más alto, llamado pico principal. En algunos casos la forma del alelo intercambia el orden del pico principal, mostrando el pico adyacente más alto. En estos casos se tomará como criterio de alelo el primer pico (originalmente el principal). Estas situaciones suelen originarse en los casos donde hay agregado de una adenina (adenilación) por parte de la polimerasa.

D.1.4.3. Selección del rango (bin) del alelo: Si el tamaño molecular del alelo corresponde a 148 pb, su rango será de 147,5-148,5; es decir que todos los picos principales que se ubiquen dentro de este rango serán adjudicados como "alelo 148". Si el "bin" de ese alelo está mal definido, posiblemente la adjudicación de alelos en las muestras también se vea desplazada. Si luego de verificar el bin sigue estando corrido el alelo, posiblemente sea un nuevo alelo de ese marcador, se deberá controlar la forma del

mismo y si se repite en algún otro individuo. La inserción de una sola base más al alelo se puede justificar como una situación de deslizamiento de la polimerasa. Una solución posible para esta situación será repetir la PCR de esa muestra para corroborar la existencia del alelo "raro".

D.1.4.4. Requerimiento de amplificación unilocus: Los marcadores que exhibieron dos o más sitios de amplificación fueron descartados, dado que no fue posible asignar los alelos que segregan juntos ni determinar el genotipo real del individuo heterocigota.

D.2. Determinación de marcadores polimórficos en líneas parentales: Los materiales empleados para el análisis molecular corresponden a los parentales B59 y R432, según se describió con anterioridad en las evaluaciones fenotípica. Se realizó el análisis molecular, según lo indicado en el ítem D.1.4, en busca de alelos polimórficos con el objeto de encontrar alelos exclusivos correspondientes a la tolerancia a sequía.

D.3. Análisis molecular (BSA).

A partir de los datos de caracterización fenotípica de las 105 familias $F_{2:3}$, (B59xR432), donde se utilizó el PGR como carácter fenotípico según la metodología explicada anteriormente, se obtuvieron dos grupos de individuos contrastantes "bulks" para el carácter antes mencionado: tolerantes a estrés hídrico (252, 283, 117, 224, 128, 324) y sensibles a estrés hídrico (148, 139, 95, 300, 138, 212), a los cuales se les realizó un análisis de BSA, utilizando para ello el resultado de los marcadores microsatélites que resultaron polimórficos entre los parentales. El objetivo final fue realizar un análisis exploratorio en busca de posibles polimorfismos de ADN asociados a genes responsables del carácter tolerancia al estrés hídrico en girasol (Michelmore y col., 1991). Con respecto al análisis de segregación, se utilizó el algoritmo o test de CHI cuadrado, para verificar la segregación mendeliana de los marcadores y para realizar el análisis de ligamiento marcador-carácter.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SECCIÓN A.

Evaluación de la metodología utilizada en la determinación de hormonas vegetales.

Se evaluaron ABA, SA y JA según los métodos de extracción y purificación de Durgbanshi y col., (2005) adaptada, Miersch y col., (2008) adaptada y la de Luna y col., (1993), culminando tal purificación con la cromatografía líquida de alta presión, según lo descrito en materiales y métodos.

La evaluación de los diferentes métodos de extracción y purificación arrojó los siguientes resultados: En la determinación de ABA en 0.2 g. de tejido de plántulas de girasol de 11 días de vida obtenidas según las condiciones explicitadas en materiales y métodos realizadas por el método de extracción y purificación de Durgbanshi y col., (2005) (Fig. N° 17), se puede observar que la misma no difiere significativamente con el método propuesto por Luna y col., (1993), siendo en ambas técnicas los valores obtenidos por debajo de 500 pmol. g⁻¹ PS.

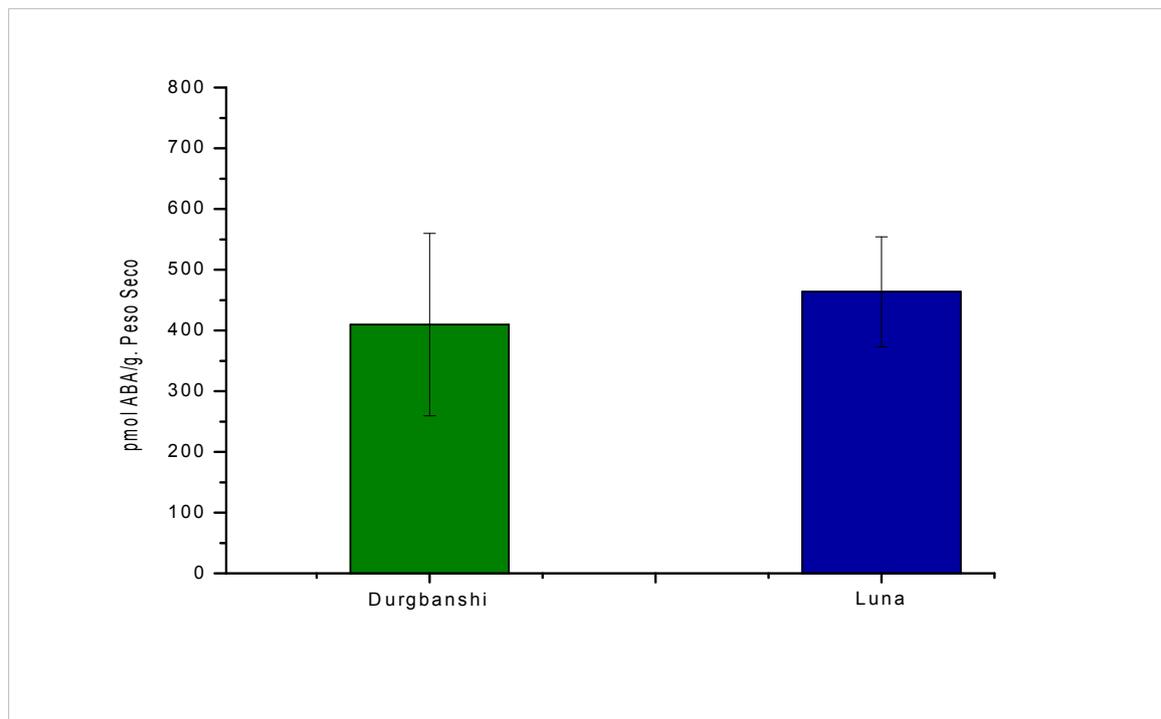


Fig. N° 17 Determinación de ABA (pmol. G⁻¹ PS) en plántulas de girasol mediante método propuesto por Durgbanshi y col., (2005) (barra verde) y método propuesto por Luna y col., (1993) (barra azul) (n=4 ± SE) p<0.05.

En la determinación de SA en plántulas de girasol de 11 días de vida obtenidas según las condiciones explicitadas en materiales y métodos realizadas por el método de extracción y purificación de Durgbanshi y col., (2005) (Fig. N° 18), se puede observar que la misma no difiere significativamente con el método propuesto por Miersch y col., (2008). Se observa además, que ambos valores están por debajo de 30000 pmol. G⁻¹ PS.

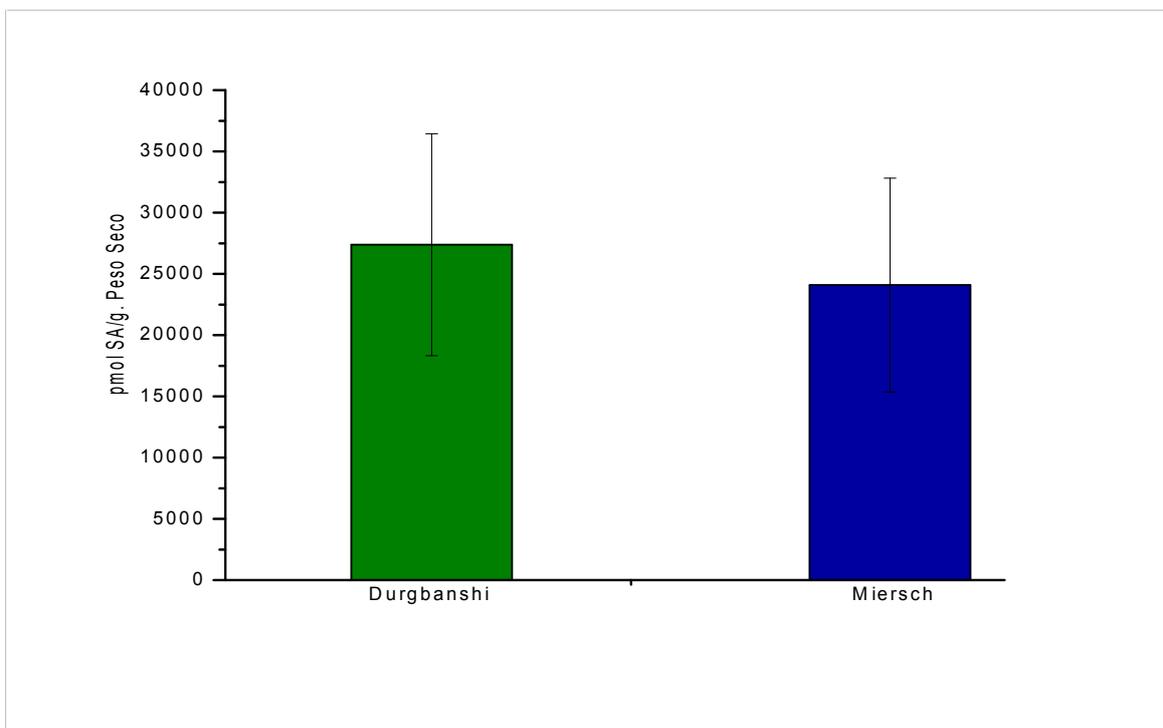
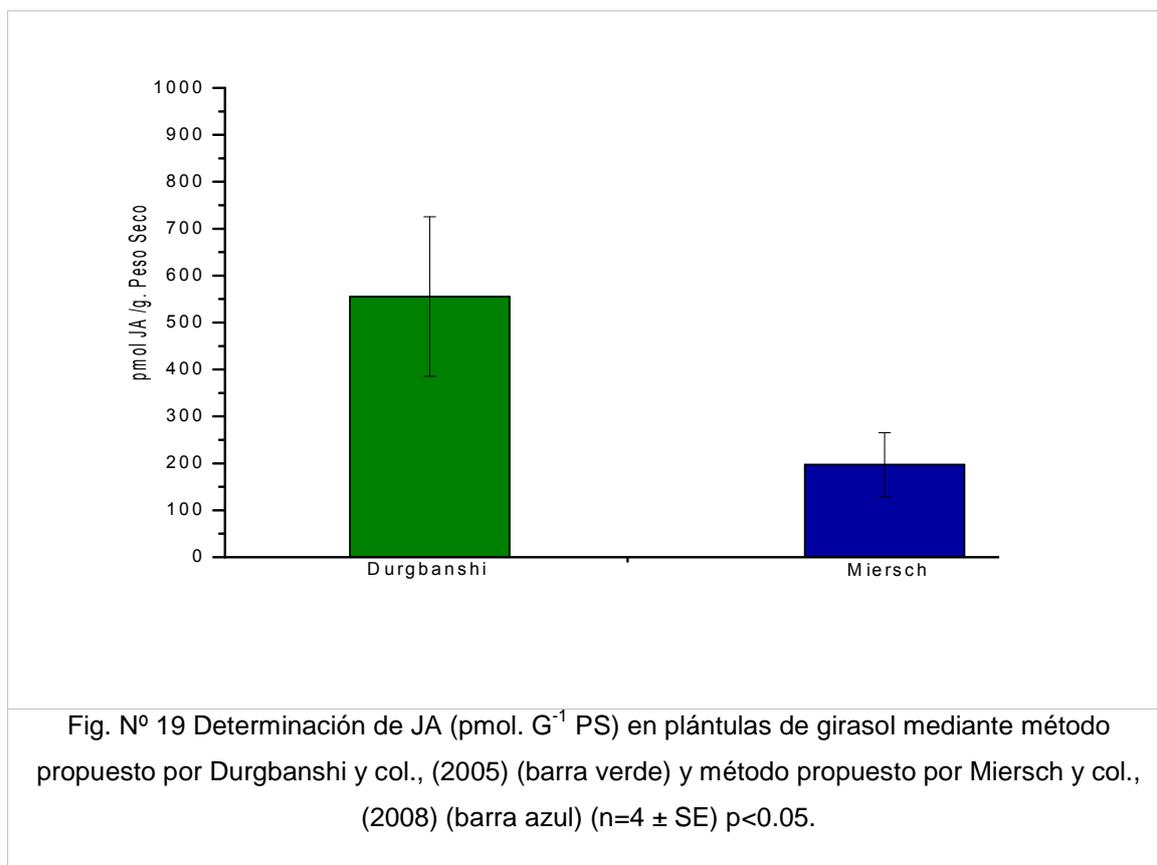


Fig. N° 18 Determinación de SA (pmol. G⁻¹ PS) en plántulas de girasol mediante método propuesto por Durgbanshi y col., (2005) (barra verde) y método propuesto por Miersch y col., (2008) (barra azul) (n=4 ± SE) p<0.05.

En la determinación de JA en plántulas de girasol de 11 días de vida obtenidas según las condiciones explicitadas en materiales y métodos realizadas por el método extracción y purificación de Durgbanshi y col., (2005) (Fig. N° 19), se puede observar que la misma no difiere significativamente con el método propuesto por Miersch y col., (2008). Se observa además, que ambos valores están por debajo de 600 pmol. G⁻¹ PS.



A partir de ello, la técnica que mejor se adecuó a los requerimientos del presente trabajo fue la propuesta por Durgbanshi y col., (2005). La utilización de este método de partición líquido-líquido sería el más conveniente cuando varias hormonas con diferentes estructuras químicas y propiedades físico-químicas requieren ser extraídas de un extracto vegetal en forma rápida, simultánea, menos costosa y laboriosa. Al mismo tiempo, este método permite una remoción más eficiente de lípidos, haciéndolo más adecuado en determinaciones hormonales de cultivos oleaginosos como girasol. La falta de estudios de los múltiples grupos de hormona en las plantas se debe, al menos en parte, a la complejidad de los extractos donde se realizan las cuantificaciones (Liu y col., 2003; Müller y col., 2002) y además a la tecnología utilizada, donde por ejemplo el uso de GC-MS requiere un laborioso proceso de derivatización (Engelberth y col., 2003, Fujita y col., 2006; Schmelz y col., 2003; Kowalczyk y col., 2001; Forcat y col., 2008; Mueller y col., 2006).

Por otra parte, se presentan múltiples dificultades para determinar los diversos componentes en concentraciones por debajo de 50 ng/g, requiriéndose en el caso de los métodos clásicos, varias etapas de purificación y grandes cantidades de tejido (Gómez-Cadenas y col., 1996; Zaharia y col., 2005; Pan y col., 2008).

A.1. Determinaciones de hormonas vegetales.

Por otra parte se ajustaron los parámetros del espectrómetro de masa que permitieron la identificación y cuantificación de las hormonas mencionadas, siendo la de mayor sensibilidad y reproducibilidad las descritas en la Tabla N° 1.

Analito	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	VC (kVol.)	VC (eV)	RW (min)	Dwell (s)	EC (eV)
ABA	263	153	3.25	35	9.40	0.2	5
SA	137	93	3.25	35	5.6	0.2	5
JA	209	59	3.25	35	14.2	0.2	5

Tabla N° 1 Transiciones MRM y condiciones usadas en espectrómetro de masas (Quattro Ultima, Micromass, Manchester, Reino Unido). VC = Voltaje de capilar: (kVol), VC (eV) = Voltaje de cono, RW (min) = Tiempo de retención, EC (eV) = Energía de colisión. El inter-channel fue configurado en segundos (s) al igual que el inter-scan time.

SECCIÓN B.

Caracterización fenotípica.

B. 1 Evaluación fenotípica de familias F_{2:3}

B.1.1 Evaluación del recuento final de germinación (familias F_{2:3})

Las 105 familias F_{2:3}, incluidos los parentales A59 y R432 fueron evaluadas por el comportamiento de poder germinativo cuando fueron sometidas a 400 mM de manitol con referencia al que muestran tales familias en condiciones control denominado poder germinativo relativo (PGR), observándose entre las mismas diferencias significativas según se puede observar en la Tabla N° 2.

Para el análisis de la segregación del carácter, las familias F_{2:3} se agruparon en base a intervalos de PGR y se los represento en función del N° de progenie F_{2:3} en cada categoría (Fig. N° 13), lo cual mostró una variación continua con tendencia a una distribución normal, presentando un extremo de familias susceptibles, familias intermedias y otro extremo de familias tolerantes Se probó normalidad para PGR con algoritmo en programa estadístico SAS (Statistical Analysis Software), el mismo, mostró normalidad para el carácter en cuestión. Estos datos de PGR de las familias F_{2:3} (R432 x

A59) observados en la Fig. N° 13, muestran una distribución cuantitativa para la variable en estudio, en el estadio fenológico de plántula.

FV	GL	SC	CM	F	P-valor
Modelo	104	225393,13	2167,24	9,16	<0,0001
Familia F_{2:3}	104	225393,13	2167,24	9,16	<0,0001
Error	315	74535,75	236,62		
Total	419	299928,88			

CV: 19.90; **R²:** 0.75; **FV:** Fuentes de Variación; **GL:** Grados de Libertad; **SC:** Suma de Cuadrados; **CM:** Cuadrados Medios; **NS:** no significativo; *significativo; **: altamente significativo (1%); **f:** Estadístico.

Tabla N° 2 ANOVA individual de progenies F_{2:3} (R432 x A 59) de girasol para la variable porcentaje de germinación (Manitol 400 Mm) en relación al testigo no sometido a estrés hídrico (PGR).

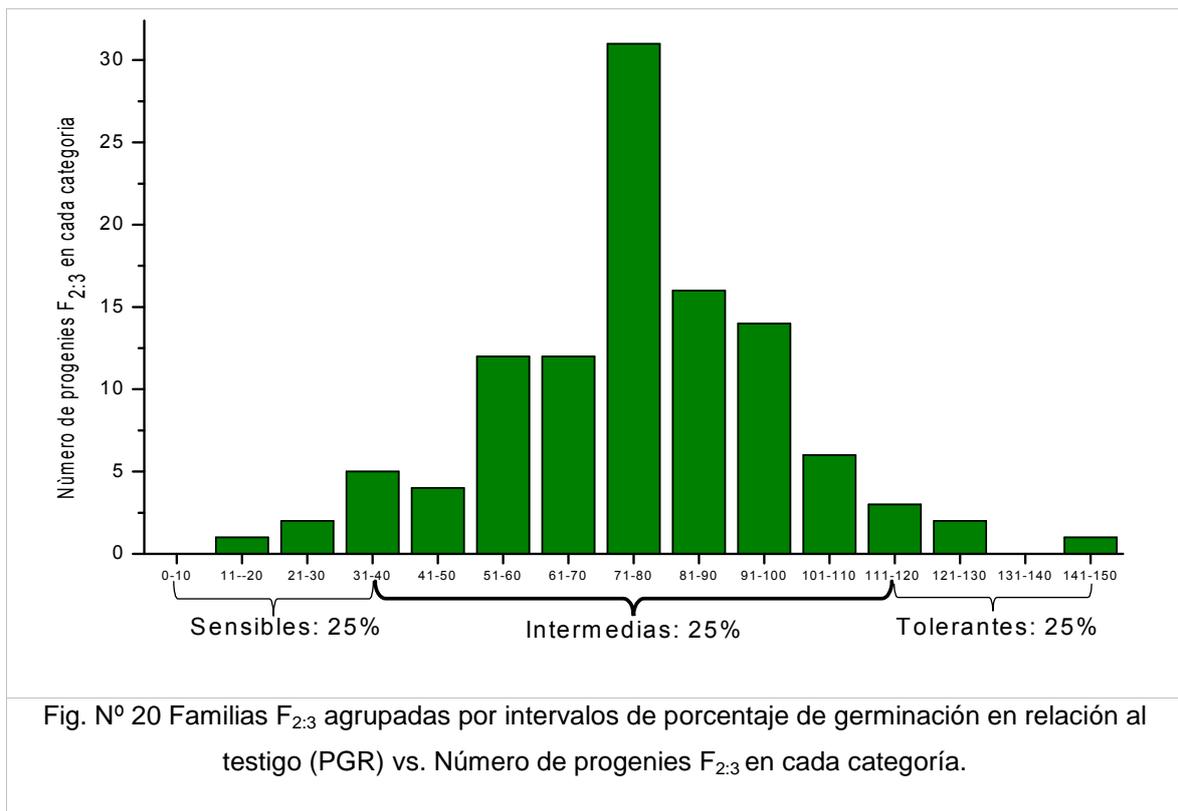
Cabe destacar, que estas familias F_{2:3} son el resultado del cruzamiento de dos líneas endocriadas contrastantes para el carácter tolerancia a estrés hídrico previamente seleccionadas a campo utilizando la técnica de cobertura del entresurco con film plástico, según lo indicado por Andrade y col., (2009). La F₁ producida fue auto-fecundada para generar las plantas F₂ y a partir de la autofecundación de estas últimas se obtuvieron las respectivas familias F_{2:3} o F_{2:3}. A su vez fueron observadas familias con comportamiento superior al parental tolerante (segregación transgresiva); fenómeno que puede ser explicado a través de las interacciones intra-alélicas tales como aditividad y sobredominancia e inter-alélicas tales como la epistasis. Resultados similares obtuvieron Septiningsih y col., (2013), ante la búsqueda de QTL en variedades locales de arroz para la tolerancia a condiciones anaeróbicas durante el estadio ontogénico de germinación, en este caso, las combinaciones más favorables de alelos de los dos padres contribuyen a una mayor tolerancia de sus progenies.

Varios estudios han demostrado segregación transgresiva, como los análisis de QTL para rendimiento, sus componentes y la calidad del grano de especies silvestres de arroz (McCouch y col., 2007; Septiningsih y col., 2003; Thomson y col., 2003; Septiningsih y col., 2012b). Una posible consecuencia de la segregación transgresiva, es el origen de fenotipos híbridos que superan la expresión fenotípica de la especie parental y que podría ser un fenómeno común (Grant, 1975; Rieseberg y Ellstrand, 1993;

Rieseberg y col., 1999). La segregación transgresiva podría ser un mecanismo rápido de transición evolutiva, debido a que la hibridación genera variación en los genes de manera simultánea. Albertson y col., (2003) demostraron que la segregación transgresiva y covariación genética podrían haber contribuido a la adaptación de los cíclidos en África Oriental (Albertson y col., 2003; Albertson y Kocher, 2005). La introgresión de rasgos de tolerancia a estrés abiótico en híbridos de girasol, como *Helianthus annuus* y *Helianthus debilis*, en América del norte, parecen estar fuertemente influenciadas por la segregación transgresiva (Whitney y col., 2010). Además, la segregación transgresiva parece estar asociada con la endogamia y es más común en las plantas que en los animales. Diversos rasgos que muestran segregación transgresiva, podrían contribuir a la divergencia ecológica y aislamiento reproductivo de los híbridos (Rieseberg y col., 1999), estos mismos autores consideraron que la segregación transgresiva en los híbridos se puede dar por diversas causas, siendo la más importante la complementación entre los loci de los individuos parentales. Por otro lado, la segregación transgresiva manifiesta las interacciones entre loci con alelos de efectos opuestos sobre los fenotipos dentro de cada especie, pero en los padres podría haber efectos de refuerzo (complementación) en generaciones híbridas a partir de la generación F₁.

Se han propuesto otros mecanismos para explicar el fenómeno de segregación transgresiva tales como: incremento en la tasa de mutación, la exposición de los alelos recesivos en la segregación de las poblaciones híbridas, epistasis y sobredominancia, pero estos mecanismos alternativos han recibido poco respaldo (Rieseberg y col., 1999).

La manipulación de poblaciones segregantes podría ser una forma de utilizar a los individuos silvestres como fuentes de genes para incrementar el rendimiento de cultivos de interés agronómico, sobre todo cuando estos tienen el mismo nivel de ploidía, sin embargo, sólo unos pocos mejoradores han explorado esta posibilidad (Frey, 1976; Harlan, 1976).



De las determinaciones de PGR realizadas, se estableció que las familias F_{2:3} 138, 336, 333, 277, 300, 139, 212, 148, 256, 95, y 66, muestran una sensibilidad marcada ante condiciones de estrés hídrico (Fig. N° 21), ubicándose a tales familias dentro del grupo que corresponde a “sensibles” (Fig. N° 20). Mientras que las familias F_{2:3} 214, 102, 252, 324, 108, 224, 128, 283, 291, 199 y 117 demostraron una alta tolerancia a estrés hídrico (Fig. N° 21), colocándose a estas familias dentro del grupo que corresponde a “tolerantes” (Fig. N° 20), ante condiciones de estrés hídrico.

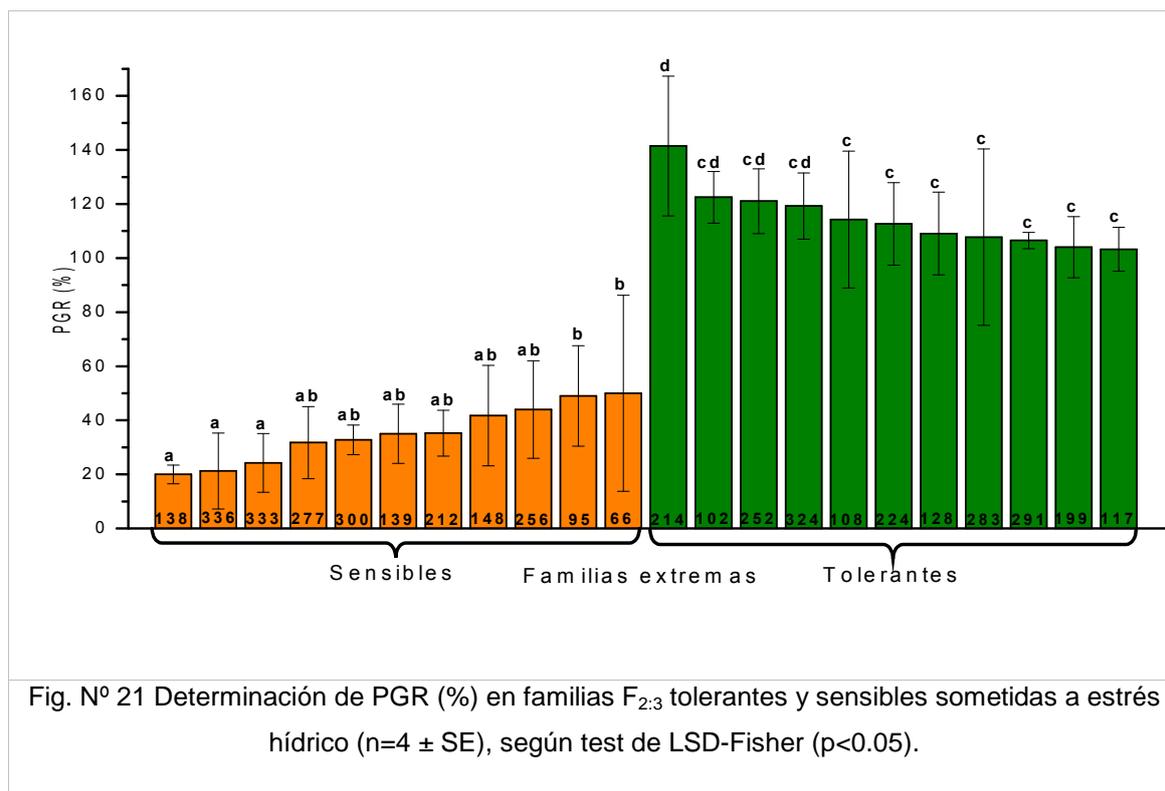


Fig. N° 21 Determinación de PGR (%) en familias $F_{2:3}$ tolerantes y sensibles sometidas a estrés hídrico ($n=4 \pm SE$), según test de LSD-Fisher ($p<0.05$).

El análisis estadístico de PGR realizado a las familias $F_{2:3}$ sensibles y tolerantes determino que existen diferencias estadísticamente significativas entre dichas familias, lo que corroboraría su comportamiento contrastante para poder germinativo, ante condiciones de estrés hídrico. Este resultado mostraría la variabilidad existente para el carácter evaluado y por otro lado nos indicaría la importancia de evaluar el estrés hídrico en el estadio de germinación y crecimiento temprano. Según los autores (Dhanda y col., 2004; Hu y Jones 2004; Iqbal y Ashraf. 2006) indican que el índice de tolerancia a estrés, como el poder germinativo, puede utilizarse como criterio de selección para diferenciar genotipos tolerantes a estrés hídrico. El establecimiento de la plántula es una etapa crítica, porque es indispensable cumplimentar con la imbibición de la semilla (Almansouri y col., 2001; Albuquerque y De Carvalho, 2003), un estrés hídrico en tal estadio produce pobre e irregular germinación de semillas y falta de sincronización en el establecimiento de las plántulas (Mwale y col., 2003; Mustapha y col., 2009). Se observó que el porcentaje de germinación y producción de biomasa disminuyeron con el aumento de estrés osmótico (Sajjan y col., 1999) y el tiempo medio de germinación se prolongó en forma considerable con elevados déficit de agua (El-Midaoui y col., 2001).

Además de los efectos hormonales ya mencionados de ABA, SA y JA durante la etapa de germinación, diversos investigadores demostraron que ante condiciones de

estrés, diversos compuestos nitrogenados como el óxido nitroso, pueden mejorar la germinación de la semilla mediante el aumento de las actividades de amilasa (Zhang y col., 2006b; Hu y col., 2009). El control en la producción de productos como O_2 y H_2O_2 , pueden aliviar el estrés mediante el control del daño oxidativo ocasionado sobre diversas membranas, efectos similares que se lograrían por la acción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa (POD), enzimas que tienen un rol muy importante durante la germinación y crecimiento de la planta bajo diferentes condiciones adversas (Li y col., 2011; Tuna y col., 2008; Sajedi y col., 2011; Jubany-Marí y col., 2010; El-Maarouf-Bouteau y col., 2015).

Características como germinación y emergencia son rasgos complejos, que puedan ser controlados por un gran número de genes o QTL y los mismos pueden ser identificados y analizados mediante análisis multilocus (Bettey y col., 2000). La identificación de regiones cromosómicas con efectos sobre la germinación y desarrollo de semillas de girasol no se presentan con frecuencia en la literatura, no es así el caso de arroz, donde se han publicado diversos trabajos acerca de QTLs que controlan latencia de las semillas (Lin y col., 1998), el vigor de plántulas (Redoña y Mackill, 1996) y características de las raíces (Ray y col., 1996; Price y col., 2000). En *Brassica oleracea*, se identificaron dos QTL para el tiempo medio de germinación (Bettey y col., 2000). Paterson y Sorrells (1990) encontraron múltiples genes dominantes para la germinación tardía en trigo. En contraste, Bhatt (1983) identificaron dos genes recesivos para este carácter en el mismo cultivo.

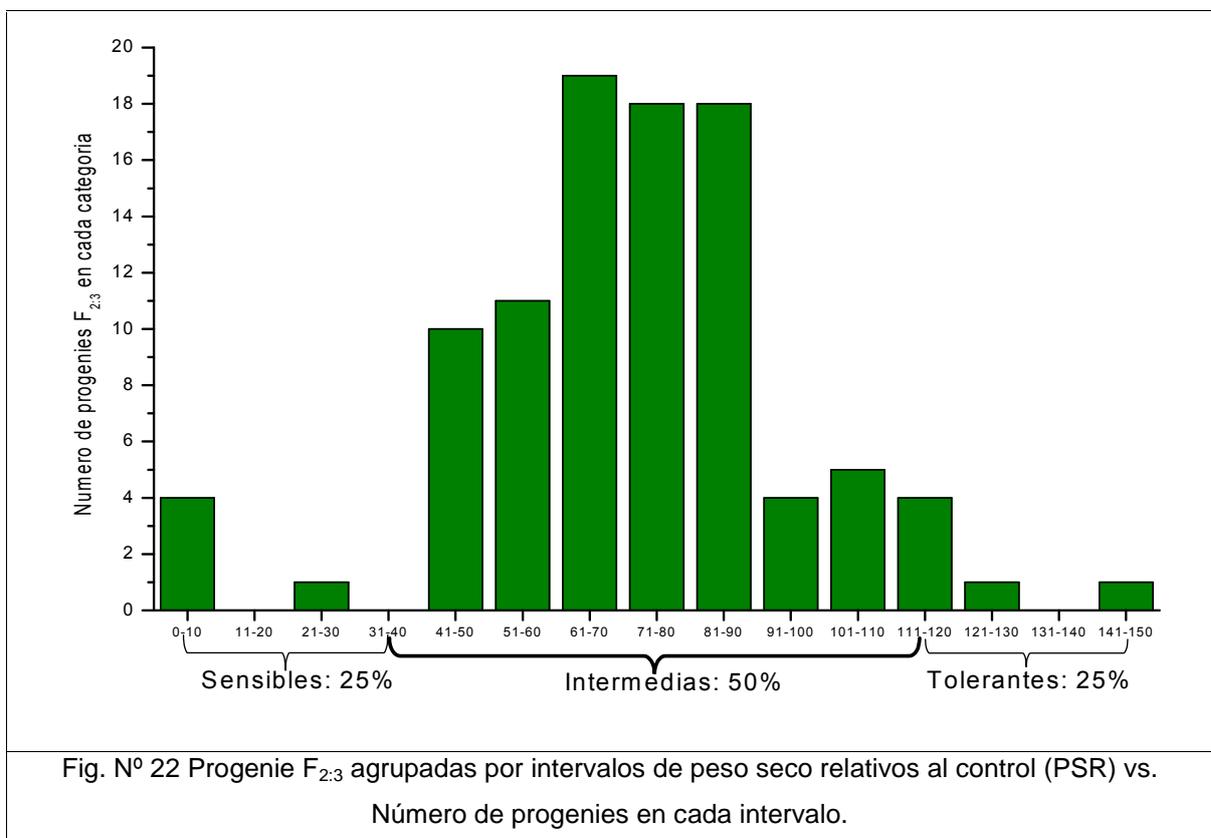
Si se logran identificar los loci correspondientes a la germinación, los mejoradores serán capaces de seleccionar específicamente aquellos alelos que contribuyan a su mejora en especies de interés agronómico. La disponibilidad de marcadores moleculares específicos para la identificación de loci relacionados a la germinación sería de gran beneficio, proporcionando un gran potencial para la detección más rápida de combinaciones beneficiosas de alelos en los programas de mejoramiento (Al-Chaarani y col., 2005).

B.1.2 Evaluación de peso seco (familias F_{2:3})

Se evaluaron 98 familias F_{2:3}, luego de su desarrollo como plántula, para peso seco cuando fueron sometidas a 400 mM de manitol con referencia al testigo no sometido a estrés hídrico (PSR), cuando las plántulas alcanzaron los 11 días de vida en las condiciones descritas en materiales y métodos. Para el análisis de estos datos se realizó un análisis de la varianza no paramétrico por la prueba de Kruskal-Wallis. De

acuerdo al análisis antes mencionado, se puede observar que las familias $F_{2:3}$ mostraron diferencias significativas.

A los fines de observar la segregación que presento este carácter, las familias $F_{2:3}$ se agruparon en base a intervalos de PSR y se los represento en función del N° de progenie $F_{2:3}$ en cada categoría (Fig. N° 22), lo cual nos muestra una variación continua con tendencia a una distribución normal como la observada en el caso del PGR, presentando un extremo de familias susceptibles, familias intermedias y otro extremo de familias tolerantes.



En los resultados obtenidos para PSR provenientes de familias $F_{2:3}$ que se mostraron sensibles y tolerantes al tratamiento de estrés hídrico, se puede observar que ambas presentan menor PSR con respecto al control a excepción de la familia 117 (Fig. N° 23). Además, se puede observar, que las familias $F_{2:3}$ sensibles presentan en general menor PSR comparadas con las familias $F_{2:3}$ tolerantes a excepción de la familia $F_{2:3}$ 95. En las familias $F_{2:3}$ tolerantes se obtuvieron PSR superiores al 80 % en las familias 224, 128, 283, 291, 199 y 117, mientras que en las familias $F_{2:3}$ sensibles el PSR fue en general menor al 80%, este es el caso de las familias 138, 336, 333, 277, 300, 139, 212,

148 y 256. El análisis estadístico de PSR, demostró que se pueden diferenciar dentro del grupo de familias $F_{2:3}$ tolerantes y sensibles, seis sub-grupos de acuerdo al comportamiento del carácter PSR en función del estrés hídrico: Grupo I (familias $F_{2:3}$ 138, 336), Grupo II (familias $F_{2:3}$ 66, 214, 102, 252), Grupo III (familias $F_{2:3}$ 333, 277, 300), Grupo IV (familias $F_{2:3}$ 139, 212, 148, 324, 108), Grupo V (familias $F_{2:3}$ 256, 224, 128, 283, 291, 199), Grupo VI (familias $F_{2:3}$ 95, 117). Por lo tanto, como se observa en la Fig. N° 23 se podría destacar el comportamiento de la familia del grupo I, como las de menor respuesta para este carácter frente a condiciones de estrés hídrico, mientras que las familias que integran el grupo VI fueron las que presentaron el mejor peso seco relativo al testigo.

Se observa además que el estrés hídrico modificaría los eventos post-germinativos, y que este parámetro no sería tan eficiente como PGR en discriminar genotipos sensibles y tolerantes a estrés hídrico.

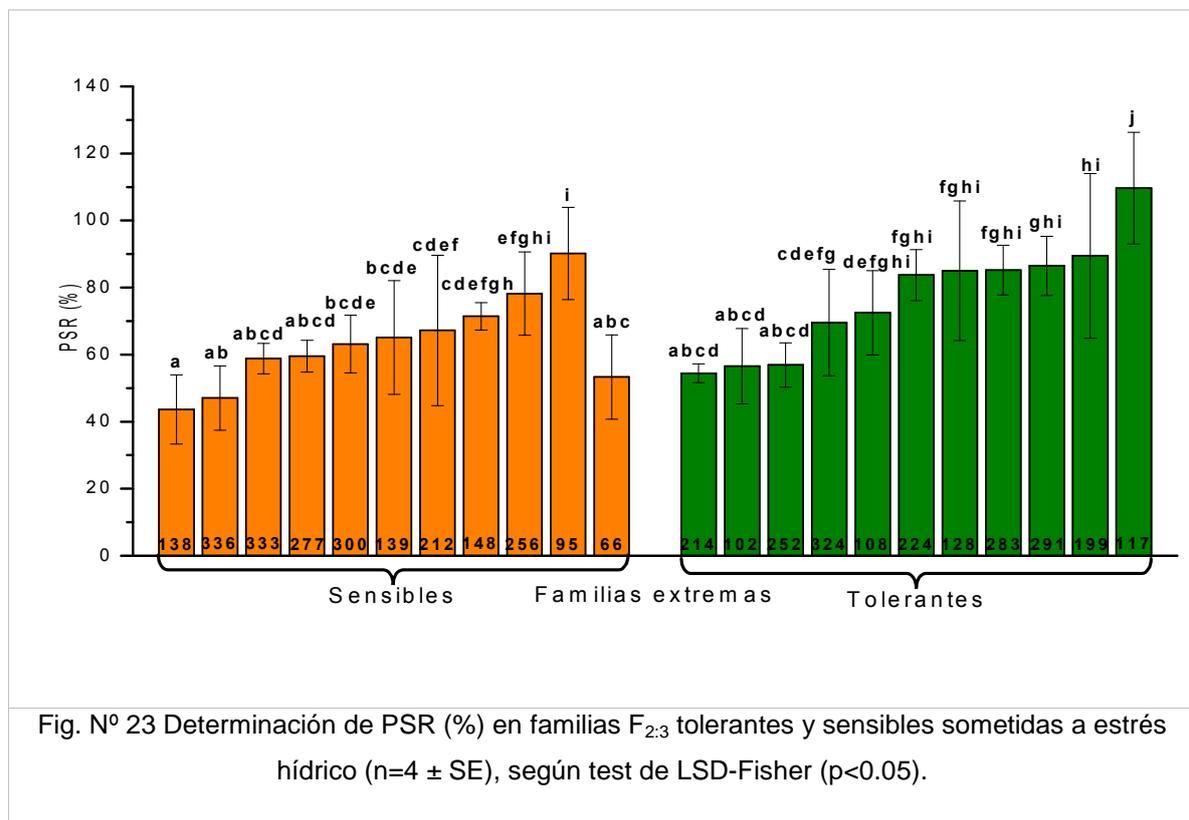


Fig. N° 23 Determinación de PSR (%) en familias $F_{2:3}$ tolerantes y sensibles sometidas a estrés hídrico ($n=4 \pm SE$), según test de LSD-Fisher ($p<0.05$).

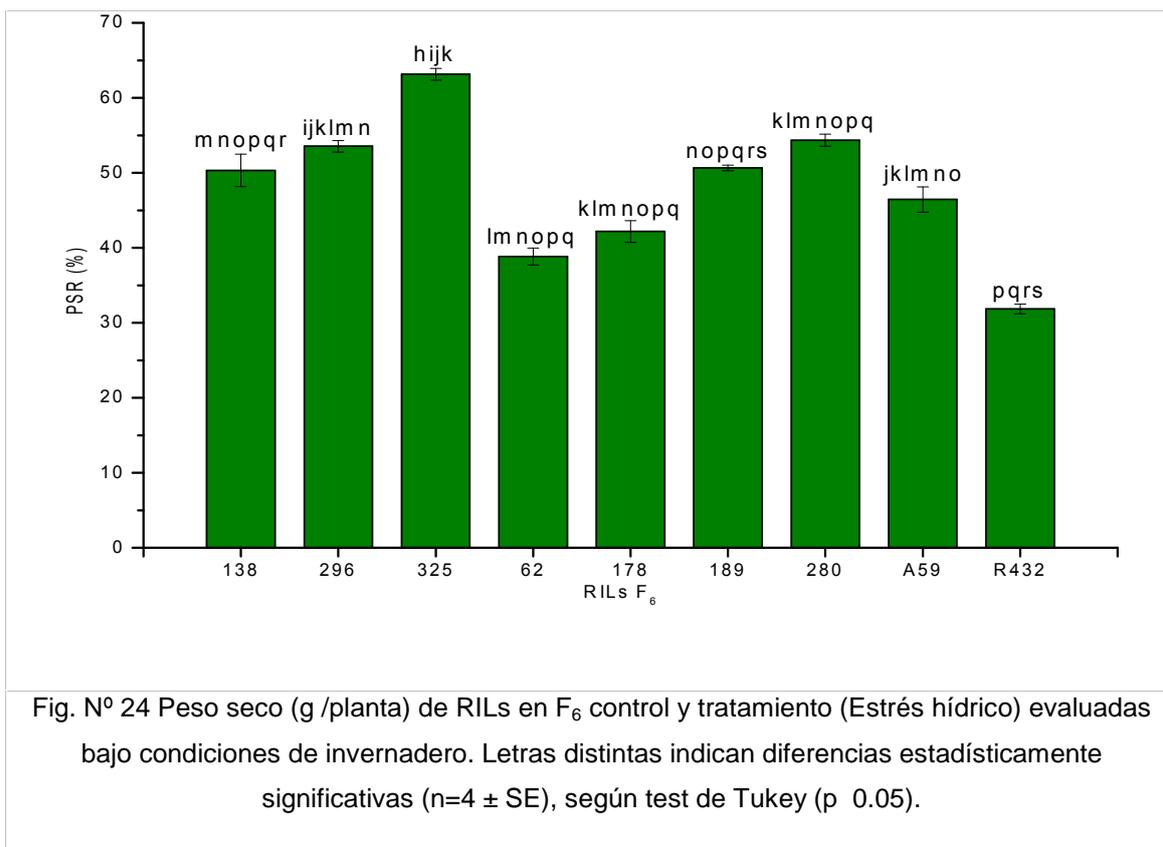
En estudios previos, diferentes genotipos de girasol mostraron respuestas diferenciales a diversos tratamientos de estrés hídrico. Algunos autores informaron que mutantes de girasol poseen una mayor resistencia al estrés osmótico y lograron demostrar además que tanto germinación como acumulación de materia seca y altura de

planta se inhiben en presencia de polietilenglicol-6000 (PEG-6000), cuando se alcanza una presión osmótica superior a - 5 bares (Smok y col., 1993; Lenzi y col., 1995). Los efectos adversos de la escasez de agua en la germinación y crecimiento de plántulas han sido también informado en diferentes cultivos, como el trigo (Dhanda y col., 2004), remolacha azucarera (Sadeghian y Yavari, 2004) y sorgo (Gill y col., 2002).

La variación en el rendimiento de los híbridos de girasol determinados por el crecimiento de las plántulas en forma de biomasa seca, altura de planta y longitud de la raíz indica que el crecimiento de plántulas es un procedimiento confiable y eficiente para la detección de híbridos de girasol para la tolerancia a estrés hídrico. Si bien los parámetros altura de la planta y materia seca se redujeron con el incremento en el estrés hídrico, generado por PEG-6000, diferentes híbridos mostraron un rendimiento diferente bajo ambiente de estrés (Ashraf y col., 1996).

B.2 Evaluación de crecimiento de RILs F₆.

A fin de observar la respuesta de los distintos genotipos ante condiciones de estrés, se realizó la evaluación bajo condiciones controladas de las RILs F₆ según Pereyra-Irujo y col. (2007). De acuerdo a lo observado en el grupo evaluado (Fig. N° 24), la producción de biomasa por parte de la RIL 325 se encuentra por encima del 60% presentando diferencias significativas con las RILs 138, 62, 189 y R432. Por otro lado, la que presentó menor producción de biomasa fue la línea parental R432 presentando diferencias significativa con las RILs A59 (46.44%), 325 y 296, en este caso la producción de biomasa estuvo alrededor de 30%.



El estrés hídrico puede poner en peligro muchas funciones de la planta, pero el efecto principal es la reducción en la fijación de carbono. Esto a su vez, puede afectar diferencialmente el crecimiento vegetal y la producción en función de muchas variables tales como la longitud del tallo, afectar su estado vegetativo y ser susceptible a otros tipos de estrés ambientales como alta radiación solar, altas y bajas temperaturas. Una de las respuestas más conocidas a la sequía es el cierre estomático y el consiguiente aumento de la resistencia del CO₂ y su difusión a la hoja (Kaiser, 1987). La concentración de CO₂ en el lugar de su fijación (cloroplasto) puede estar más restringida por las resistencias internas del mesófilo de la hoja (Loreto y col., 1992). En varias especies de plantas incluyendo manzana (*Malus x domestica*), girasol (*Helianthus annuus*) y sicómoro (*Acer pseudoplatanus*), el cierre de los estomas se produjo cuando el sistema radical fue expuesto al déficit de agua, a pesar de que el estado hídrico en las hojas se mantuvo sin cambios (Wilkinson y Davies 2002). En el mismo sentido, ABA actúa como una señal química principal que induce el cierre de los estomas a través de segundos mensajeros tales como especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico, Ca⁺², seguido por la activación e inactivación de proteínas quinasas/fosfatasa (Negi y col., 2008; Vahisalu y col., 2008 2010; Ward y col., 2008, Lee y col., 2009; Chen y col., 2010; Sánchez-Martín y col. 2015).

Por su parte, JA puede tener un efecto importante durante el crecimiento y desarrollo, este parece inhibir el crecimiento a través de la supresión de la mitosis y la proliferación celular (Noir y col., 2013; Zhang y Turner, 2008). Esto podría deberse a un equilibrio entre el crecimiento y la defensa, donde GA y sus proteínas reguladoras negativas DELLAs actúan antagónicamente a JA y sus reguladores negativos JAZs. En ausencia de GA y la presencia de JA, tiene lugar la supresión del crecimiento y la activación de la defensa (Kazan y Manners, 2012; Wasternack y Hause, 2013).

Se ha reportado que respuestas diferenciales de genotipos de maní ante condiciones de estrés hídrico, puede ser debidas a su capacidad de mantener una baja producción de biomasa ante condiciones adversas antes mencionadas (Pimratch y col., 2008). En este sentido, el mismo autor demostró que los efectos del estrés hídrico provocan una reducción en la producción de biomasa que va desde un 13,0 % a 32,7 % según el nivel de estrés hídrico impuesto. Tal reducción se debería a que un aumento en la producción de ABA ante condiciones de estrés hídrico provoca una reducción en la transpiración a través del cierre estomático lo que a su vez suprime la producción de biomasa (Condon y col., 2004; Blum, 2005). Ante esta situación, líneas de maíz transgénico mostraron una mayor capacidad fotosintética y eficiencia del uso del agua, así como alta producción de biomasa bajo condiciones leves de déficit hídrico (Ding y col., 2009). La mayor sensibilidad frente al estrés y menor capacidad de recuperación ante condiciones de estrés hídrico, quedaron demostrados en las mayores reducciones del área foliar, peso seco de la parte aérea en variedades de papa de acuerdo a lo publicado por Martínez y Moreno (1992). Las características diferenciales entre genotipos de *Amaranthus* spp podría haber implicado diversas estrategias para el control del agua por parte de la planta. Entre los genotipos evaluados, la relación masa seca área foliar /masa seca de la raíz de la variedad "Hin Choi" fue la menos afectada por la sequía (Liu y Stützel, 2004). Esto podría atribuirse a su baja conductancia estomática (Liu y Stützel, 2002b), lo que permite a las plantas controlar el agua de forma restrictiva, cuando se producen situaciones de estrés hídrico.

SECCIÓN C.

Determinaciones de hormonas vegetales

C.1. Determinaciones de hormonas vegetales en familias F_{2:3}.

En referencia a las concentraciones de SA en familias F_{2:3} tolerantes (Fig. N° 25), se puede observar que las mismas bajo estrés hídrico, presentan una tendencia a disminuir las concentraciones de SA, como es el caso de las familias 324, 224, y 108,

mostrando en estos casos, diferencias significativas con sus controles. Por otra parte, se observa que las familias 128, 283 y 252 bajo condiciones de estrés hídrico no muestran una diferencia significativa con los respectivos controles. La familia 117 representa en este caso, la única familia que bajo condiciones de estrés incrementa las concentraciones de SA con una diferencia significativa con respecto a su control, lo cual coincide con el comportamiento de las familias 174 y la 310 analizados con anterioridad (Fernández, 2012) y que forman parte del grupo de familias intermedias según su PGR.

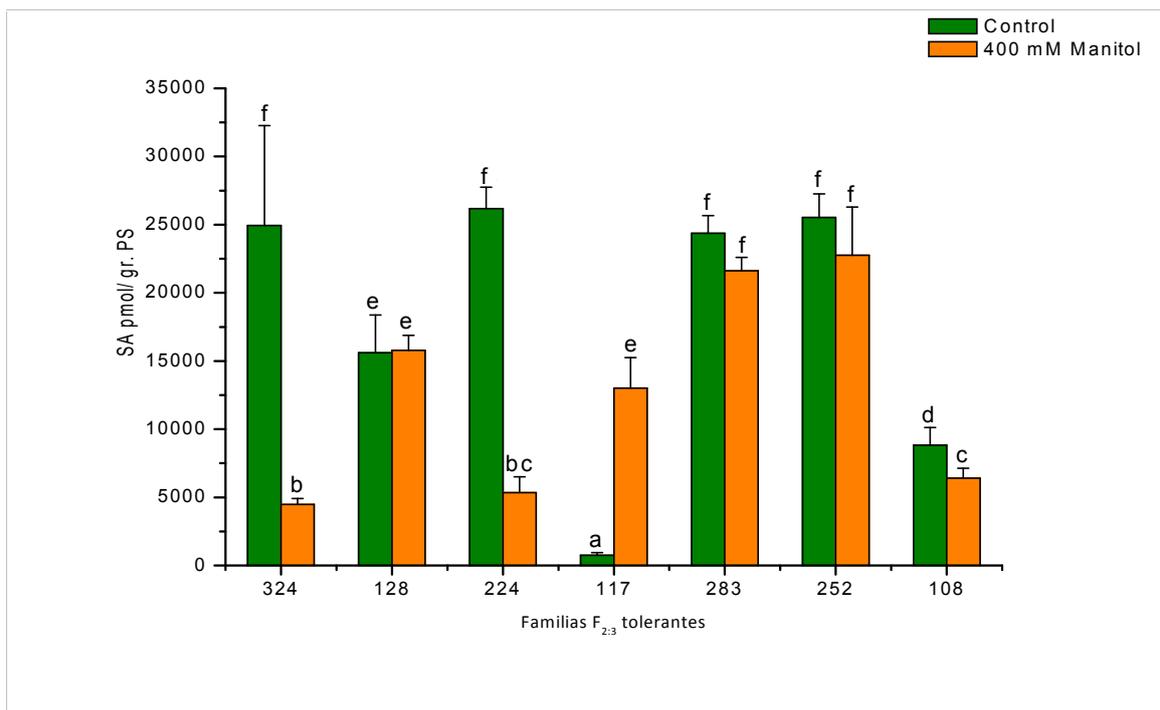
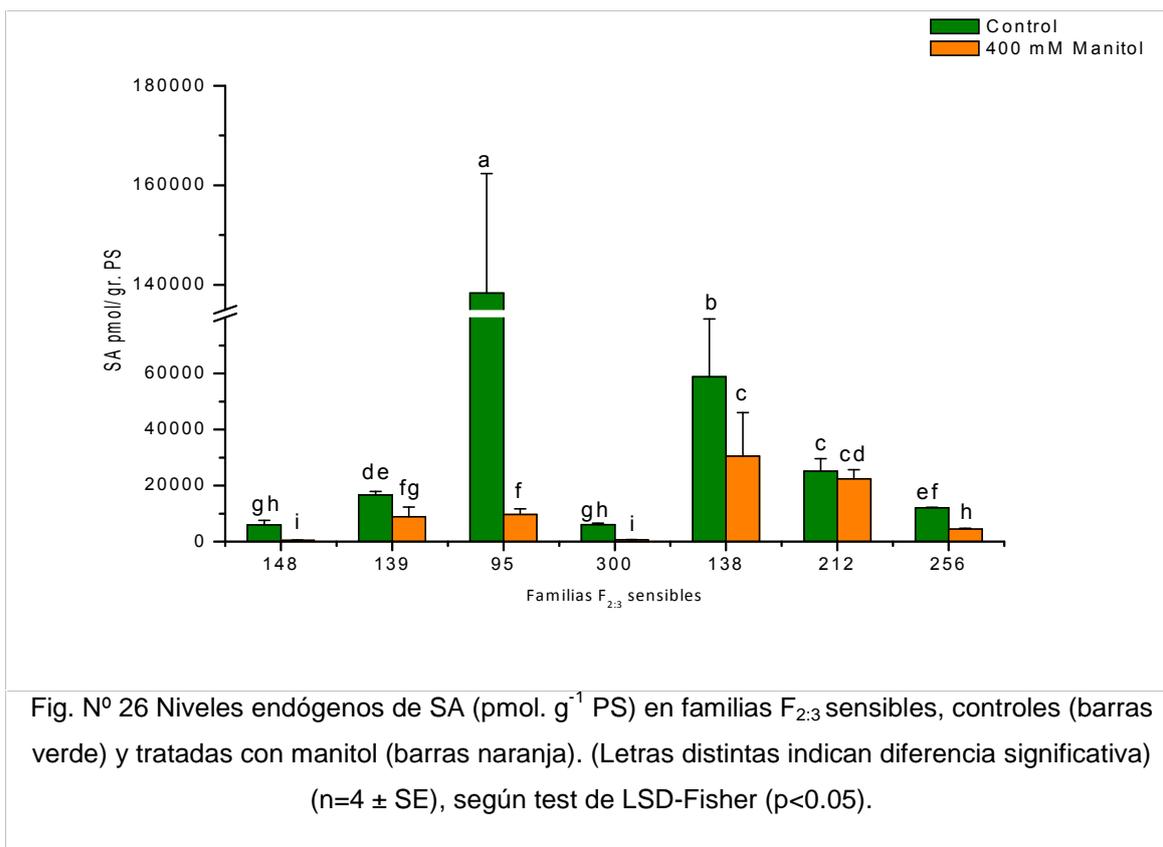


Fig N° 25 Niveles endógenos de SA ($\text{pmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$) en familias $F_{2:3}$ tolerantes, controles (barras verde) y tratadas con manitol (barras naranja). (Letras distintas indican diferencia significativa) ($n=4 \pm \text{SE}$), según test de LSD-Fisher ($p<0.05$).

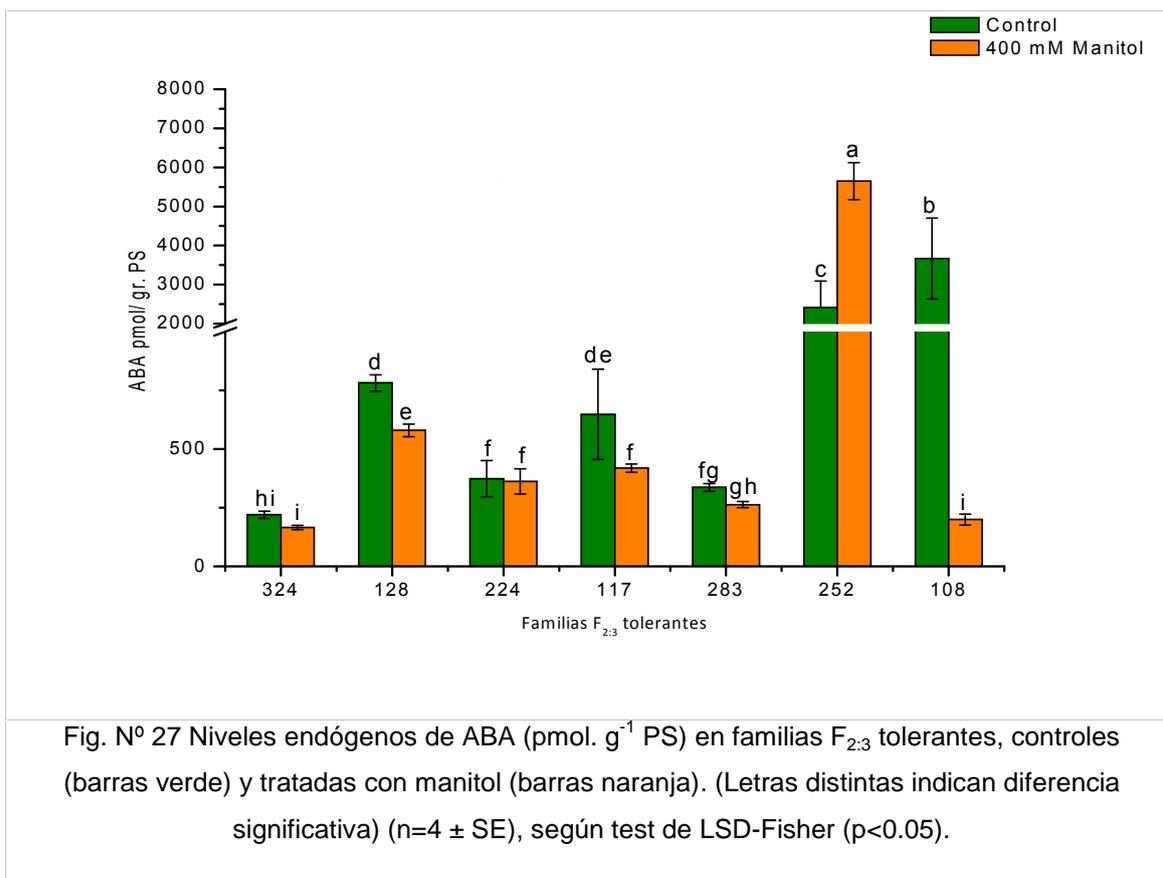
Con respecto a las familias $F_{2:3}$ sensibles, se observa en la Fig. N° 26 que la síntesis de SA bajo condiciones de estrés tiende a disminuir en general en las familias bajo tratamiento con respecto a los controles, mostrando diferencias significativas las familias 148, 139, 95, 300, 138 y 256.



Los valores promedios de SA en los controles de las familias tolerantes, según PGR, fue de 18023,39 pmol/g PS mientras que en las familias sensibles fue de 37566,41 pmol/g PS, estos diferentes niveles basales de familias sensibles y tolerantes a estrés hídrico indicarían que SA podría estar involucrado en la respuesta al déficit hídrico, por otra parte si tomamos como criterio de discriminación el PSR, donde se diferencian ambos extremos, se observa que las familias sensibles presentan una disminución en el contenido de SA en estrés hídrico, mientras que la familia 117 (tolerante) manifestó un incremento en los contenidos de SA. Rajjou y col., (2006) y Borsani y col., (2001), proponen a SA como el principal componente en la respuesta al estrés osmótico en la germinación de plántulas de Arabidopsis. Al presente, se ha informado que SA también juega un papel importante en las respuestas a estreses abióticos como la sequía, temperaturas altas y bajas, metales pesados y estrés osmótico (Krantev y col., 2006; Vlot y col., 2009; Molina y col., 2002, Nemeth y col., 2002; Munné-Bosch y Peñuelas, 2003; Shi y col., 2008; Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011; He y Zhu, 2008; Ashraf Y col., 2010, Hayata y col., 2010). Se observó además que la aplicación exógena de SA mejoró el porcentaje de germinación en plantas de tomate (Szepesi y col., 2005). Además trabajos de Mikolajczyk y col., (2000) han determinado que el estrés osmótico puede

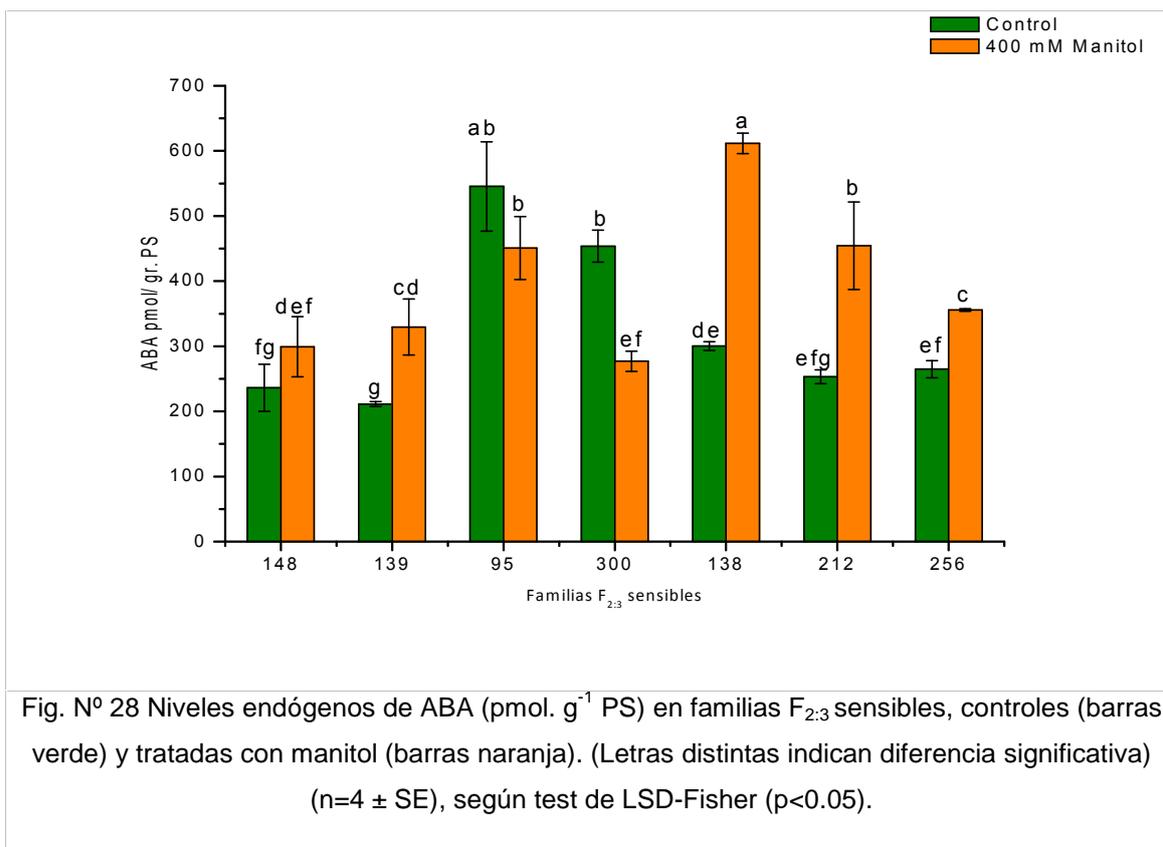
inducir una síntesis elevada de SA y el mismo activar proteínas Kinasas para responder adecuadamente a situaciones desfavorables. Por otra parte se ha informado que SA en *Arabidopsis* ha participado en la protección de la planta contra el estrés oxidativo (Sharma y col., 1996, Rao y Davis, 1999; Li y col., 2012), que podría ser generado en caso de sufrir la planta estrés hídrico (Trejo y Davies, 1991). Tratamientos exógenos con SA generaron incrementos de prolina y ABA en especies de *Hordeum spontaneum*, esto implicaría que ABA y prolina podrían contribuir al desarrollo de una reacción de protección ante situaciones adversas inducidas por SA (Bandurska y Stroinski, 2005). En este sentido Hanan (2007) observo que tratamientos con SA disminuyen el daño oxidativo y confieren una mayor resistencia ante tratamientos con NaCl en plantas de cebada y trigo además de mejorar la aclimatación ante estas situaciones desfavorables. Aplicación exógena de SA y glicina-betaína, mejora el rendimiento de híbridos de girasol con diferentes grados de estrés hídrico en parámetros de producción tales como, diámetro de capitulo, número de aquenios y contenido de aceite en semilla (Hussain, 2008). Pre-tratamiento con SA disminuyó la actividad de la catalasa tanto en raíces y hojas, pero la actividad de otras enzimas asociadas con la defensa antioxidante, superóxido dismutasa (SOD), peróxidos (POD), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR) exhibió diferentes cambios. Como regla general, la actividad de estas enzimas (SOD, CAT, POX y APX) disminuyó en comparación con su respectivo control en plantas de tomate (Szepesi y col., 2005). Existen informes contradictorios sobre el efecto de la SA en la germinación de semillas y el establecimiento de plántulas, lo que sugiere que esta molécula puede inhibir la germinación, como se dio en el caso del maíz (Guan y Scandalios, 1995), o bien mejorar el vigor de la semilla, como en el trigo (Shakirova y col., 2003). Se ha propuesto que SA en *Arabidopsis* puede aumentar el daño oxidativo, causando así letalidad de plántulas en estas condiciones (Borsani y col., 2001). Sin embargo, se observó que a concentraciones inferiores a 1 mM, SA no afectó la velocidad ni homogeneidad en la germinación de *Arabidopsis* (Rajjou y col., 2006).

En referencia a las concentraciones de ABA, en el caso de las familias $F_{2:3}$ tolerantes (Fig. N° 27), se puede distinguir que la mayoría de las familias muestran una tendencia a disminuir los niveles de ABA bajo condiciones de estrés hídrico. En este sentido, solamente las familias 128, 117 y 108 sometidas a tratamiento, manifiestan una disminución estadísticamente significativa en las concentraciones de ABA con respecto al control, mientras que la familia $F_{2:3}$ 252 fue la única que presentó un incremento significativo de la concentración de ABA bajo condiciones de estrés hídrico, y las restantes familias (324, 224 y 283) no presentaron diferencias significativas.



En relación a las familias $F_{2:3}$ sensibles, que se observan en la Fig. N° 28, cuando fueron sometidas a estrés hídrico, se presenta un incremento generalizado de los niveles de ABA. Se puede observar que tal efecto fue significativamente mayor, comparado con sus controles, en las familias $F_{2:3}$ 139, 138, 212 y 256. Solamente la familia 300 muestra una disminución significativa en los niveles de ABA cuando fue sometida a condiciones de estrés.

Por otra parte, si tomamos como criterio de discriminación PSR, observamos que mientras la familia más tolerante (117) muestra una disminución de los niveles de ABA, en la familia sensible (138) muestra un importante incremento de ABA bajo condiciones de estrés hídrico.



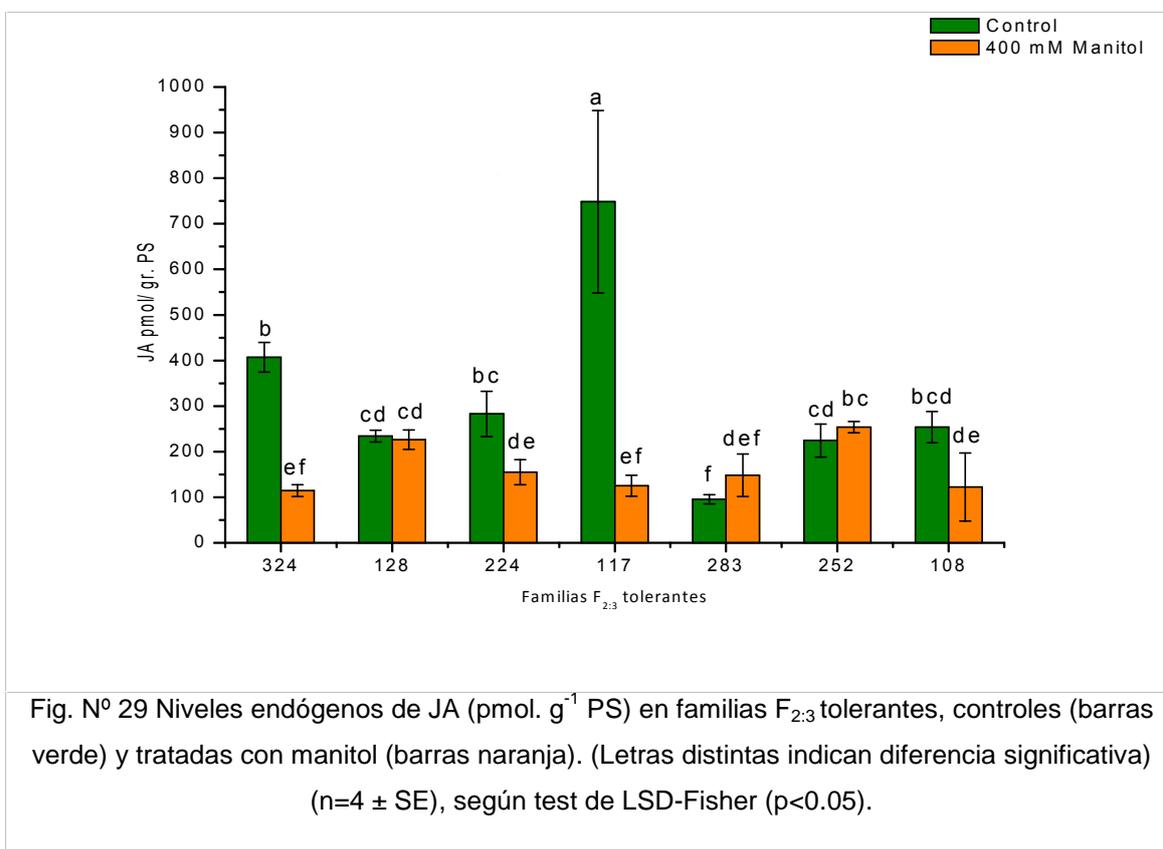
A partir de lo expuesto, queda en evidencia que las familias sensibles muestran mayores niveles de ABA bajo estrés hídrico lo que podría conferir a la planta una ventaja para enfrentar condiciones desfavorables (Jacobsen y col., 2002; Joshi-Saha y col., 2011; Millar y col., 2006; Sreenivasulu y col., 2007), pudiendo provenir dicho incremento de ABA por la activación de las vías anabólicas (Nambara y Marion-Poll, 2005; Schroeder y col., 2001), como catabólicas (Lee y col., 2006; Ren y col., 2007; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Kushiro y col., 2004). Vías catabólicas de ABA como la hidroxilación pueden contribuir a una disminución en las concentraciones de ABA. Existen tres maneras diferentes de hidroxilación y en cada una de ellas se oxida uno de los grupos metilo del anillo de ABA (C-7', C-8', C-9'). Las tres formas de ABA hidroxilado poseen actividad biológica pero la hidroxilación a su vez dispara vías de inactivación (Zhou y col., 2004). La más frecuente reacción de catabolismo de ABA es la hidroxilación en la posición del C-8' para formar 8'-hidroxi-ABA, ácido faseico (PA) y dihidrofaseico (DPA), los cuales pueden ser posteriormente conjugados con glucosa (Hirai y col., 2003). Se ha informado que la hidroxilación es la principal vía de regulación del catabolismo de ABA en varios procesos controlados por esta hormona. De esta manera, el PA y DPA son los catabolitos más abundantes siendo el primero de ellos producido a partir de la isomerización

espontánea del 8'-hidroxi-ABA. Luego, el PA puede ser transformado a DPA mediante una reductasa soluble. Con respecto a la actividad biológica de los catabolitos de ABA se sabe que es muy reducida, aunque el grado de reducción varía entre los bioensayos realizados. Recientemente se demostró que diferentes proteínas de unión al ABA en manzanas y células de la aleurona de cebada son incapaces de unirse al PA sugiriendo que es un metabolito inactivo por lo menos en algunos procesos fisiológicos (Zhang y col., 2001); por otro lado, otros bioensayos demostraron que el DPA es completamente inactivo (Walton y Li, 1995).

Una de las vías para incrementar el ABA dentro de la planta es la propuesta por Sauter y col. (2002), que señalaron que el ABA-GE, fisiológicamente inactivo, podría actuar como una señal sólo cuando es clivada en el apoplasto de la hoja y liberada como ABA fisiológicamente activo. También han demostrado que una β -glucosidasa apoplástica específicas para el sustrato ABA-GE existe y que la actividad de esta enzima aumenta 7 veces bajo estrés salino en hojas de cebada (Dietz y col., 2000). Recientemente, Lee y col. (2006), demostraron que plantas de *Arabidopsis sp.* deficientes en β -glucosidasas exhiben niveles muy bajos de ABA en hojas y producen fenotipos sensibles a estrés. En situaciones de déficit hídrico, se produce una rápida polimerización de las β -glucosidasas en los microsomas de las hojas de *Arabidopsis*, con una actividad enzimática 4 veces mayor que en controles no estresados. El ABA-GE fue clivado en una tasa más alta y el ABA fue liberado de los microsomas al citosol.

Se observó que la aplicación exógena de ABA mejora considerablemente la tolerancia a sequía de *Cynodon dactylon* (Lu y col., 2009). 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 compararon cultivares tolerantes y sensibles a estrés en diferentes especies (Zheng y Li, 2000; Chen y col., 2002; Perales y col., 2005; Zhu, 2002; Himmelbach y col., 2003). Incrementos en la concentración de ABA bajo estrés hídrico, fue reportada en diversas etapas del desarrollo como por ejemplo, maíz (Xin y col., 1997; Wang y col., 2008), sorgo (Kannangara y col., 1983), trigo (Iqbal y col., 2010; Raziuddin y col., 2010), festuca (Abernethy y McManus, 1998), cebada (Thameur y col., 2010) y alfalfa (Han y col., 2008). Un aumento de ABA podría contribuir a una pre-adaptación de las plantas al estrés, ya que ABA es conocido por tener un papel clave en la inducción de la síntesis de proteínas relacionadas al estrés (Leung y Giraudat, 1998; Moons y col., 1997).

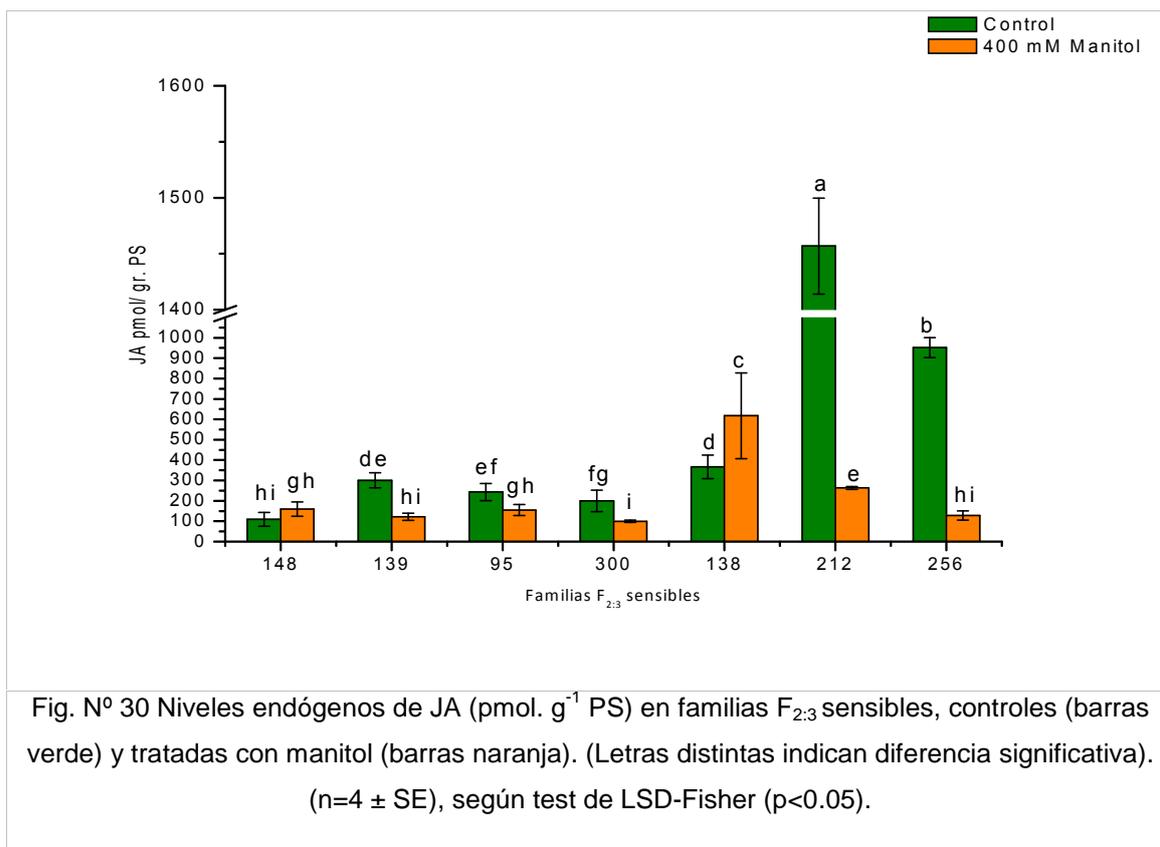
En cuanto a las concentraciones de JA en familias $F_{2:3}$ (R432 x B59) tolerantes observados en la Fig. N° 29 podemos notar que en líneas generales los niveles de JA de las familias tolerantes no muestran una diferencia significativa con respecto a los controles a excepción de las familias 324, 224 y 117, las cuales muestran tendencia a disminuir sus niveles de JA cuando fueron sometidos a estrés hídrico.



Se puede observar que el resto de las familias no manifiesta una diferencia significativa cuando fueron sometidas a estrés hídrico.

En la Fig. N° 30 se observa que familias $F_{2:3}$ sensibles ante condiciones de estrés hídrico muestran una tendencia a disminuir las concentraciones de JA con diferencias significativas en el caso de las familias 139, 95, 300, 212 y 256 con respecto a los controles. Solo en el caso de la familia 148 no se observa diferencia significativa con respecto al control.

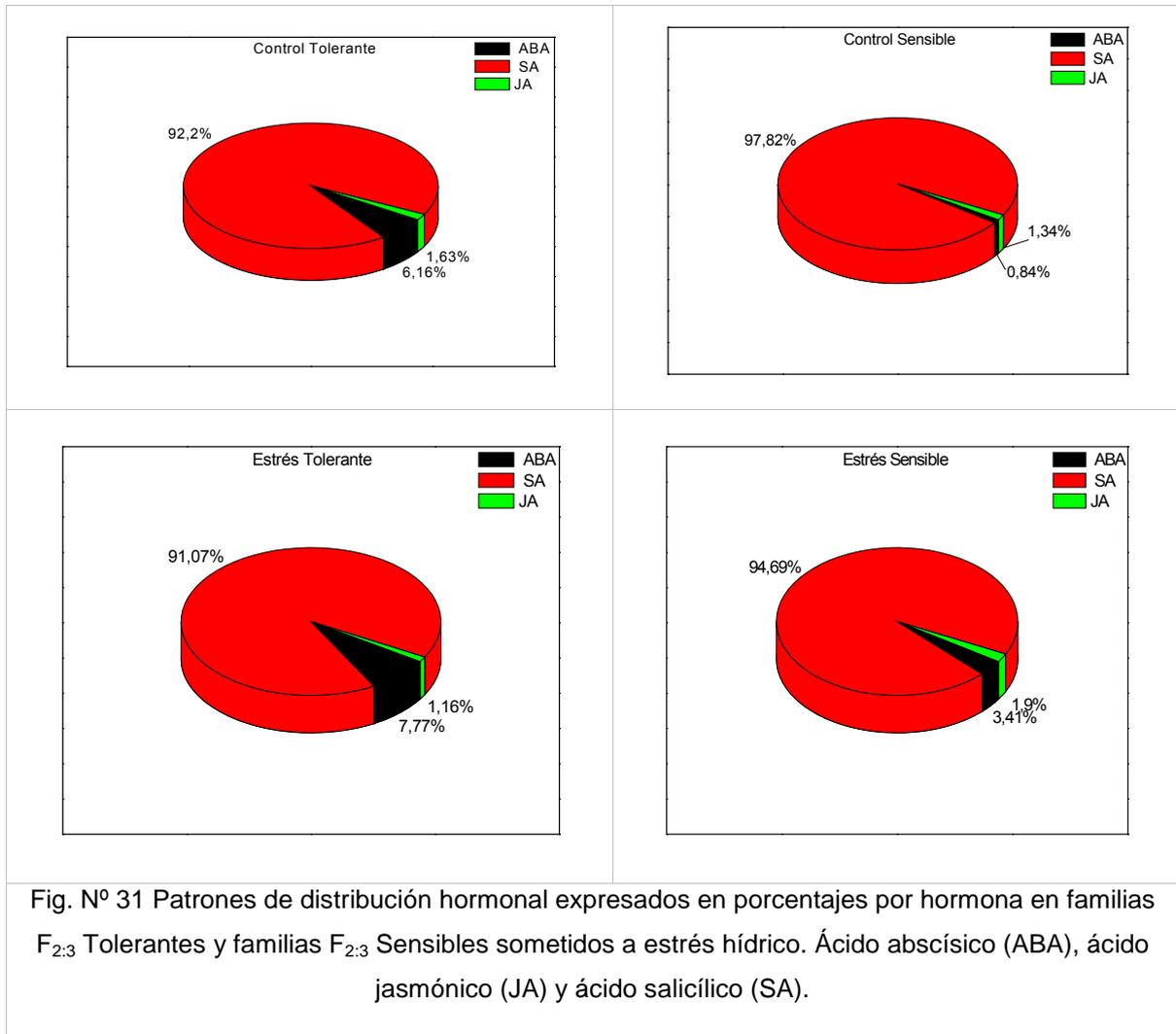
Cuando observamos las respuestas hormonales respecto a la discriminación por PSR podemos observar que mientras la línea más tolerante a estrés hídrico (117) muestra una disminución de JA y la línea más sensible (138) muestra un incremento significativo en los niveles de tal hormona.



Este último análisis mostraría concordancia con los realizados en otras especies como cebada (Lehmann y col., 1995; Kramell y col., 2000) ó en maíz (Xin y col., 1997) en donde se observaron incrementos de JA ante condiciones de estrés hídrico, además bajo estas condiciones se incrementan los niveles de transcritos de JA y las actividades de enzimas antioxidantes (Shan y Liang, 2010). Gao y col., (2004) demostraron la participación de JA bajo estrés por sequía mediante la acumulación de la betaína, un osmoprotector que se acumula en las hojas de las plantas bajo estrés ambiental.

En girasol encontramos lo observado por Vigliocco y col., 2007, donde se observaron cambios en los patrones de jasmonatos en semillas secas y embebidas por 72 horas, cuando las mismas tuvieron diferentes condiciones ambientales durante la embriogénesis, observándose un incremento en el ácido oxo-fitodienoico (OPDA) y una disminución en la forma hidroxilada del carbono 12 de ácido jasmónico. A partir de lo observado entendemos que estos cambios en los niveles de ácido jasmónico, abre la posibilidad de futuras investigaciones para evaluar los cambios que pudieran ocurrir entre familias sensibles y tolerantes en los niveles de OPDA, como también modificaciones en los niveles de ácido jasmónico metilado o conjugado con Isoleucina los cuales han sido

citados como poderosos mensajeros de la vía de los jasmonatos (Kazan y Manner, 2008; Lyons y col., 2013; Wasternack y Hause, 2013).



Teniendo en cuenta que no solo es importante la concentración de las hormonas sino su balance hormonal en relación al efecto fisiológico que producen se planteó en la Fig. N° 31 un análisis compuesto de SA, JA y ABA en las familias $F_{2:3}$ sensibles y tolerantes tanto en condiciones control y con estrés hídrico.

En tal representación gráfica se observa que los controles de las familias tolerantes, según PGR presentan niveles de ABA elevados si se los compara con los valores de ABA de los controles de las familias sensibles. Al ser sometidas ambos grupos de familias a estrés hídrico se observó que los niveles de ABA de las familias tolerantes no se incrementa en forma significativa, mientras que en las familias sensibles sus niveles se incrementaron 4 veces comparados con sus respectivos controles. Los niveles

de SA y JA observados en las familias tolerantes se puede apreciar un bajo nivel de JA y un elevado nivel de SA bajo condiciones control y prácticamente no se modificaron luego de ser sometidas a estrés hídrico. Se puede observar un comportamiento similar a lo mencionado anteriormente en las familias sensibles donde JA prácticamente no sufre modificaciones luego de ser sometidas a estrés hídrico, en tanto que SA presenta una leve disminución en su concentración relativa.

La participación e incremento de ABA en el perfil de las plantas estresadas implica una reducción de la participación de SA y JA. ABA está interactuando con SA y JA en forma sinérgica o antagónica (Anderson y col., 2004; Mosher y col., 2010). Tal “cross-talk” ha sido estudiado más extensamente en estrés biótico donde diversos estudios sugieren que ABA puede regular negativamente la respuesta de SA a agentes patógenos.

La 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED), está codificada por familias multigénicas en la mayoría de las especies de plantas examinadas hasta el momento. Cinco genes NCED en *Arabidopsis* (*AtNCED2*, 3, 5, 6 y 9) se expresan diferencialmente en función del órgano, tejido, etapa de desarrollo, y las condiciones ambientales, lo que sugiere que el proceso de biosíntesis de ABA es muy complejo (Seo y Koshiba, 2011). Por ejemplo, la sobreexpresión de genes NCED, incluyendo NCED2, NCED3 y NCED5, fuertemente inducida por acumulación de ABA promueve el crecimiento bacteriano (Fan y col., 2009; Narusaka y col., 2004). Además, mutantes de *Arabidopsis* ABA3-1, en las que se vió afectada la biosíntesis ABA, mostraron un fenotipo resistente a infección exógena por *Pseudomonas syringae*, mientras que tratamientos con ABA dieron lugar a un aumento en la susceptibilidad a infecciones bacterianas (Fan y col., 2009; Fujita y col., 2006).

ABA también reprimió la inducción de SAR por inhibición de la expresión génica de SA (Yasuda y col., 2008). Colectivamente, los resultados disponibles sugieren que ABA parece inhibir los mecanismos de defensa dependientes de SA. Estudios realizados en *Panicum virgatum* aportan más evidencia a la asociación entre ABA/SA. Dichos resultados indican que bajo condiciones de estrés hídrico, el contenido endógeno de SA es menor que la del respectivo control, manifestándose a su vez elevados niveles de ABA (Aimar y col., 2011). El efecto negativo de ABA sobre JA y su papel en la resistencia a microorganismos patógenos ha sido previamente evaluado a nivel de transcripción génica (Anderson y col., 2004). Genes típicos de JA y de etileno, fueron inducidos más fuertemente en mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la síntesis ABA, mientras que estos genes disminuían su expresión mediante aplicaciones exógenas de ABA (Anderson y col., 2004).

C. 2 Determinaciones de hormonas vegetales en RILs F₆ (R432 x B59).

Las RILs (F₆) evaluadas son el resultado de las sucesivas autofecundaciones de líneas F_{2:3} que lograron soportar este proceso para obtener un material vegetal de buena calidad y cantidad, por tal motivo la identidad de las líneas F₆ no coinciden con la totalidad de líneas F_{2:3} evaluadas y mostradas anteriormente.

De acuerdo a lo observado en la Fig. N° 32, se puede apreciar que no existe una diferencia significativa en los niveles de ABA para la RIL 128, entre controles y plantas estresadas, por otra parte en las familias se observa un incremento en los niveles de ABA para las plantas bajo tratamiento de la RIL 252 y una reducción en las RILs 283 y 224. Si comparamos tales resultados con los obtenidos por las familias F_{2:3}, podemos observar que la RIL 252 mantiene el mismo comportamiento mientras que en el resto del germoplasma evaluado en F_{2:3} y F₆ no presentaron tal correlación.

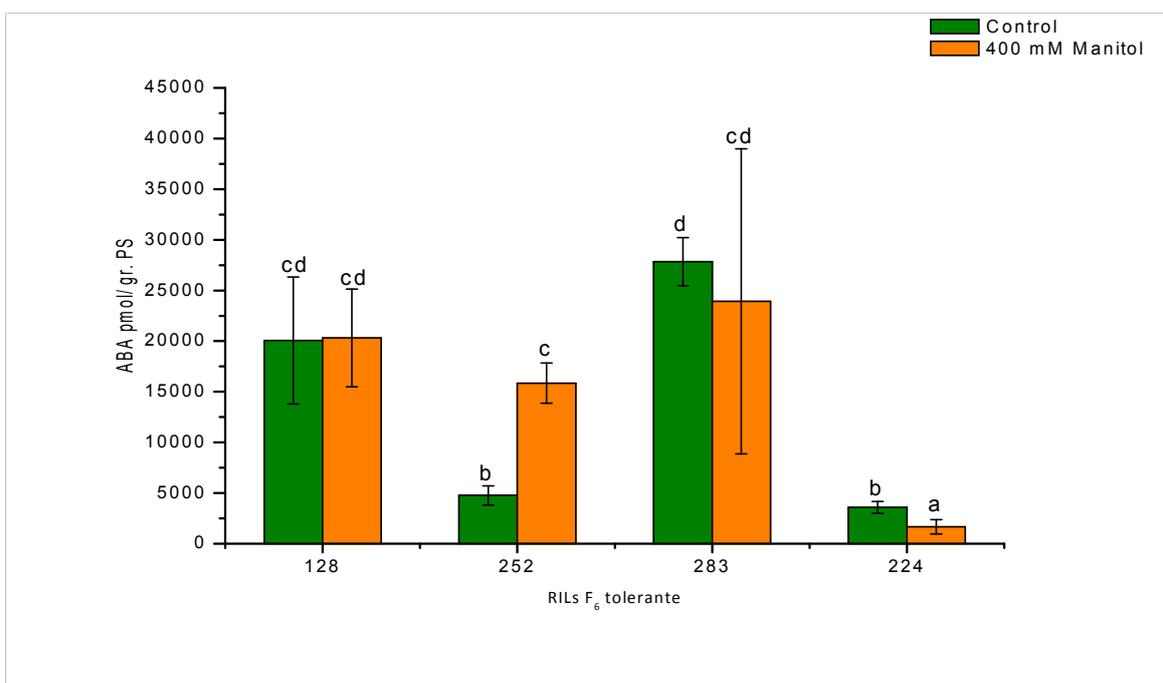
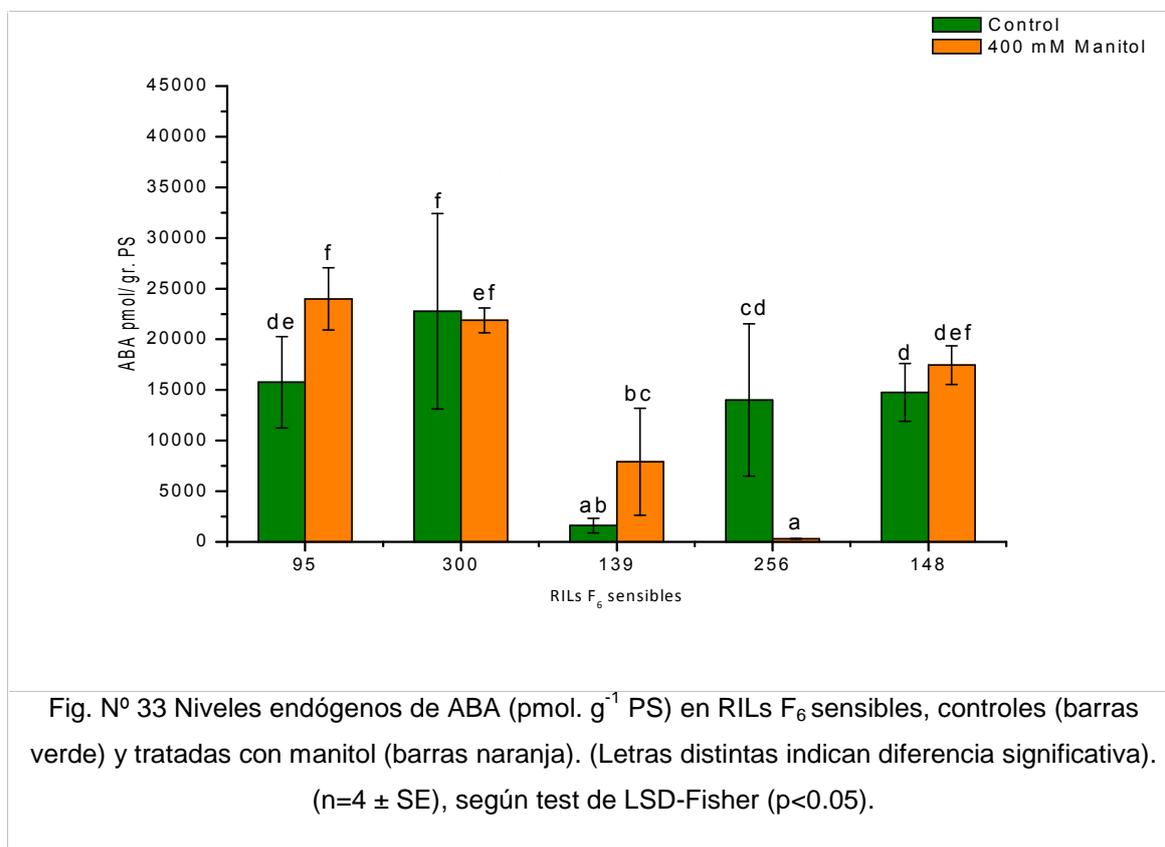


Fig. N° 32 Niveles endógenos de ABA (pmol. g⁻¹ PS) en RILs F₆ tolerantes, controles (barras verde) y tratadas con manitol (barras naranja). (Letras distintas indican diferencia significativa). (n=4 ± SE), según test de LSD-Fisher (p<0.05).

En el siguiente gráfico se puede observar un incremento significativo en los niveles de ABA por parte de las RILs 95, 139 y 148 cuando las mismas son sometidas a condiciones de estrés hídrico, mientras que las RILs restantes, 300 y 256, presentan un incremento de ABA cuando las mismas están bajo condiciones óptimas de riego.

Teniendo en cuenta los resultados evaluados anteriormente en $F_{2:3}$ se puede observar que las RILs 95 y 256, presentan un comportamiento distinto al observado en F_6 , mientras que las RILs 300, 139 y 148 presentan el mismo comportamiento observado en $F_{2:3}$ y F_6 en cuanto al comportamiento de los niveles de ABA.



En muchos casos, las plantas bajo estrés abiótico desarrollan mecanismos de protección, una de las primeras respuestas de la planta es la inhibición del crecimiento de los brotes (Gepstein y Glick, 2013; Pardo, 2010; Van Ha y col., 2014), otra característica destacada para garantizar la supervivencia de la especie en condiciones adversas es la aceleración del proceso de senescencia. Por otro lado, incluso en condiciones óptimas, la planta expresa un síndrome de senescencia natural incluyendo fenómenos fisiológicos y moleculares similares con respuestas de estrés típicos (Buchanan-Wollaston y col., 2005). El síndrome de senescencia de la planta comparte muchas similitudes con las respuestas de las plantas al estrés abiótico, alteración de la morfología, la fisiología, la bioquímica y el comportamiento de la expresión génica (Reguera y col., 2012). ABA, es un regulador de crecimiento de las plantas, que no sólo ejerce el control del crecimiento intrínseco, sino que también media la adaptación de la planta a las condiciones ambientales cambiantes. Esta adaptación requiere de programas propios de desarrollo

que pueden integrar respuestas a señales ambientales (Fujita y col., 2009; Ye y col., 2012; Xu y col., 2013). Investigaciones reciente han revelado que las señales ambientales tienen impacto directo en los niveles hormonales de los órganos de la planta e influencia en su homeostasis para adaptarse rápidamente a los cambios de su entorno (Fujita y col., 2009; Sharp y LeNoble, 2002; Wolters y Jurgens, 2009). El “cross-talk” entre las citoquininas (CK) y ABA, da lugar a una modulación muy compleja sobre los niveles de ABA, esta relación puede influir en las vías dependientes e independientes de ABA permitiendo adaptación de las plantas a condiciones de estrés adversos (Ha y col., 2012; Zhang y Huang, 2013). La biosíntesis CK es dependiente de la enzima ipt (isopenteniltransferasa), por lo tanto la reducción en la expresión de gen ipt bajo condiciones de estrés provoca aumentos en los niveles de ABA y lleva a una reducción en los niveles de la CK (Nishiyama y col., 2011).

En plantas de *Arabidopsis*, ABA regula casi el 10% de la genes codificantes de proteínas, un porcentaje mucho más alto que otras hormonas vegetales. La expresión de estos genes está regulada principalmente por dos familias diferentes de factores de transcripción, ABI5 en las semillas y AREB, ABFS en etapa vegetativa. Algunos de los genes asociados con la biosíntesis de ABA y las vías de señalización, son el terreno para lograr intervenciones específicas que implican manipulaciones biotecnológicas para mejorar el uso del agua por parte de la planta (Huang y col., 2008, Wang y col., 2011). Unas pocas manipulaciones han demostrado obtener como resultado el control sobre el movimiento estomático, acumulación de metabolitos, proteínas y demás compuestos osmóticamente activos (Zhang y col., 2011), lo que dio como resultado una mejora en la productividad bajo condiciones limitadas de agua (Xiao y col., 2009). Diversos genes de la biosíntesis de ABA son también objetivos para mejorar la tolerancia al estrés (Nambara y Marion-Poll, 2005) ejemplos de esto son la sobreexpresión de la AtZEP, gen que bajo condiciones de estrés por sequía incremento su expresión en la hoja y raíz de *Arabidopsis* (Park y col., 2008).

Las poliaminas (PA) mejoran la tolerancia a la desecación de las plantas mediante el control de las concentraciones de ABA endógeno en condiciones de estrés hídrico. En situaciones de estrés por bajas temperaturas, plántulas de arroz mostraron una notable incremento de ABA y una mejora en la síntesis de PA (Gill y Tuteja, 2010). Tratamientos con ABA aumentan las concentraciones de PA en caña de azúcar como una respuesta a la desecación, mientras que el tratamiento es ineficaz para la síntesis de JA bajo estas condiciones (Nieves y col., 2001).

En la Fig. N°34, se manifiesta que la mayoría de las RILs presentan una disminución en los niveles de SA cuando las plantas se encuentran en condiciones de estrés hídrico, esta situación se presenta para las RILs 128, 252 y 224. En el caso de la RIL 283, se presenta una situación opuesta, manifestándose un incremento de SA cuando las plantas son sometidas a déficit hídrico.

Teniendo en cuenta los resultados evaluados anteriormente en $F_{2,3}$, se puede observar que a excepción de la RIL 224, las demás RILs, 128, 252, y 283, presentan un comportamiento distinto en F_6 .

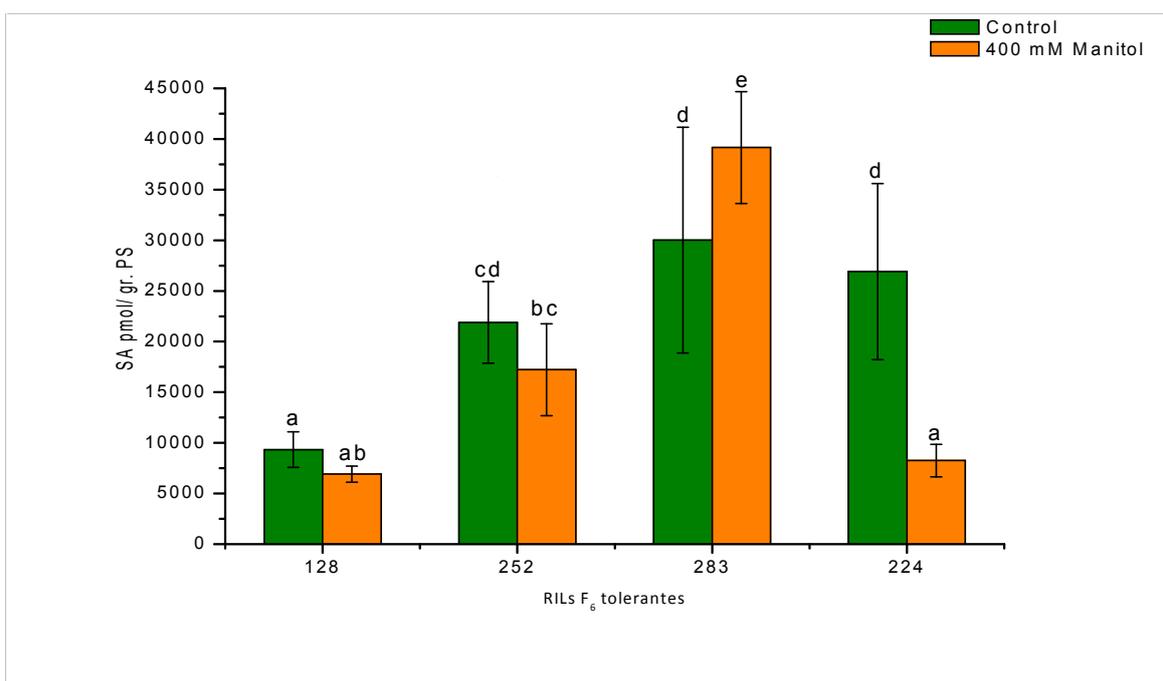
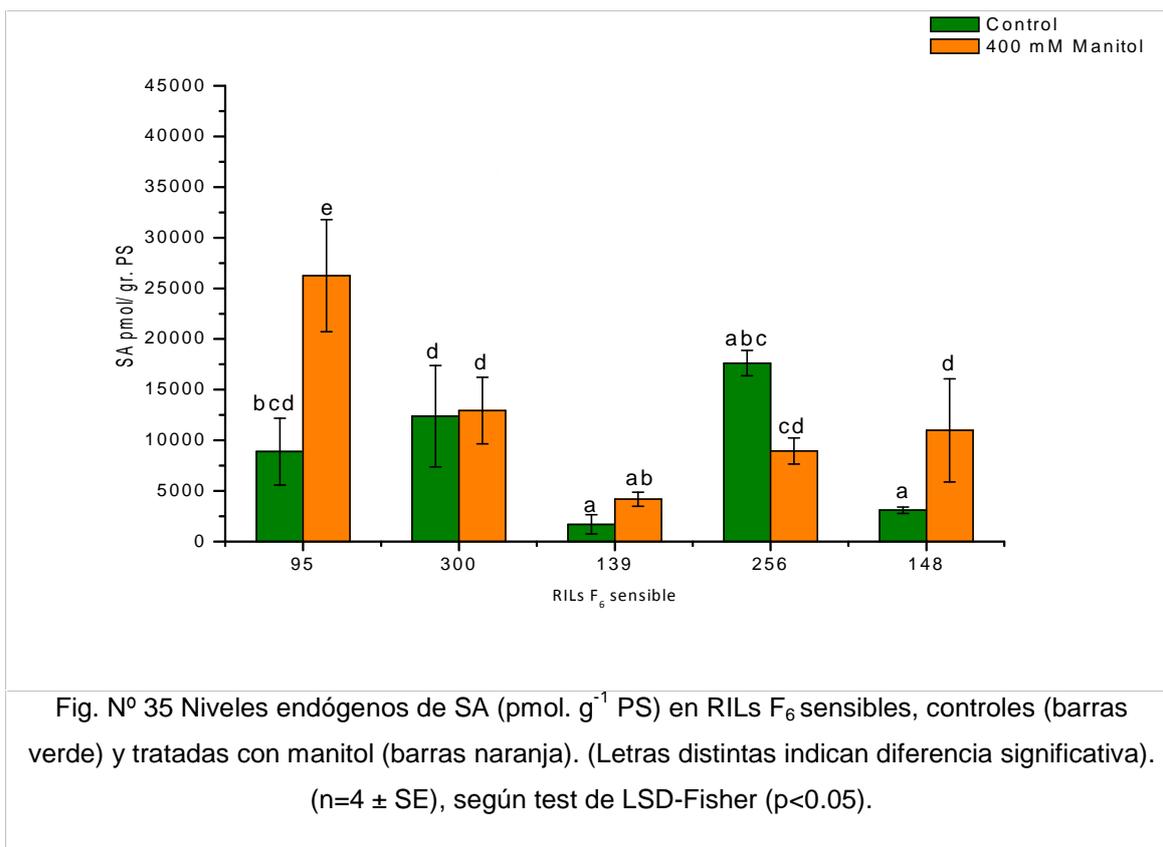


Fig. N° 34 Niveles endógenos de SA (pmol. g^{-1} PS) en RILs F_6 tolerantes, controles (barras verde) y tratadas con manitol (barras naranja). (Letras distintas indican diferencia significativa). (n=4 \pm SE), según test de LSD-Fisher ($p < 0.05$).

En la Fig. N°35, se puede observar que las RILs 95, 139 y 148 muestran un incremento significativo en los niveles de SA cuando se las somete a condiciones de estrés hídrico: En el caso de la RILs 256 y 300, no presenta diferencia significativa en las concentraciones de SA entre controles y tratadas.

Según los resultados evaluados anteriormente en $F_{2,3}$ se puede observar que a excepción de la RIL 256, las demás RILs, 95, 300, 139 y 148, presentan un comportamiento distinto en F_6 , al observado en $F_{2,3}$, aunque es importante aclarar que no se encuentra en ninguna de las líneas extremas a tolerancia a estrés hídrico (117 y 138) en F_6 .



Debido a que SA es una hormona de defensa, su nivel es estrictamente regulado en las plantas. Después de una condición adversa, la mayor parte de la SA es glucosilado por una SA-glucosiltransferasa (SAGT) inducible, para formar SA-glucósido (SAG) (Dean y col., 2005). En *Arabidopsis* existen dos SAGT, una está involucrada principalmente en convertir SA en SAG, mientras que la restante, genera en menos proporción, salicil-glucosa-ester (SGE) (Vlot y col., 2009). El SA se sintetiza en cloroplasto, después de la síntesis, se conjuga con glucosa para formar SAG y pasar a través del citoplasma para almacenarse finalmente en vacuola (Dean y col., 2005). Tras la estimulación de un patógeno o condición adversa, SAG puede ser fácilmente hidrolizado para generar SA activo rápidamente. Otra manera que tienen las plantas de regular los niveles de SA, es a través del “cross-talk” con JA (Zheng y Xinnian 2013; Kohli y col., 2013; Sánchez-Martín y col., 2015). Se ha reportado que puede existir un efecto sinérgico o antagónico que surge de la interacción de ambos o su concentración (Mur y col., 2006). Aplicación de bajas concentraciones de SA y JA da como resultado la expresión sinérgica del gen PR1 para SA y genes PDF 1.2 y Thi1.2 para JA. En contraste, mayor concentraciones de SA y JA tienen efectos antagónica sobre la expresión de los mismos genes (Mur y col., 2006).

De acuerdo a lo observado en las Fig. N°33 y Fig. N°35, donde se realizaron las mediciones de ABA y SA respectivamente para las RILs sensibles, se manifiesta en líneas generales un incremento en las concentraciones de ABA y un incremento de SA, en acuerdo a lo reportado por De Torres-Zabala y col., (2009), ABA estaría regulando negativamente la defensa mediada por SA afectando directamente en su biosíntesis. Si bien existe extensa bibliografía donde se mencionan los efectos benéficos que tiene el SA sobre el normal desarrollo de la planta y su protección ante situaciones adversas, siendo la mayoría de las citas bibliográficas relacionada a la respuesta ante condiciones de estrés biótico, encontrándose bibliografía contradictoria en relación al efecto del SA en referencia al estrés hídrico, como por ejemplo, se puede citar lo publicado por Nemeth y col., (2002), donde se manifiesta una disminución en la tolerancia a sequía en plantas de maíz cuando fueron pre-tratadas con SA durante dos semanas, aun existiendo incrementos en niveles de poliaminas.

Los resultados observados en la Fig. 34, en los que se manifiesta una disminución en las concentraciones de SA cuando las familias tolerantes son sometidas a condiciones de estrés hídrico, estarían en concordancia con lo reportado en otras especies. Se observó que bajo condiciones de estrés salino (NaCl 100-150 mM) sólo el 50% de semillas de *Arabidopsis* germinaron, pero en presencia de SA (0,05-0,5 mM) aumentó la germinación en un 80%. Aplicaciones exógenas de SA también invierte parcialmente el efecto oxidativo de paraquat 0,5 mM y estrés por calor (50°C durante 3 h) sobre la germinación de semillas (Alonso-Ramírez y col., 2009). Se reportaron, que tratamiento con SA (0,5 mM durante 24 h) también provocan una fuerte regulación de la iniciación de la traducción y elongación de factores, proteasas y dos subunidades del proteasoma 20S, apoyando la hipótesis que SA mejora la germinación de las semillas a través de los elementos antes mencionados, que son esenciales para la germinación, tanto como para la movilización o la degradación de proteínas acumuladas durante la maduración de la semilla. Además, la biosíntesis de varias enzimas implicadas en vías metabólicas tales como el ciclo del glioxilato, vía de las pentosas fosfato, glucólisis y gluconeogénesis están fuertemente activados por SA, lo que sugiere que SA promueve la liberación de un estado de quiescencia para el establecimiento de una plántula vigorosa (Rajjou y col., 2006).

En el siguiente gráfico, Fig. N° 35, se puede observar que no existe diferencia significativa entre plantas controles y aquellas expuestas a estrés hídrico para las RILs 128, y 283. En el caso de la RIL 252, se manifiesta una diferencia significativa cuando las plantas son sometidas a condiciones de estrés hídrico. Mientras que en la familias 224,

se observa una disminución significativa de SA cuando las plantas están en condiciones de estrés hídrico.

Teniendo en cuenta los resultados evaluados anteriormente en $F_{2:3}$ para las concentraciones de JA y de las RILs evaluadas en condiciones de invernadero (Fig. N° 36), se observa que las familias 128, 252 y 224 se comportaron de igual manera para esta hormona, mientras que la familia 283 en este caso no muestra diferencia significativa.

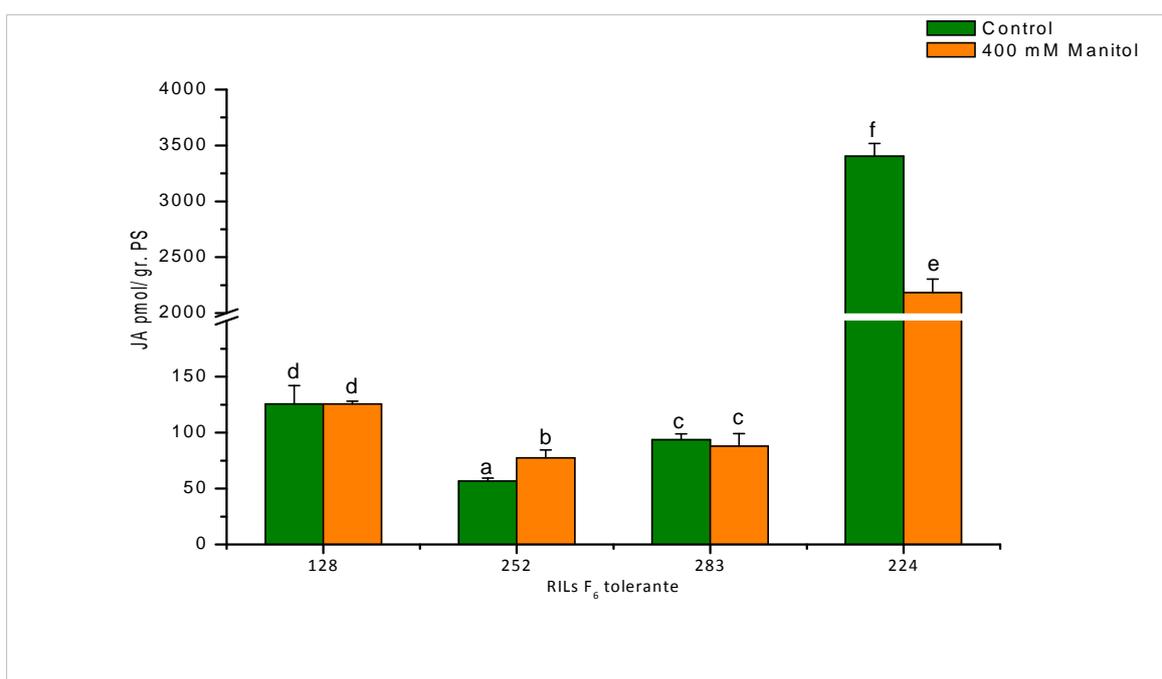
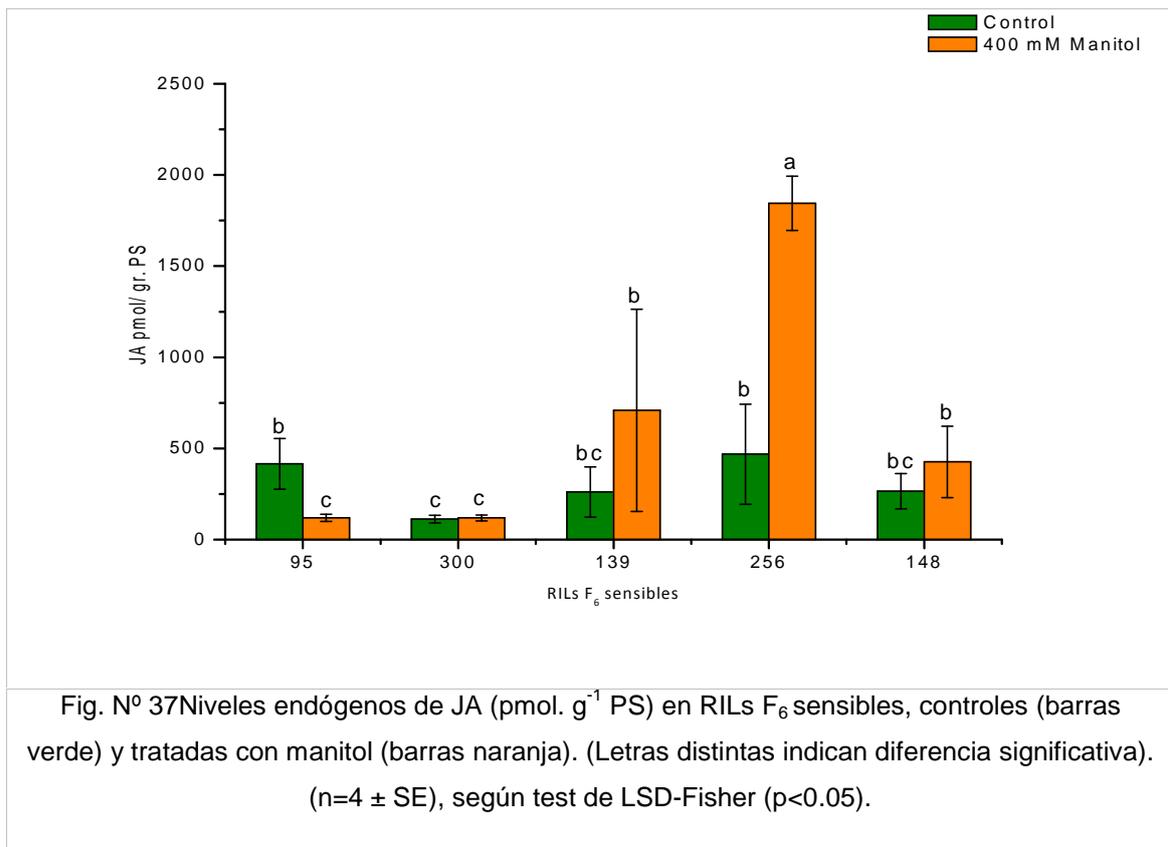


Fig. N° 36 Niveles endógenos de JA (pmol. g^{-1} PS) en RILs F_6 tolerantes, controles (barras verde) y tratadas con manitol (barras naranja). (Letras distintas indican diferencia significativa).
($n=4 \pm \text{SE}$), según test de LSD-Fisher ($p < 0.05$).

En el siguiente gráfico, Fig. N° 37, se puede apreciar un incremento significativo en los niveles de JA cuando las RILs 139, 256 y 148 fueron sometidas a estrés hídrico. No ocurrió lo mismo para la RIL 95, la cual muestra un incremento significativo en la concentración de JA cuando fue sometida a condiciones óptimas de riego. En el caso de la RIL 300, no mostro diferencias significativas entre control y tratamiento. Según lo observado en los resultados evaluados anteriormente en $F_{2:3}$, se puede observar que las RILs 95 y 148, presentan un comportamiento en F_6 igual al expresado en $F_{2:3}$, pero en el caso de las RILs 300, 139 y 256, presentan un comportamiento distinto en F_6 al que se observó con anterioridad en $F_{2:3}$.



Diversos autores proponen que JA y sus derivados están implicados en la respuesta a estrés biótico y abiótico (Yoshida y col., 2009; Pauwels y col., 2008; Szczegieliak y col., 2007; Yun-xia y col., 2010; Ismail y col., 2012, Wasternack, 2014; Wasternack y Hause, 2013; Liu y col., 2015). En este sentido, se demostró que ante condiciones de sequía, se produce un incremento de JA, aumento en los niveles de transcritos y las actividades de enzimas antioxidantes (Shan y Liang, 2010).

El “cross-talk” entre SA-JA, se observó inicialmente en respuesta a heridas de tomate (Harms y col., 1998). En la naturaleza, sin embargo, las plantas son atacadas de forma simultánea y secuencialmente por uno o varios agentes bióticos que inducen las vías de señalización de SA y/o JA. La inducción preferencial de una vía y su interacción antagónica con otra vía se ha demostrado en varias ocasiones (Koornneef y Pieterse, 2008; Pieterse y col., 2012; Kohli y col., 2013). Señales ambientales, como el estrés abiótico termotolerancia (Clarke y col., 2009) o estrés hídrico (Ballare, 2011; Wasternack, 2014; Wasternack y Hause, 2013), parecen estar involucrados en el mantenimiento de un equilibrio entre las vías de SA y JA. El factor de transcripción MYC2 ha surgido recientemente como un regulador maestro en la mayoría de los aspectos de la vía de señalización de JA en *Arabidopsis*; otra función notable de MYC2 es la regulación entre

las vías de señalización de JA y otras fitohormonas como ABA, SA, giberelinas (GAs) y auxinas (AIA) (Kazan y Manners, 2013; Kohli y col., 2013). Basado en el análisis de un mutante para MYC2, se observó que dicha mutación podía incidir negativamente en la síntesis de SA (Nickstadt y col., 2004; Laurie-Berry y col., 2006). Teniendo en cuenta lo expresado anteriormente y lo observado en la figura N°27, una disminución en los niveles de SA podrían deberse, al menos en parte, al efecto regulatorio que JA estaría ejerciendo sobre la síntesis de SA. Por otra parte, diversos ensayos muestran que MYC2 es capaz de activar la expresión del gen de respuesta ABA-RD22, lo que sugiere que MYC2 es un regulador positivo de la señalización de ABA (Abe y col., 2003). Por otro lado y en contraste con lo antes mencionado, se encontró que mutantes en MYC2 mostraron una mayor tolerancia a sequía y una reducción de la producción de biomasa, en comparación con el fenotipo silvestre (Harb y col., 2010).

Horváth y col., (2007) encontraron que las concentraciones de JA y ABA aumentan en órganos vegetativos y las dos hormonas pueden actuar de forma sinérgica para aumentar la tolerancia a la sal. Estos resultados muestran la diferenciación de adaptación entre las diferentes poblaciones *L. esculentum* y apoyan la relación entre la heterogeneidad del medio ambiente y la magnitud de las respuestas en las plantas.

SECCIÓN D.

Caracterización genotípica

D.1. Caracterización Genotípica: Análisis.

Estrategias de mejoramiento asistido, incluyendo marcadores en la retrocruzas y QTL piramidales, se han aplicado en cereales para mejorar la tolerancia de estrés biótico y abiótico (Collard y Mackill, 2008; Ye y Smith, 2010). Debido a la complejidad general de la tolerancia al estrés abiótico y la dificultad en la selección fenotípica de la tolerancia, la Selección Asistida por Marcadores (MAS) ha sido considerado un método eficaz para mejorar la tolerancia al estrés abiótico (Foolad, 2005). El uso de esta metodología, requiere la identificación de marcadores genéticos que están asociados con genes o QTL que afectan a la tolerancia al estrés de la planta entera o componentes individuales que contribuyen en tal sentido.

En este trabajo, fueron evaluados un total de 210 loci SSR, (Anexo) en busca de polimorfismos para las líneas endocriadas B59 y R432. Un total de 42 marcadores SSR (Tabla N° 4), resultaron polimórficos para las líneas mencionadas los que fueron seleccionaron teniendo en cuenta su reproducibilidad, facilidad de interpretación

(ausencia de bandas producto del deslizamiento enzimático y sitio único de amplificación)
y baja frecuencia de alelos nulos.

Tabla Nº 3 Información de marcadores SSR evaluados

Nombre marcador	Motivo de repetición	Tipo de motivo SSR	Iniciador Forward 5´-3´	Iniciador Reverse 5´-3´	Alelo B59	Alelo R432	Tamaño esperado de alelo	Nº de acceso	Fluoróforo utilizado
HA 293	GA	Dinucleótido	HEX-GGGGACATCTCCCGTCCACC	CCTCATCCATCTCCATCCAATC	122	119	120	G67519	HEX
HA 749	GA GT TA	Dinucleótido	FAM-GGCTAACTGAAACATGGG	GGCTGCTGGAGTGAAGTCC	129	131	136	BV727946	FAM
HA 920	ATC	Trinucleótido	FAM-CCCCATGTAATCGCTTTAG	GTGGGGATATAGTGTTCGGC	176	185	171	BV727955	FAM
HA 928	GT-ATT	Trinucleótido	HEX-CCTTTGTAGTCCCTTACTGG	GGTCGATCATGTATGCGTGTTG	217	221	222	BV728013	HEX
HA 969	TGG	Trinucleótido	FAM-CAGTTCTCACTTGTGA	CATCAATAAGTGGAAAGACGGG	122	110	168	BV727890	FAM
HA 1287	GA	Dinucleótido	HEX-GATATGAGCCCATCACTCATC	GAAGATATGTCAGGTCACACCC	224	212	171	G67413	HEX
HA 1402	ATT	Trinucleótido	FAM-GTGTGAATGTGAGTGTGAATCC	GTCACAGTTGCATATCCATCC	168	157	204	BV727899	FAM
HA 2053	ATT	Trinucleótido	FAM-CACCATCACCCACCTGCACAAG	CATCAAAGCCATTCTCAGCCC	185	130	186	BV728111	FAM
HA 2057	ATT	Trinucleótido	HEX-CACACATCTCTTCTCACTC	GAATCCATCTTTGTAGCTGACCC	117	121	141	BV728112	HEX
HA 2078	GA	Dinucleótido	FAM-GATGGCAAGGTGTTGCAGAATTTG	CAACACACACACTCTCAATACCC	159	155	165	BV727908	FAM
HA 2191	GA	Trinucleótido	HEX-CATATATGTGGGTCGCATATAACC	CATCAAAGCCATTCTCAGCCC	218	205	213	BV005933	HEX
HA 2193	ATT	Trinucleótido	HEX-CATATATGTGGGTCGCATATAACC	GTCACAGTTGCATATCCATCC	127	138	134	BV005998	HEX
HA 2448	GT AT	Trinucleótido	FAM-GAGGATATATTTCCCTCCCCTG	CTACACTTTCGAACAAGAGTAG	212	214	244	BV728038	FAM
HA 2547	GA TA T	Dinucleótido	HEX-CAATCATCAGCATCAGCAACC	CTGCATACGTGTGTATATGC	136	132	140	BV728047	HEX
HA 2579	GT	Dinucleótido	FAM-CGGATTTATGATTTGATTCACCCG	GGATAACACTACCTTTGATGTTG	191	187	190	BV728051	FAM
HA 2719	GA GT	Dinucleótido	HEX-GGCGCCACAGCCATTTTCTG	GACCGAATTCTAGTGAGCCGC	228	243	241	BV728149	HEX
HA 2905	GT	Dinucleótido	HEX-GCTCATCATTCTCTAACACAC	CTTCCAAGAGCTCCTAGCTTC	167	165	165	BV728097	HEX
HA 2920	ATG	Trinucleótido	FAM-AACGTGTTCAATCGGATGC	GAAGATTGGTATGATGGGGC	169	173	178	BV728085	FAM
ORS 16	GA	Dinucleótido	FAM-GAGGAAATAAATCTCCGATTCA	GCAAGGACTGCAATTTAGGG	124	127	138	BV006872	FAM
ORS 297	GT	Dinucleótido	HEX-GTGTCTGCACGAACTGTGGT	TGCAAAGCTCACACTAACCTG	230	224	225	BV006634	HEX
ORS 366	AC	Dinucleótido	HEX-AACCAACTGAGCATTCTGTGA	GCGCTAGGTTAAAGAGGACAAA	185	187	207	BV005949	HEX

Resultados y Discusión

ORS 342	GT	Dinucleótido	HEX-TGTTTCATCAGGTTTGTCTCCA	CACCAGCATAGCCATTCAAA	339	329	342	BV005933	HEX
ORS 354	AT-T	Dinucleótido	HEX-TTATCAACCATGACCGCATC	AAATTTTCTTCTCAAATGAACCTC	160	172	161	BV006644	HEX
ORS 471	AC AT	Trinucleótido	FAM-CTTGCACGCAAAGAATAAAGC	CAAAGTTTTCTCATTTAAGGGG	269	269	271	BV005949	HEX
ORS 510	GT	Dinucleótido	HEX-CATCGCGTCCCTCTCTCTAA	CCAACCATCACAGCAATCAG	249	258	255	BV006290	HEX
ORS 543	CT	Dinucleótido	HEX- CCAAGTTTCAGTTACAATCCATGA	GGTCATTAGGAGTTTGGGATCA	266	268	250	BV006051	HEX
ORS 561	AT-T	Dinucleótido	HEX-CTTTGCACGTTGGTCATCAT	ACCAGCACCTTCCTCAACTG	382	361	381	BV006691	HEX
ORS 607	AG	Dinucleótido	FAM-CTAATACAAAGCAACCCGACAA	GCCTGCACATGAGAATGACA	274	276	275	BV006704	FAM
ORS 613	AG	Dinucleótido	HEX-GTAAACCCTAGGTCAATTTGCAG	ATCTCCGGAAAACATTCTCG	211	226	228	BV006091	FAM
ORS 665	AG	Dinucleótido	HEX-GCACATGAGGTATGGATCTCCT	TGCAAATACAACTCGGGAAA	293	287	286	BV006123	HEX
ORS 727	AG	Dinucleótido	HEX-GGTGGCAAGTGGTGGTTAGA	AAAGCTGGTCATCTCAAGGGTA	150	191	192	BV006163	HEX
ORS 788	AG	Dinucleótido	FAM- CTGGATAAAGATGGGATAAAGAGAG	GGACCCACCAAGATTTGTTTT	266	264	263	BV006202	FAM
ORS 810	AG	Dinucleótido	HEX-TTCAACGTGCGTGATTAAGG	GCGATTTCTTTGGAGACGAA	405	398	398	BV006219	HEX
ORS 887	AC	Dinucleótido	FAM-TCGAAAACGACTAATCCAACCTTC	GAGCATGAACAAGAATTGACACA	249	241	252	BV006290	FAM
ORS 959	GT	Dinucleótido	HEX-CCGCTAAGTATAAACCGCCTATT	CGTCCTCTTCGCATCAATCTTAT	234	236	240	BV006356	HEX
ORS 993	AG	Dinucleótido	FAM-GTGTTACAATCCTTGCCTCGATA	CAAACCACAGGGACCAAAATG	317	333	327	BV006383	FAM
ORS 1024	AG	Dinucleótido	FAM-GGGAAGTGGGCTTGTCTATGTAT	AACACACCGAAATCACCTATGAA	224	228	224	BV006408	FAM
ORS 1041	CT	Dinucleótido	FAM-AAACAAACCTTAATGGGGTCGTA	ATATTGGCTGGTTGATGCTGAT	280	278	279	BV006423	FAM
ORS 1085	CT	Dinucleótido	HEX-GACCTCAAGGCATGCTAACACTC	ACTAAGTGTGTGGACGGGGAAA	277	281	280	BV006463	HEX
ORS 1093	CT	Dinucleótido	HEX-CATATATGTGGGTCGCATATAACC	CTGTGGATCTTTCTAGCAACAA	385	383	386	BV006471	HEX
ORS 1265	CT	Trinucleótido	HEX-GGGTTTAGCAAATAATAGGCACA	ACCCTTGGAGTTTAGGGATCA	226	228	222	BV006617	HEX

Se presenta el nombre del marcador HA (Paniego y col., 2002) y ORS (Tang y col., 2002), número de acceso en Genbank, tipo de repetición, motivo y número de repetición, fluoróforo utilizado en cada marcador, tamaño del alelo presente en el parental R432 (pb), tamaño del alelo presente en el parental B59 (pb), tamaño del alelo esperado en (pb), secuencia del oligonucleótido sentido, secuencia del oligonucleótido anti-sentido.

Los marcadores seleccionados representaron un 20% de los marcadores evaluados. En este sentido Poormohammad Kiani y col., (2007) obtuvieron un valor de polimorfismo de 31.71%, al realizar análisis genéticos en girasol bajo condiciones de estrés hídrico. A partir de ello y de los trabajos de Maringolo, (2007) y Talia, (2008) consideramos que el polimorfismo obtenido en este trabajo de tesis puede ser considerado bajo. Por lo tanto, la incorporación de un mayor número de marcadores SSR en futuros estudios contribuiría a aumentar la probabilidad de detección de QTL asociados al carácter de interés. En la Tabla N° 3 se listan los marcadores SSR evaluados

A los fines de poder tener una aproximación al comportamiento de estas líneas contrastantes al estrés hídrico y definir la viabilidad de realizar un mapeo génico posterior, se realizó un análisis de segregantes agrupados (Bulked Segregant Analysis o BSA) con extremos contrastantes al estrés hídrico, evaluados en forma individual (grupo abierto)

Al genotipificar los bulks tolerantes y sensibles, cada uno de ellos integrado por 6 familias $F_{2:3}$ tolerantes y sensibles extremas de acuerdo a su PGR, se observó una segregación al azar de cada marcador en ambos bulks, indicando la ausencia de asociaciones entre los marcadores SSRs utilizados y el carácter PGR. La imposibilidad de detectar asociaciones positivas entre marcadores SSRs y el carácter PGR puede deberse al escaso número de marcadores SSRs polimórficos utilizados en la evaluación de los bulks tolerantes y sensibles. Cabe destacar que cuanto mayor es el número de SSRs polimórficos utilizados mayor es la probabilidad de detectar una asociación positiva marcador-carácter en estudio. En la bibliografía es posible verificar asociaciones positivas gen-marcador utilizando números que oscilan en promedio entre 120 y 400 marcadores polimórficos entre parentales contrastantes para el carácter en estudio.

Abdel-Tawab y col., (1997; 1998), detectaron RAPD para la tolerancia a estrés salino y tolerancia a estrés hídrico en maíz, mediante la utilización de BSA (Abdel-Tawab y col., 2001; Breto y col., 1994; Rahman y col., 1998; Geng y col., 2016). En este sentido, los marcadores RAPD ofrecen un método simple y rápido para la detección de un gran número de marcadores genómicos en un corto período de tiempo. Smolik, (2013), utilizó dos poblaciones de mapeo F_9 compuestas por 138 y 191 líneas endocriadas recombinantes de centeno, respectivamente, genotipadas con 424 marcadores *RAPDs*, 120 *ISSRs* y 50 *R-ISSRs*, lograron identificar 8 *RAPDs*, 4

ISSRs y 3 *R-ISSRs* ligados a regiones genómicas responsables de la tolerancia a la deficiencia de nitrógeno y potasio. Barakat y col., (2011), empleando una población de mapeo compuesta por 162 F_2 de trigo identificaron 3 marcadores *SSRs* ligados al carácter llenado de grano, utilizado como medida indirecta del carácter tolerancia al estrés térmico (calor). Younis y col., (2007), genotipificaron una población de 1030 F_2 de sorgo con marcadores *RAPDs* e *ISSRs*, logrando identificar regiones genómicas responsables de la tolerancia a salinidad en sorgo. Finalmente Salunkhe y col., (2011) empleando una población de 330 RILs de arroz genotipadas con 343 microsatélites polimórficos entre bulks de carácter extremo (tolerante y sensibles) logrando identificar una asociación positiva con un QTL responsable de la tolerancia a sequía en arroz.

Las investigaciones precedentes demuestran claramente que la utilización de marcadores moleculares combinados con el empleo de la técnica de BSA, ha sido altamente eficiente la evaluación y la identificación de genes de tolerancia a estreses bióticos y abióticos en cultivos de interés agrícola (Darvasi y Soller, 1992; Darvasi y Soller, 1994; Angaji, 2009; Semagn y col., 2010).

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se observan algunos puntos a ser considerados en trabajos futuros en mapeo genético en girasol como la necesidad de considerar en la selección de los parentales de las poblaciones de mapeo aquellos parentales que no sólo presenten características contrastantes para el carácter sino también presenten la mayor distancia genética y una menor proporción bloques génicos provenientes de progenitores silvestres, para garantizar un mayor número de marcadores polimórficos *SSRs* destinados a la evaluación de los bulks extremos, además se podrían incluir SNPs para tener una mayor saturación del genoma y por ultimo y no menos importante es el tamaño de la población en evaluación, más teniendo en cuenta el tipo de segregación observada en este trabajo, todo lo cual permitirá incrementar la posibilidad de encontrar asociaciones positivas entre marcadores polimórficos y el carácter en estudio como la posibilidad de obtener QTL mayores en este tipo de análisis (Hu y col., 2010; Davar y col., 2010).

ANEXO

Tabla N° 4 Información de marcadores SSR evaluados que no resultaron polimórficos para el carácter evaluado.

Nombre marcador											
HA	14	HA	1194	HA	2078	HA	2440	HA	3700	ORS	662
HA	35	HA	1198	HA	2080	HA	2448	ORS	16	ORS	665
HA	51	HA	1208	HA	2098	HA	2492	ORS	31	ORS	679
HA	77	HA	1242	HA	2101	HA	2498	ORS	40	ORS	687
HA	262	HA	1251	HA	2102	HA	2499	ORS	50	ORS	695
HA	286	HA	1258	HA	2145	HA	2547	ORS	59	ORS	718
HA	293	HA	1276	HA	2147	HA	2564	ORS	166	ORS	727
HA	359	HA	1285	HA	2152	HA	2565	ORS	297	ORS	750
HA	432	HA	1287	HA	2153	HA	2566	ORS	301	ORS	774
HA	441	HA	1340	HA	2170	HA	2575	ORS	303	ORS	779
HA	463	HA	1347	HA	2177	HA	2579	ORS	316	ORS	788
HA	477	HA	1358	HA	2178	HA	2598	ORS	331	ORS	807
HA	503	HA	1402	HA	2179	HA	2600	ORS	333	ORS	810
HA	551	HA	1449	HA	2182	HA	2605	ORS	342	ORS	837
HA	683	HA	1457	HA	2188	HA	2619	ORS	349	ORS	844
HA	719	HA	1467	HA	2190	HA	2626	ORS	354	ORS	887
HA	729	HA	1478	HA	2191	HA	2636	ORS	364	ORS	889
HA	746	HA	1554	HA	2192	HA	2702	ORS	366	ORS	899
HA	749	HA	1556	HA	2193	HA	2714	ORS	381	ORS	959
HA	765	HA	1582	HA	2237	HA	2719	ORS	420	ORS	993
HA	790	HA	1626	HA	2252	HA	2752	ORS	423	ORS	1024
HA	911	HA	1738	HA	2265	HA	2758	ORS	457	ORS	1035
HA	920	HA	1752	HA	2272	HA	2870	ORS	460	ORS	1041
HA	928	HA	1753	HA	2319	HA	2877	ORS	471	ORS	1085
HA	934	HA	1837	HA	2332	HA	2905	ORS	510	ORS	1086
HA	969	HA	1856	HA	2334	HA	2920	ORS	534	ORS	1093
HA	991	HA	1938	HA	2335	HA	2989	ORS	543	ORS	1097
HA	1066	HA	2020	HA	2336	HA	2998	ORS	561	ORS	1146
HA	1088	HA	2030	HA	2348	HA	2999	ORS	607	ORS	1152
HA	1188	HA	2033	HA	2363	HA	3059	ORS	609	ORS	1222
HA	1134	HA	2039	HA	2389	HA	3073	ORS	613	ORS	1233
HA	1138	HA	2053	HA	2410	HA	3239	ORS	620	ORS	1240
HA	1155	HA	2057	HA	2418	HA	3278	ORS	623	ORS	1242
HA	1193	HA	2063	HA	2429	HA	3325	ORS	643	ORS	1247
HA	2077	HA	2435	HA	3335	ORS	661	ORS	1262	ORS	1265

Se presenta el nombre del marcador HA (Paniego y col., 2002) y ORS (Tang y col., 2002),

Buffer y soluciones para método de cuantificación del ADNSolución de cuantificaciónH₂O bidestilada: 36 ml

TNE 10 X: 4 ml

Hoechst 33258 (1mg/ml): 4 µl

La solución de Hoescht (bisbenzimidida) debe guardarse en oscuridad en heladera a 4°C como máximo 6 meses.

Solución TNE 10 X

2 M NaCl: 117 g

100 mM Tris base: 12,11 g

10 mM EDTA disódico dihidratado: 3,72 g

pH 7,4 con HCl

Volumen final: 1000 ml

Almacenar a 4°C máximo 3 meses.

Buffer TAE 50X

Tris base: 242 g

Acido acético glacial: 57,1 ml

EDTA 0.5 M: 100 ml

H₂O bidestilada: 842,9 ml

Volumen final: 1000 ml

Buffer TAE 1X

TAE 50X: 20 ml

H₂O bidestilada: 980 ml

Volumen final: 1000 ml

EDTA 0.5M (pH 8)

EDTA: 186,1g

H₂O bidestilada: 1000ml

Ajustar el pH con NaOH.

Esterilizar y guardar en heladera.

NaCl 2 M

NaCl: 117 g

H₂O bidestilada: 1000 mlCOLORANTESBromo Fenol Blue (BPB)Hoechst 33258 (1 mg/ml)

Colorante: 1 mg

H₂O bidestilada: 1 mlSolución de Bromuro de Etidio (0,5 ug/ml)Bromuro de Etidio 5 ugH₂O bidestilada: 10 mlFLUOROFOROS6-FAM: 6-Carboxil-fluoresceínaFórmula molecular: C₂₁H₁₂O₇

Peso molecular: 376.3 g

CONCLUSIONES

El método de Durgbanshi y col., (2005) resultó el más conveniente para evaluar niveles de JA, SA y ABA, permitiendo evaluar varios metabolitos hormonales, con diferentes propiedades físico-químicas, en forma simultánea, siendo una técnica rápida, menos costosa y laboriosa que las otras. Además esta metodología permite una remoción más eficiente de lípidos, haciéndola más adecuada en determinaciones hormonales de cultivos oleaginosos como girasol.

-El poder germinativo relativo (PGR), demostró ser el mejor parámetro para discriminar sensibilidad o tolerancia a estrés hídrico, en familias $F_{2:3}$ (R432 x B59) evaluadas. El peso seco relativo (PSR), por otra parte, no se mostró como un parámetro adecuado para discriminar el carácter antes mencionado.

-Para el parámetro acumulación de biomasa de las F_6 (R432 x B59), cuantificada por el peso seco relativo al control, no se observaron diferencias significativas entre las líneas evaluadas para este ensayo.

-Las familias $F_{2:3}$ tolerantes mostraron un mayor nivel basal de ABA endógeno comparadas con las sensibles. Cuando las plántulas se encontraron en condición de estrés hídrico, la mayoría de las familias tolerantes mostraron reducción en los niveles de esta hormona, mientras que lo opuesto ocurrió en las familias sensibles.

-El ácido salicílico endógeno se observa a igual que ABA un mayor nivel basal en las familias tolerantes ($F_{2:3}$) que en las sensibles, pero en condiciones de estrés hídrico ambas presentan reducción de este metabolito.

-Los niveles endógenos de ácido jasmónico muestran para la mayoría de las familias evaluadas (tolerantes y sensibles, $F_{2:3}$), una reducción de esta hormona cuando fueron sometidas a estrés hídrico.

-Las líneas tolerantes (RILs) F_6 sometidas a estrés hídrico no mostraron una tendencia clara en cambios en concentraciones de ABA, SA y JA, mientras que en las líneas sensibles se observó un mayor número de familias que presentaron un incremento en la concentración de estas hormonas.

-Se observó una mayor concordancia en los incrementos en los niveles de ABA de familias sensibles de $F_{2:3}$ y líneas RILs F_6 sensibles, no así en familias tolerantes como en las otras hormonas vegetales evaluadas donde existió variabilidad en el comportamiento de las familias o RILs.

-El nivel de polimorfismo observado a nivel de ADN entre las líneas endocriadas de girasol B59 y R432 fue del 20 %.

-El análisis de BSA realizado no permitió detectar asociaciones positivas entre el carácter tolerancia al estrés hídrico, registrado a través del PGR y QTL asociados al carácter en cuestión.

PERSPECTIVAS

-En caso de realizarse un mapeo genético o un nuevo análisis BSA de esta población, se propone incrementar el número de marcadores moleculares que presenten polimorfismo, de manera de mitigar, al menos en parte, la existencia de bloques génicos de germoplasma silvestre presentes en estas líneas que podrían contribuir a una distorsión de la segregación.

-Por otra parte en el futuro podría plantearse la utilización de SNPs que permitiría la combinación de BSA ó mapeo con SLAF-seq (Specific Locus Amplified Fragment Sequencing), SLAF-seq es un método eficiente en la secuenciación de alto rendimiento, altamente automatizado, alta resolución para desarrollar marcadores moleculares específicos. Tiene varias características positivas tales como: bajo costo, menos demanda de secuenciación y de gran capacidad y utilidad para grandes poblaciones, lo que ha permitido que SLAF-seq se utilice ampliamente para el descubrimiento de marcadores a gran escala (Zhang y col., 2015; Xiaowen Sun, 2013; Xuewen Xu y col., 2015; Geng y col., 2016).

-En caso de usarse otras poblaciones segregantes, se sugiere para próximos trabajos en girasol utilizar líneas parentales fenotípicamente más extremas al estrés hídrico, pudiendo ser evaluadas en una etapa temprana ($F_{2:3}$) mediante el uso del PGR, y que posean una mayor distancia génica y menor introgresión de germoplasma silvestre de manera de minimizar la distorsión de segregación observada en este trabajo y con ello obtener una mayor detección de regiones genómicas (QTLs) responsables de tolerancia al estrés hídrico.

- Abdel-Tawab FM, Fahmy Eman M, Bahieldin A, Eissa Hala F** (1997) Molecular markers for salt tolerance in some inbreds of maize (*Zea mays* L.). *Arab Univ. J. Agric. Sci., Ain Shams Univ., Cairo*. 5: 389-417.
- Abdel-Tawab FM, Fahmy Eman M, Bahieldin A, Mahmoud Asmahan A, Saleh OM** (1998) Development of molecular genetic indices for drought tolerance in some inbreds and hybrids of maize (*Zea mays* L.). *3rd Arab Conference, Modern Biotech. & Areas of Application in the Arab World, 14-17 December 1998, Cairo, Egypt*. 641-660.
- Abdel-Tawab FM, Rashed MA, El-Domyati FM, Salam TZ, Azer SA, Khafaga AF** (2001) Marker assisted selection for salt tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Egypt. J. Genet. and Cytol.* 29: 175.
- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) Arabidopsis at MYC2 (bHIH) and at MYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant cell*. 15: 63-78.
- Abernethy GA, McManus MT** (1998) Biochemical responses to an imposed water deficit in mature leaf tissue of *Festuca arundinacea*. *Environ. Exp. Bot.* 40: 17-28.
- Acosta IF, Farmer EE** (2010) Jasmonates. *The Arabidopsis Book* 8: e0129. <http://dx.doi.org/10.1199/tab.0129>.
- Adreani P** (2008) Mercado del complejo soja y Análisis de la competitividad de los países exportadores. Programa de inserción agrícola. ATN/ME-9565-RG BID-FOMIN.
- Agrawal GK, Tamogami S, Han O, Iwahashi H, Rakwal R** (2004) Rice octadecanoid pathway. *Biochemical and Biophysics Research Communication*. 317: 1-15.
- Aguirrezabal LAN, Orioli GA, Hernández LF, Pereyra VR, Mirave JP, Pereyra VR, Cardinalli FJ** (2001) Girasol. Aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento. *Balcarce EEA-Facultad de Ciencias Agrarias-UNMdP*. ISBN: 950-9853 71-2. p 111.
- Ahmad S, Ahmad R, Ashraf MY, Ashraf M, Waraich EA** (2009). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to drought stress at germination and seedling growth stages. *Pak. J. Bot.* 41: 647-654.

- Aimar D, Calafat M, Andrade A, Carassay L, Bouteau F, Abdala G, Molas L** (2014) Drought effects on the early development stages of *Panicum virgatum* L.: Cultivar differences. *Biomass Bioenerg.* 66: 49-59.
- Aimar D, Calafat M, Andrade AM, Carassay L, Abdala G, Molas ML** (2011) Drought tolerance and stress hormones: from model organisms to forage crop, in: *Hemanth, K.N., Vasanthaiah, M.C.A. (Eds.), Plants Environ., USA*, pp. 137-164.
- Albertson RC** (2003) Directional selection has shaped the oral jaws of Lake Malawi cichlid fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 5252-5257.
- Albertson RC, Kocher TD** (2005) Genetic architecture sets limits on transgressive segregation in hybrid cichlid fishes. *Evolution.* 59: 686-690.
- Albuquerque FMC, De Carvalho NM** (2003) Effect of type of environmental stress on the emergence of sunflower (*Helianthus annuus* L.), soybean (*Glycine max* L.) and maize (*Zea mays* L.) seeds with different levels of vigor. *Seed Sci Technol.* 31: 465-467.
- Al-Chaarani GR, Roustae A, Gentzbittel L, Mokrani L, Barrault B, Dechamp-Guillaume G, Sarrafi A** (2002) A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theor Appl Genet* 104: 490-496.
- Al-Chaarani GR, Gentzbittel L, Huang XQ, Sarrafi A** (2004) Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits, using *AFLP* and *SSR* markers in RILs of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet.* 109: 1353-1360.
- Al-Chaarani GR, Gentzbittel L, Wedzony M, Sarrafi A** (2005) Identification of QTLs for germination and seedling development in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Science.* 169: 221-227.
- Allinne C, Maury P, Sarrafi A, Grieu P** (2009) Genetic control of physiological traits associated to low temperature growth in sunflower under early showing conditions. *Plant Science.* 177: 349-359.
- Almansouri M, Kinet JM, Lutts S** (2001) Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant Soil.* 231: 243-254.

Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI (2006) Role of auxin in regulating Arabidopsis flower development. *Planta*. 223: 315-328.

Alonso-Ramirez A, Rodriguez D, Reyes D, Jimenez JA, Nicolas G, Lopez-Climent M, Gomez-Cadenas A, Nicolas C (2009) Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in Arabidopsis seeds. *Plant Physiology*. 150: 1335-1344.

Alonso-Ramírez A, Rodríguez D, Reyes D, Jiménez JA, Nicolás G, López-Climent M, Gómez-Cadenas A, Nicolás C (2009) Crosstalk between gibberellins and salicylic acid in early stress responses in *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Signal. Behav.* 4: 750-751.

Altinkut A, Gozukirmizi N (2003) Search for microsatellites associated with water stress tolerance in wheat through bulked segregant analysis. *Mol. Biotechnol.* 23: 97-106.

Alves AAC, Setter TL (2004) Abscisic acid accumulation and osmotic adjustment in cassava under water deficit. *Env Exp Bot.* 51: 259-271.

Anderson JP, Badruzaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 16: 3460-3479.

Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology and Evolution*. 19 (10): 535-544.

Andrade A, Vigliocco A, Alemano S, Alvarez D, Abdala G (2009) Differential accumulation of abscisic acid and its catabolites in drought-sensitive and drought-tolerant sunflower seeds. *Seed Science Research*. 19: 201-211.

Andreou A, Brodhun F, Feussner I (2009) Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Progress in Lipid Research*. 48: 148-170.

Angaji SA (2009) Short cuts for gene tagging. *Research Journal of Biological Sciences*. 4: 1208-1210.

- Arbona V, Argamasilla R, Gómez-Cadenas A** (2010) Common and divergent physiological, hormonal and metabolic responses of *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* to water and salt stress. *J. Plant Physiol.* 167: 1342-1350.
- Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, Chan RL** (2007) The true story of the HD-Zip family. *Trends in Plant Science.* 12: 419-426.
- Arumuganathan K, Earle ED** (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Rep.* 9: 208-219.
- Ashraf M, Akram NA, Arteca RN, Foolad MR** (2010) The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. *Crit Rev Plant Sci* 29: 162-190.
- Ashraf M, Mehmood S** (1990) Response of four Brassica species to drought stress. *Environ Expt Bot.* 30: 93-100.
- Ashraf MY, Naqvi MH, Khan AH** (1996) Evaluation of four screening techniques for drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Agron. Hung.* 44: 213-220.
- Asíns MJ** (2002) Review: Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding.* 121: 281-291.
- Asnaghi C, Roques D, Ruffel S, Kaye C, Hoarau JY** (2004) Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (Bru1) using bulked segregant analysis and AFLP markers. *Theor Appl Genet.* 108: 759-764.
- Bai Y, Du F, Liu H** (2010) Determination strategies of phytohormones: recent advances. *Anal Methods.* 2(12): 1867-1873.
- Bajguz A** (2007) Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiol Biochem.* 45: 95-107.
- Ballare CL** (2011) Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends in Plant Science.* 16: 249-257.

- Bandurska H, Cieslak M** (2013) The interactive effect of water deficit and UV-B radiation on salicylic acid accumulation in barley roots and leaves *Environmental and Experimental Botany*. 94: 9-18.
- Bandurska H, Stroi ski A** (2005) The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. *Acta Physiol Plant*. 27: 379-386.
- Bannenberg G, Martínez M, Hamberg M, Castresana C** (2009) Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids* 44: 85-95.
- Barakat MN, Al-Doss AA, Elshafei AA, Moustafa KA** (2011) Identification of new microsatellite marker linked to the grain filling rate as indicator for heat tolerance genes in F₂ wheat population. *AJCS*. 5(2): 104-110.
- Bartels D, Hussain SS** (2011) Resurrection plants: physiology and molecular biology. In: *Lüttge U, Beck E, Bartels D (eds.) Plant desiccation tolerance. Springer Berlin pp. 339-365.*
- Basal H, Smith CW, Thaxton PS, Hemphill JK** (2005) Seedling drought tolerance in upland cotton. *Crop Sci*. 45: 766-771.
- Baxter CJ, Sabar M, Quick WP, Sweetlove LJ** (2005) Comparison of changes in fruit gene expression in tomato introgression lines provides evidence of genome-wide transcriptional changes and reveals links to mapped QTLs and described traits. *Journal of Experimental Botany*. 56: 1591-1604.
- Bell E, Creelman R, Mullet J** (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 92: 8675-8679.
- Berger S** (2002) Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as tools for studying stress signaling. *Planta*. 214: 497-504.

- Berry ST, Leon AJ, Challis P, Livini C, Jones R, Hanfrey CC, Griffiths S, Roberts A** (1996) Construction of a high density, composite RFLP linkage map for cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L). In: *Proc 14th Int Sunflower Conf Vol 2, Beijing, China*, 1155-1160.
- Berry ST, Leon AJ, Peerbolte R, Challis P, Livini C, Jones R, Feingold S** (1997) Presentation of the Advanta sunflower RFLP linkage map for public research. In: *Proc 19th Sunflower Res Workshop, Fargo, North Dakota, USA*, pp 113-118.
- Berry ST, Leon AJ, Hanfrey CC, Challis P, Burkholz A, Barness S, Rufener GK, LeeM, Caligari PDS** (1995) Molecular marker analysis of *Helianthus annuus* L.:2.Constructionofan RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theor Appl Genet* 91: 195-199.
- Bert PF, Dechamp-Guillaume G, Serre F, Jouan I, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P, Vear F** (2004) Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. *Theor Appl Genet*. 109: 865-874.
- Betty M, Finch-Savage WE, King GJ, Lynn JR** (2000) Quantitative genetic analysis of seed vigour and pre-emergence seedling growth traits in *Brassica oleracea* L. *New Phytol*. 148: 277-286.
- Bhatt GM, Ellison FW, Mares DJ** (1983) *Inheritance Studies of Seeds*, vol. 2, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 69.
- Bhupinder S, Usha K** (2003) Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under Waters stress. *Plant Growth Regul*. 39: 137-141.
- Biasutti CA, Galiñanes V** (2001) Influencia del ambiente de selección sobre la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) bajo estrés hídrico. Relaciones entre caracteres de plántula con el rendimiento a campo. *Agriscientia*. 18: 37-44.
- Blum A** (2005) Drought resistance, water-use efficiency and yield potential: Are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Aust J Agric Res*. 56: 1159-1168.

Bolsa de comercio de Rosario Enero (2014/2015) Informativo semanal. Año XXXI N° 1641.

Borsani O, Valpuesta V, Botella MA (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 EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2: 48-54.

Breto MP, Asins MJ, Carbonell EA (1994) Salt tolerance in Lycopersicon species. III. Detection of quantitative trait loci by means of molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 88: 395-401.

Brossa R, López-Carbonell M, Jubany-Marí T, Alegre L (2011) Interplay between abscisic acid and jasmonic acid and its role in water-oxidative stress in wild-type, ABA-deficient, JA-deficient, and ascorbate-deficient Arabidopsis plants. *J Plant Growth Regul.* 30: 322-333.

Browse J (2009) A Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review in Plant Biology*. 60: 183-205.

Browse J (2009) The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and signaling. *Phytochem.* 70: 1539-1546.

Brunel D (1994) A microsatellite marker in *Helianthus annuus* L. *Plant Mol Biol.* 24: 397-400.

Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. *Plant J.* 42: 567-585.

Burke JM, Tang S, Knapp SJ, Rieseberg, LH (2002) Genetic analysis of sunflower domestication. *Genetics* 161: 1257-1267.

- Byun HR, Wilhite DA** (1999) Objective Quantification of Drought Severity and Duration. *Journal of Climate*. 12: 2747-2756.
- Cai HW, Gao ZS, Yuyama N, Ogawa N** (2003) Identification of AFLP markers closely linked to the *rhm* gene for resistance to Southern Corn Leaf Blight in maize by using bulked segregant analysis. *Mol Genet Genomics*. 269: 299-303.
- Catinot J, Buchala A, Abou-Mansour E, Métraux JP** (2008) Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Lett*. 582: 473-478.
- Causse M, Duffe P, Gómez MC, Buret M, Damidaux R, Zamir D, Chevalier C, Lemaire-Chamley M, Rothan C** (2004) A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany*. 55: 1671-1685.
- Chadha KC, Brwon SA** (1974) Biosynthesis of phenolic acids in tomato plants infected with *Agrobacterium tumefaciens*. *Can. J. Bot*. 52: 2041-2047.
- Chan Z, Bigelow PJ, Grumet R, Loescher W** (2012) Comparison of salt stress resistance genes in transgenic *Arabidopsis thaliana* indicates that extent of transcriptomic change may not predict secondary phenotypic or fitness effects. *Plant Biotechnol J*. 10: 284-300.
- Chan Z, Grumet R, Loescher W** (2011) Global gene expression analysis of transgenic, mannitol-producing, and salt-tolerant *Arabidopsis thaliana* indicates widespread changes in abiotic and biotic stress-related genes. *J Exp Bot*. 62: 4787-4803.
- Chandler PM, Robertson M** (1994) Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 45: 113-141.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS** (2003) Understanding plant response to drought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*. 30: 239-264.
- Chen F, D'Auria JC, Tholl D, Ross JR, Gerzhenzon J, Noel JP, Pichersky E** (2003) An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *Plant J*. 36: 577-588.

Chen S, Li J, Wang T, Polle A, Huüttermann A (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.

Chen S, Liu Z, Cui J, Ding J, Xia X, Liu D, Yu J (2011) Alleviation of chilling-induced oxidative damage by salicylic acid pretreatment and related gene expression in eggplant seedlings. *Plant Growth Regul.* 65: 101-108.

Chen W, Gai Y, Liu S, Wang R, Jiang X (2010) Quantitative analysis of cytokinins in plants by high performance liquid chromatography: electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *J Integr Plant Biol.* 52: 925-932.

Chen Z, Zheng Z, Huang J, Lai Z, Fan B (2009) Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal. Behav.* 4: 493-496.

Chen ZH, Hills A, Lim CK, Blatt MR (2010) Dynamic regulation of guard cell anion channels by cytosolic free Ca^{+2} concentration and protein phosphorylation. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology.* 61: 816-825.

Chinnusamy V, Gong Z, Zhu JK (2008) Abscisic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology.* 50: 1187-1195.

Chiwocha SD, Abrams SR, Ambrose SJ, Cutler AJ, Loewen M, Ross AR, Kermode AR (2003) A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermotolerance of lettuce (*Lactuca sativa* L.) Seeds. *Plant J.* 35: 405-417.

Clarke SM, Cristescu SM, Miersch O, Harren FJM, Wasternack C, Mur LAJ (2009) Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist.* 182: 175-187.

Clarke SM, Mur LAJ, Wood E, Scott IM (2004) Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal.* 38: 432-447.

- Collard BCY, Mackill DJ** (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty first century. *Philos. Trans. Roy. Soc. B.* 363: 557-572.
- Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD** (2004) Breeding for high water-use efficiency. *J Exp Bot.* 55: 2447-2460.
- Connor DJ, Hall AJ** (1997) Sunflower physiology. A.A. Schneiter (Ed.) *Sunflower technology and production.* 113-182 ASA, CSSA, and SSSA, Madison, Wis.
- Creelman RA, Mullet JE** (1997) Biosynthesis and actions of jasmonates in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 48: 355-381.
- Cristea M, Drochioue G** (1987) Possibilities to stimulate germination of thermally treated and wheat and maize seeds. *Cercetari Agronomice in Moldova.* 4: 49-55.
- Cutler AJ, Krochko JE** (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends Plants Sci.* 4: 472-478.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Ann Rev Plant Biol.* 61: 651-679.
- Darvasi A, Soller M** (1992) Selective genotyping for determination of linkage between a molecular marker locus and a quantitative trait locus. *Theoretical and Applied Genetics.* 85: 353-359.
- Darvasi A, Soller M** (1994) Selective DNA pooling for determination of linkage between a marker and a quantitative trait locus. *Genetics.* 138: 1365-1373.
- Davar R, Darvishzadeh R, Majd A, Ghosta Y, Sarrafi A** (2010) QTL mapping of partial resistance to basal stem rot in sunflower using recombinant inbred lines. *Phytopathol Mediterr.* 49: 330-341.
- Dave A, Graham IA** (2012) Oxylin signaling: a distinct role for the jasmonic acid precursor *cis* - (+)-12-oxo-phytodienoic acid (*cis*-OPDA). *Frontiers in Plant Science.* 3: 42. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2012.00042>.

De Torres-Zabala M, Bennett MH, Truman WH, Grant MR (2009) Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host pathogen conflict and moulds plant defense. *Plant J* doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03875.x.

De Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, Rodriguez Egea P, Bogre L, Grant M (2007) *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *Embo J*. 26: 1434-43.

Dean JV, Mills JD (2004) Uptake of salicylic acid 2-O- β -D-glucose into soybean tonoplast vesicles by an ATP-binding cassette transporter-type mechanism. *Physiologia Plantarum*. 120: 603-612.

Dean JV, Mohammed LA, Fitzpatrick T (2005) The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta*. 221: 287-96.

Delker C, Stenzel I, Hause B, Miersch O, Feussner I, Wasternack C (2006) Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* enzymes, products, regulation. *Plant Biology*. 8: 297-306.

Dempsey DMA, Klessig DF (2012) SOS – too many signals for systemic acquired resistance?. *Trends in Plant Science*. 17: 538-545.

Deshmukh R, Singh A, Jain N, Anand S, Gacche R, Singh AK, Gaikwad KS, Sharma TR, Mohapatra T, Singh NK (2010) Identification of candidate genes for grain number in rice (*Oryza sativa* L.). *Funct Integr Genomics*. 10: 339-347.

Dhanda SS, Sethi GS, Behl PK (2004) Indices of drought tolerance in wheat genotypes at early stages of plant growth. *J. Agron. Crop Sci*. 190: 1-6.

Dietz K, Sauter A, Wichert K, Messdaghi D, Hartung W (2000) Extracellular α -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *J. Exp. Bot*. 51: 937-944.

Ding Z, Li S, An X, Liu X, Qin H, Wang D (2009) Transgenic expression of MYB15 confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Genet Genomics*. 36: 17-29.

- Djilianov D, Dobrev P, Daniela P, Moyankova RV, Dessislava TsGS, Gajdosova VM** (2013) Dynamics of Endogenous Phytohormones during Desiccation and Recovery of the Resurrection Plant Species *Haberlea rhodopensis*. *J Plant Growth Regul.* DOI 10.1007/s00344-013-9323-y.
- Djilianov D, Ivanov S, Moyankova D, Miteva L, Kirova E, Alexieva V, Joudi M, Peshev D, Van den Ende W** (2011) Sugar ratios, glutathione redox status and phenols in the resurrection species *Haberlea rhodopensis* and the closely related non-resurrection species *Chirita eberhardtii*. *Plant Biol.* 13: 767-776.
- Dobra J, Motyka V, Dobrev P, Malbeck J, Prasil IT, Haisel D, Gaudinova A, Havlova M, Gubis J, Vankova R** (2010) Comparison of hormonal response to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline content. *J Plant Physiol.* 167: 1360-1370.
- Doebley JF, Gaut BS, Smith BD** (2006) The molecular genetics of crop domestication. *Cell.* 127: 1309-1321.
- Dombrowski JE** (2003) Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants. *Plant Physiol.* 132: 2098-2107.
- Du F, Ruan G, Liu H** (2012) Analytical methods for tracing plant hormones. *Anal Bioanal Chem.* 403:1-20.
- Du H, Liu H, Xiong L** (2013) Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Front. Plant Sci.* 4: 397. doi: 10.3389/fpls.2013.00397.
- Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho JV, Gómez-Cadenas** (2005) A Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 53: 8437-8442.
- Ebrahimi A, Maury P, Berger M, Poormohammad Kiani S, Nabipour A, Shariati F, Grieu P, Sarrafi A** (2008) QTL mapping of seed-quality traits in sunflower recombinant inbred lines under different water regimes. *Genome.* 51: 599-615.

El-Kadi DA, Afiah SA, Aly MA, Badran AE (2006) Bulk segregant analysis to develop molecular markers for salt tolerance in Egyptian cotton. *Arab. J. Biotechnol.* 9: 129-142.

Ellis JR, Pashley CH, Burke JM, McCauley DE (2006) High genetic diversity in a rare and endangered sunflower as compared to a common congener. *Molecular Ecology.* 15: 2345-2355.

El-Midaoui M, Talouizte A, Benbella M, Serieys H, Griveau Y, Berville A (2001) Effect of osmotic pressure on germination of sunflower seeds (*Helianthus annus* L.). *Helia.* 24: 129-134.

El-Maarouf-Bouteau H, Sajjad Y, Bazin J, Langlade N, Simona M. Cristescu, Baudouin E, Bailly C, Balzergue S (2015) Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. *Plant Cell and Environment.* 38: 364-374.

El-Tayeb MA (2005) Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regul.* 45: 215-224.

Engelberth J, Schmelz EA, Alborn HT, Cardoza YJ, Huang J, Tumlinson JH (2003) Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapor-phase extraction and gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry. *Anal Biochem.* 312: 242-250.

Fan J, Hill L, Crooks C, Doerner P, Lamb C (2009) Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* 150: 1750-1761.

Farmer EE, Almeras E, Krishnamurthy V (2003) Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol.* 6: 372-378.

Fernández C, Alemano S, Vigliocco A, Andrade A, Abdala G (2012) Stress hormone levels associated with drought tolerance vs. sensitivity in sunflower (*Helianthus annus* L.). *Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants.* Ed. Prof. Nafees A. Khan. Springer-Verlag. p: 249-276.

Ferreira ME y Grattapaglia D (1998) Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. *Brasilia EMBRAPA.* 220p.

Feussner I, Wasternack C (2002) The lipoxygenase pathway. *Annual Review in Plant Biology*. 53: 275-297.

Finkelstein RR, Rock CD (2002) Abscisic acid biosynthesis and response. In *The Arabidopsis Book*, Somerville, C.R., and Meyerowitz, E.M., eds (Rockville, MD, www.aspb.org/publications/arabidopsis/: *American Society of Plant Biologists*.

Fischer G, Shah M, Van Velthuisen H, Nachtergaele FO (2001) Global agroecological assessment for agriculture in the 21 st century. Luxemburgo, Austria: *IIASA and FAO*.

Flores Berrios E, Gentzbittel L, Kayyal H, Alibert G, Sarrafi A (2000) *AFLP* mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Theor Appl Genet*. 101: 1299-1306.

Foolad MR (2005) Breeding for abiotic stress tolerances in tomato. In: *Ashraf, M, Harris, P.J.C. (Eds.), Abiotic Stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches. The Haworth Press Inc., New York, USA*. 613-684.

Forcat S, Bennett M, Mansfield J, Grant M (2008) A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. *Plant Methods*. 4: 16-24.

Frey KJ (1976) Plant breeding in the seventies: Useful genes from wild plant species. *Egypt. J. Genet. Cytol*. 5: 460-482.

Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol*. 9: 436-442.

Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, Katagiri T, Kidokoro S, Kanamori N, Umezawa T, Fujita M, Maruyama K, Ishiyama K, Kobayashi M, Nakasone S, Yamada K, Ito T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*. 50: 2123-2132.

- Gao XP, Wang XF, Lu YF, Zhang LY, Shen YY, Liang Z, Zhang DP** (2004) Jasmonic acid is involved in the water-stress-induced betaine accumulation in pear leaves. *Plant Cell and Environment*. 27: 497-507.
- Garcion C, Lohmann A, Lamodiére E, Catinot J, Buchala A, Doermann P, Métraux JP** (2008) Characterization and biological function of the *Isochorismate Synthase 2* gene of Arabidopsis. *Plant Physiol*. 147: 1279-1287.
- Gaskin P, MacMillan J** (1991) GC-MS of Gibberellins and Related Compounds: Methodology and a Library of Reference Spectra. *Cantocks Enterprises, Bristol, UK*.
- Gedil MA, Wye C, Berry S, Segers B, Peleman J, Jones, R, Leon A, Slabaugh MB, Knapp SJ** (2001) An integrated restriction fragment length polymorphism amplified fragment length polymorphism linkage map for cultivated sunflower. *Genome*. 44: 213-221.
- Geng X, Jiang C, Yang J, Wang L, Wu X, Wei W** (2016) Rapid Identification of Candidate Genes for Seed Weight Using the SLAF-Seq Method in (*Brassica napus*) *PLOS ONE* | DOI:10: 1371/journal.pone.0147580.
- Gentzbittel LF, Vear YX, Zhang A, Berville P, Nicolas M** (1995) Development of a consensus linkage *RFLP* map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet*. 90: 1079-1086.
- Gentzbitte IL, Mestries E, Mouzeyar S, Mazeyrat F, Badaoui S, Vear F, De Labrouhe DT, Nicolas P** (1999) A composite map of expressed sequences and phenotypic traits of the sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome. *TheorAppl Genet* 99: 218-234.
- Gepstein S, Glick B** (2013) Strategies to ameliorate abiotic stress-induced plant senescence. *Plant Mol Biol*. DOI 10.1007/s11103-013-0038-z.
- Gevaert S** (2011) Exploring the potential for adaptive differentiation in the granite outcrop plant, *Helianthus porteri*. *Dissertation, University of Georgia*.
- Gianniny C, Stoeva P, Cheely A, Dimaculangan D** (2004) RAPD analysis of mtDNA from tomato flowers free of nuclear DNA artifacts. *BioTechniques*. 36: 772-776.

- Gill RK, Sharma AD, Singh P, Bhullar SS** (2002) Osmotic stress-induced changes in germination, growth and soluble sugar content of *Sorghum bicolor* L. Moench seeds. *Bulg. J. Plant Physiol.* 28: 12-25.
- Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry.* 48: 909-930.
- Glantz MH** (1994) Drought Follows the Plow: Cultivating Marginal Areas. *Cambridge University Press* Cambridge.
- Glauser G, Dubugnon L, Mousavi SAR, Rudaz S, Wolfender JL, Farmer EE** (2009) Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry.* 284: 34506-34513.
- Golam M, Fujita M** (2013) Salicylic acid alleviates copper toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by up-regulating antioxidative and glyoxalase systems. *Ecotoxicology* DOI 10.1007/s10646-013-1073-x.
- Gómez-Cadenas A, Pozo OJ, Carcia-Augustin P, Sancho JV** (2002) Direct analysis of abscisic acid in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray/tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal.* 13: 228-234.
- Gómez-Cadenas A, Tadeo F R, Talon M, Primo-Millo E** (1996) Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of *cleopatra mandarin* requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol.* 112: 401-408.
- Granier C, Tardieu F** (1999) Water deficit and spatial pattern of leaf development. Variability In responses can be simulated using a simple model of leaf development. *Plant Physiol.* 119: 609-619.
- Grant MR, Jones JDG** (2009) Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science.* 324: 750-752.
- Grant V** (1975) Genetics of flowering plants, 2^{da} Ed. New York: Columbia University Press.

Griffiths A, Bray EA (1996) Shoot induction of ABA-requiring genes in response to soil drying. *J Exp Bot.* 47: 1525-1531.

Gruszka D (2013) The brassinosteroid signaling pathway new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 8740-8774.

Guan L, Scandalios JG (1995) Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 5930-5934.

Guozhang K, Gezi L, Wei X, Xiaoqi P, Qiaoxia H, Yunji Z, Tiancai G (2012) Proteomics reveals the effects of salicylic acid on growth and tolerance to subsequent drought stress in wheat. *J. Proteome Res.* 11: 6066-6079.

Gupta PK, Rustgi S, Mir RR (2008) Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity.* 101: 5-18.

Ha S, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS (2012) Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends Plant Sci.* 17: 172-179.

Haddadi P, Yazdi-samadi B, Langlade NB, Naghavi MR, Berger M, Kalantari A, Calmon A, Maury P, Vincourt P, Sarrafi A (2010) Genetic control of protein, oil and fatty acids content under partial drought stress and late sowing conditions in sunflower (*Helianthus annus* L.). *African Journal of Biotechnology.* 9(40): 6768-6782.

Haie N, Keller AA (2008) Effective efficiency as a tool for sustainable water resources management. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 44 (4): 961-968.

Hamada AM (1998) Effects of exogenously added ascorbic acid, thiamin or aspirin on photosynthesis and some related activities of drought-stressed wheat plants. In: *Garab G. (Ed.), Photosynthesis: mechanisms and effects, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.* 2581-2584.

Hamada AM, Al-Hakimi AMA (2001) Salicylic acid versus salinity-drought induced stress on wheat seedlings. *Rostl Výr.* 47: 444-450.

- Han R, Zhang Y, Tian H, Lu X** (2008) Study on Changes of Endogenous Hormones in the Leaves of Alfalfa under Drought Stress. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*.
- Han Z, Liu G, Rao Q, Bai B, Zhao Z, Liu H, Wu A** (2012) A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of acid/alkaline phytohormones in grapes. *J Chromatogr B*. 881: 83-89.
- Hanan E** (2007) Influence of salicylic acid on Stress Tolerance During Seed Germination of *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare*. *Advances in Biological Research*. 1 (1-2): 40-48.
- Hao JH, Dong CJ, Zhang ZG, Wang XL, Shang QM** (2012) Insights into salicylic acid responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons based on a comparative proteomic analysis. *Plant Sci*. 187: 69-82.
- Harb A, Krishnan A, Ambavaram MM, Pereira A** (2010) Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiol*. 154: 1254-1271.
- Harlan JR** (1976) Genetic resources in wild relatives of crops. *Crop Sci*. 16: 329-333.
- Harms K, Ramirez I, Pena-Cortes H** (1998) Inhibition of wound-induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in flax leaves by aspirin and salicylic acid. *Plant Physiology*. 118: 1057-1065.
- Hartung W, Jeschke WD** (1999) Abscisic acid: a long distance stress signal in salt stressed plants. In: *Plant responses to environmental stresses: from phytohormone to genome reorganization*. Lerner H (Ed) New York: Marcel Dekker Inc. 333-348.
- Hassine AB, Lutts S** (2010) Differential responses of saltbush *Atriplex halimus* L. exposed to salinity and water stress in relation to senescing hormones abscisic acid and ethylene. *J Plant Physiol*. 167: 1448-1456.
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A** (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environ Exp Bot*. 68: 14-25.

- He G, Zhu X, Elling AA, Chen L, Wang X** (2010) Global epigenetic and transcriptional trends among two rice subspecies and their reciprocal hybrids. *Plant Cell*. 22: 17-33.
- Heesacker A, Kishore V, Gao W, Tang S, Kolkman J** (2008) SSRs and INDELs mined from the sunflower EST database: abundance, polymorphisms, and cross-taxa utility. *Theor Appl Genet*. 117: 1021-1029.
- Hernandez JA, Jimenez A, Mullineaux P, Sevilla F** (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. *Plant Cell. Environ*. 23: 853-862.
- Hilou A, Zhang H, Franken P, Hause B** (2014) Do jasmonates play a role in arbuscular mycorrhiza-induced local bioprotection of *Medicago truncatula* against root rot disease caused by *Aphanomyces euteiches*?. *Mycorrhiza*. 24: 45-54.
- Himmelbach A, Yang Y, Grill E** (2003) Relay and control of abscisic acid signaling. *Curr Opin Plant Biol*. 6: 470-479.
- Hirai N, Kondo S, Ohigashi H** (2003) Deuterium-labeled phaseic acid and dihydrophaseic acids for internal standards. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 67: 2408-2415.
- Hoisington D, Khairallah M, González De León D** (1994) Laboratory Protocols: CIMMYT *Applied Molecular Genetics Laboratory*. 2^{da}. Ed. Mexico, D. F.: CIMMYT. 51 pags.
- Hong JH, Seah SW, Xu J** (2013) The root of ABA action in environmental stress response. *Plant Cell Rep*. 32: 971-983.
- Horváth E, Janda T, Szalai G, Páldi E** (2002) In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the iso-enzymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. *Plant Sci*. 163: 1129-1135.
- Horváth E, Szalai G, Janda T** (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *J Plant Growth Regul*. 26: 290-300.

Hoth S, Morgante M, Sanchez JP, Hanafey MK, Tingey SV, Chua NH (2002) Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *J Cell Sci.* 115: 4891-4900.

Houghton JT, Callander BA, Varney SK (1990) *Climate Change: The IPCC Scientific Assessment.* Cambridge University Press pp 365.

Howe GA (2004) The roles of hormones in defense against insects and disease. In: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action.* Davies PJ (Ed) Cornell University, NY USA P 610-634.

Hsu SY, Hsu YT, Kao CH (2003) Ammonium ion, ethylene and abscisic acid in polyethylene glycol-treated rice leaves. *Biol Plant.* 46: 239-242.

http://www.alimentosargentinos.gov.ar/oleaginosos/Informes/Informe_Oleaginosas_2010_03Marzo.pdf. Consultado: 23-06-2013.

<http://www.asagir.org.ar/asagir2008/importancia-economica.asp>. Consultado: 10-06-2011.
MAG y P Producción de Aceite 2011.

<http://www.sunflower.uga.edu/cmap/>

Hu FD, Jones RJ (2004) Effects of plant extracts of *Bothriochloa pertusa* and *Urochloa mosambicensis* on seed germination and seedling growth of *Stylosanthes hamata* cv. Verano and *Stylosanthes scabra* cv. Seca. *Aust. J. Agric. Res.* 48: 1257-1264.

Hu J, Seiler G, Kole C (2010) Genetics, genomics and breeding of sunflower. *Routledge, USA Kearsy.*

Hu X, Bidney DL, Yalpani N, Duvick JP, Crasta O, Folkerts O, Lu G (2003) Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiol.* 133: 170-181.

Hu X, Li W, Chen Q, Yang Y (2009) Early signal transduction linking the synthesis of jasmonic acid in plant. *Plant Signal. Behav.* 4: 696-697.

- Huang D, Wu W, Abrams SR, Cutler AJ** (2008) The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *J Exp Bot.* 59: 2991-3007.
- Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JI** (2010) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: Newly discovered components and newly emerging questions. *Genes and Development.* 24: 1695-1708.
- Hussain M, Malik M, Farooq M, Ashraf M, Cheema M** (2008) Improving Drought Tolerance by Exogenous Application of Glycinebetaine and Salicylic Acid in Sunflower. *Journal of Agronomy and Crop Science.* 194 3: 193-199(7).
- Hvarleva T, Bakalova A, Chepinski I, Hristova-Cherbadji M, Hristov M, Atanasov A** (2007) Characterization of bulgarian sunflower cultivars and inbred lines with microsatellite markers. *Biotechnology and Biotechnology.* 21: 408-412.
- Ingram J, Bartels D** (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47: 377-403.
- International Rules for Seed Testing** (2006) Handbook For Seedling Evaluation 3^{ra} Edition, International Seed Testings Association. Switzerland.
- Iqbal N, Ashraf M, Ashraf MY, Azam F** (2005) Effect of exogenous application of glycinebetaine on capitulum size and achene number of sunflower under water stress. *Int. J. Biol. and Biot.* 2: 765-771.
- Iqbal S, Bano A** (2010) Effect of Drought and Abscisic Acid Application on the Osmotic Adjustment of Four Wheat Cultivars. *J. Chem. Soc. Pak.* 32: 13-19.
- Iqbal N, Ashraf MY** (2006) Does seed treatment with Glycinebetaine improve germination rate and seedling growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under osmotic stress. *Pak. J. Bot.* 38: 1641-1648.
- Ismail A, Riemann M, Nick P** (2012) The jasmonate pathway mediates salt tolerance in grapevines. *J Exp Bot.* 63: 2127-2139.

- Izumi Y, Okazawa A, Bamba T, Kobayashi A, Fukusaki E** (2009) Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nano flow liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 649: 215-225.
- Jacobsen JV, Pearce DW, Poole AT, Pharis R, Mander LN** (2002) Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiologia Plantarum*. 115: 428-441.
- Jaillais Y, Chory J** (2010) Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat Struct Mol Biol*. 17: 642-645.
- Jan CC, Vick BA, Miller JF, Kahler AL, Butler ET III** (1998) Construction of an *RFLP* linkage map for cultivated sunflower. *Theor Appl Genet*. 96: 15-22.
- Janowiak F, Maas B, Dörffling K** (2002) Importance of abscisic acid for chilling tolerance of maize seedlings. *J Plant Physiol*. 159: 635-643.
- Jansson S, Buckler ES** (2007) Genome studies and molecular genetics. Genomics-deeper and wider in order to understanding plant diversity. *Plant Biology*. 10: 107-108.
- Jiang F, Hartung W** (2008) Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): The factors regulating the intensity of the ABA signal. *J Exp Bot*. 59: 37-43.
- Jones DL, Dennis PG, Owen AG, Van Hees PAW** (2003) Organic acid behavior in soils-misconceptions and knowledge gaps. *Plant and Soil*. 248: 31-41.
- Joshi-Saha A, Valon C, Leung J** (2011) Abscisic acid signal off the starting block. *Molecular Plant*. 4: 562-580.
- Jubany-Mari T, Munné-Bosch S, Alegre L** (2010) Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48: 351-358.
- Jung HW, Tschaplinski TJ, Wang L, Glazebrook J, Greenberg JT** (2009) Priming in systemic plant immunity. *Science*. 324: 89-91.

- Kaiser W** (1987) Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologic Plantarum*. 71: 142-149.
- Kanagaraj P, Prince KSJ, Sheeba JA, Biji KR, Paul SB, Senthil A, Babu RC** (2010) Microsatellite markers linked to drought resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Curr. Sci*. 98: 836-839.
- Kannagara T, Seetharama N, Durley RC, Simpson GM** (1983) Drought resistance of Sorghum bicolor: 6. Changes in endogenous growth regulators of plants grown across an irrigation gradient. *Canadian Journal of Plant Science*. 63: 147-15.
- Kanno Y, Jikumaru Y, Hanada A, Nambara E, Abraham SR, Kamiya Y, Seo M** (2010) Comprehensive hormone profiling in developing Arabidopsis seeds: examination of the site of abscisic acid biosynthesis, abscisic acid transport and hormone interactions. *Plant Cell Physiol*. 51: 1988-2001.
- Kato TN, Sakurai SK** (1993) The changes of endogenous abscisic acid in developing grains of two rice cultivars with different grain size Japanes. *J Crop Sci*. 62: 456-461.
- Katsir L, Schillmiller AL, Staswick PE, He SY, Howe GA** (2008) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 7100-7105.
- Kazan K, Manners JM** (2008) Jasmonate Signaling: Toward an Integrated View. *Plant Physiology*. 146: 459-1468.
- Kazan K, Manners JM** (2011) The interplay between light and jasmonate signaling during defense and development. *Journal of Experimental Botany*. 62: 4087-4100.
- Kazan K, Manners JM** (2012) JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends in Plant Science*. 17: 22-31.
- Kazan K, Manners JM** (2013) MYC2: The Master in action Molecular. *Plant*. 3: 686-703.
- Khan S, Khan J** (2010) Drought tolerant wheat cultivar (Raj) for rainfed areas of KPK. Pakistan. *Pak J Agri Sci*. 47: 355-359.

- Kiani SP, Talia P, Maury P, Grieu P, Heinz R** (2007) A Genic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under water treatments. *Plant Science*. 172: 773-787.
- Knopf RR, Feder A, Mayer K** (2012) Rhomboid proteins in the chloroplast envelope affect the level of allene oxide synthase in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 72: 559-571.
- Kohli A, Sreenivasulu N, Lakshmanan P, Kumar P** (2013) The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. *Plant Cell Rep*. 32: 945-957 DOI 10.1007/s00299-013-1461-y.
- Kombrink E** (2012) Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. *Planta*. 236: 1351-1366.
- Koo AJK, Howe GA** (2009) The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*. 70: 1571-1580.
- Koornneef A, Pieterse CMJ** (2008) Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology*. 146: 839-844.
- Korkmaz A, Uzunlu M, Demirkiran AR** (2007) Treatment with acetyl salicylic acid protects muskmelon seedlings against drought stress. *Acta Physiol. Plant*. 29: 503-508.
- Kowalczyk M, Sandberg G** (2001) Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 127: 1845-1853.
- Kramell R, Miersch O, Atzorn R, Parthier B, Wasternack C** (2000) Octadecanoid-derived 10 alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves: 11 implications for different signaling pathways. *Plant Physiol*. 123: 177-186.
- Krantev A, Yordanova R, Popova L** (2006) Salicylic acid decreases Cd toxicity maize plants. *Gen and Appl Plant Physiol Special Issue*. 45-52.
- Kuppusamy K, Walcher C, Nemhauser J** (2009) Cross-regulatory mechanisms in hormone signaling. *Plant Molecular Biology*. 69: 375-381.

- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kimatura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E** (2004) The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J.* 23: 1647-1656.
- Langar K, Lorieux M, Desmarais E, Griveau Y, Gentzbittel L, Berville A** (2003) Combined mapping of *DALP* and *AFLP* markers in cultivated sunflower using F_9 recombinant inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1068-1074.
- Larkindale J, Huang B** (2004) Thermotolerance and antioxidant system in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *J Plant Physiol.* 161: 405-413.
- Larkindale J, Knight MR** (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol.* 128: 682-695.
- Laurie-Berry N, Joardar V, Street I, Kunkel B** (2006) The *Arabidopsis thaliana* JASMONATE INSENSITIVE1 gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 789-800.
- Lee H, Leon J, Raskin I** (1995) Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 4076-4079.
- Lee KH, Piao HL, Kin H-Y, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee IJ, Hwang I** (2006) Activation of glucosidase via stress induced polymerization rapidly increase active pools of abscisic acid. *Cell.* 126: 1109-1120.
- Lee SC, Lan W, Buchanan BB, Luan S** (2009) A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 106: 21419-21424.
- Lefebvre V, North H, Frey A, Sotta B, Seo M, Okamoto M, Nambara E, Marion-Poll A** (2006) Functional analysis of Arabidopsis NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. *The Plant Journal.* 45: 309-319.

- Lehmann J, Atzorn R, Brückner C, Reinbothe S, Leopold J, Wasternack C, Parthier B** (1995) Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. *Planta*. 197: 156-162.
- Lenzi A, Fambrini M, Barotti C, Pugliesi C, Vernieri P** (1995) Seed germination and seedling growth in a wilted mutant of sunflower (*Helianthus annuus* L.): effect of abscisic acid and osmotic potential. *Environ. Exp. Bot.* 35: 427-434.
- Leung J, Giraudat J** (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49: 199-222.
- Li B, Qin Y, Duan H, Yin W, Xia X** (2011) Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in *Populus euphratica*. *J. Exp. Bot.* 62 3765-3779.
- Li C, Schillmiller AL, Liu GL, Lee GI, Jayanty S, Sageman C** (2005) Role of b-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *The Plant Cell.* 17: 987-999.
- Li Y, Wei F, Dong X, Peng J, Liu S, Chen H** (2011) Simultaneous analysis of multiple endogenous plant hormones in leaf tissue of oilseed rape by solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal.* 22: 442-449.
- Li YH, Liu YJ, Xu XL, Jin M, An LZ, Zhang H** (2012) Effect of 24-epibrassinolide on drought stress-induced changes in *Chorispora bungeana*. *Biol. Plant.* 56: 187-191.
- Lin SY, Sasaki T, Yano M** (1998) Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa* L., using backcross inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 96: 997-1003.
- Liu A, Burke JM** (2006) Patterns of nucleotide diversity in wild and cultivated sunflower. *Genetics.* 173: 321-330.
- Liu F, Stützel H** (2002b) Leaf expansion, stomatal conductance and transpiration of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to soil drying. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 127: 878-883.

- Liu F, Stützel H** (2004) Biomass partitioning, specific leaf area and water use efficiency of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to drought stress. *Scientia Horticulturae*. 102: 15-27.
- Liu X, Ma L, Lin YW, Lu YT** (2003) Determination of abscisic acid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A*. 1021: 209-213.
- Liu Z, Zhang S, Han Y** (2015) Functional diversity of jasmonates in rice. *Rice*. 8: 5
DOI 10.1186/s12284-015-0042-9.
- Loake G, Grant M** (2007) Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Plant Biology*. 10: 466-472.
- Longenberger PS, Smith CW, Thaxton PS, McMichael BL** (2006) Development of screening methods for drought tolerance in cotton seedlings. *Crop Sci*. 46: 2104-2110.
- López-Carbonell M, Jauegui O** (2005) A rapid method for analysis of abscisic acid (ABA) in crude extracts of water stressed *Arabidopsis thaliana* plants by liquid chromatograph-mass spectrometry in tandem mode. *Plant Physiol Biochem*. 43: 11-40.
- Loreto F, Harley PC, Di Marco G, Sharkey TD** (1992) Estimation of mesophyll conductance to CO₂ flux by three different methods. *Plant Physiol*. 98: 1437-1443.
- Lu S, Su W, Li H, Guo Z** (2009) Abscisic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H₂O₂ and NO-induced antioxidant enzyme activities. *Plant Physiol Biochem*. 47: 132-138.
- Lu YY, Chen CY** (2005) Molecular Analysis of Lily Leaves in Response to Salicylic Acid Effective towards Protection against *Botrytis elliptica*. *Plant Sci* 169: 1-9.
- Ludwig-Müller J** (2011) Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. *J. Exp. Bot*. 62: 1757-1773.
- Luna MV, Soriano MD, Bottini R, Sheng Ch, Pharis RD** (1993) Levels of endogenous gibberellins, abscisic acid, indol 3 acetic acid and naringenin during dormancy of peach flower buds. *Acta Horticulturae*. 329: 265-267.

- Lyons R, Manners JM, Kazan K** (2013) Jasmonate biosynthesis and signaling in monocots: A comparative overview. *Plant Cell Reports*. 6: 815-827.
- Mandaokar A, Thines B, Shin B, Lange BM, Choi G, Koo YJ, Yoo YJ** (2006) Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *The Plant Journal*. 46: 984-1008.
- Maraghni M, Gorai MN** (2010) Seed germination at different temperatures and water stress levels, and seedling emergence from different depths of *Ziziphus lotus* M. *South African Journal of Botany*. 76: 453-459.
- Maringolo CA** (2007) Regiones cromosómicas asociadas a resistencia a Podredumbre Húmeda del Capítulo de girasol (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary). *Tesis de Magister Scientiae*. Balcarce, Buenos Aires (AR). Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ciencias Agrarias. 133 p.
- Marion-Poll A, Leung J** (2006) Abscisic acid synthesis, metabolism and signal transduction. In: Hedden P., Thomas S.G. (Eds.), *Annual Plant Reviews: plant hormone signaling*. Oxford, UK, pp. 1-35.
- Martínez C, Moreno U** (1992) Expresiones fisiológicas de resistencia a la sequía en dos variedades de papa sometidas a estrés hídrico en condiciones de campo. *Bras. Fisiol. Veg.* 4(1): 33-38.
- Matsuda F, Miyazawa H, Wakasa K, Miyagawa H** (2005) Quantification of indole-3-acetic acid and amino acid conjugates in rice by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Biosci Biotechnol Biochem*. 69: 778-783.
- McCouch SR, Sweeney M, Li J, Jiang H, Thomson M, Septiningsih E, Edwards J, Moncada P, Xiao J, Garris A, Tai T, Martinez C, Tohme J, Sugiono M, McClung A, Yuan LP, Ahn SN** (2007) Through the genetic bottleneck: *Oryza rufipogon* as a source of trait enhancing alleles for *O. sativa*. *Euphytica*. 154: 317-339.
- Meksem K, Kahl G** (2005) The handbook of plant genome mapping. Genetic and physical mapping. *Alemania: WILEY-VCH Verlag Weinheim*. 406 p.

- Métraux JP** (2002) Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 7: 332-4.
- Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, Dietz KJ** (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol.* 132: 272-281.
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV** (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Genetics.* 88: 9828-9832.
- Miersch O, Neumerkel J, Dippe M, Stenzel I, Wasternack C** (2008) Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytologist.* 177: 114-127.
- Mikolajczyk M, Awotunde OS, Muszynska G, Klessig DF, Dobrowolska G** (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.
- Millar AA, Jacobsen JV, Ross JJ, Helliwell CA, Poole AT, Scofield G, Reid JB, Gubler F** (2006) Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J.* 45: 942-954.
- Miller JP** (1995) Inheritance of salt tolerance in sunflower. *HELLA.* 18: 9-16.
- MINAGRI** (2014) Sistema integrado de información Agropecuaria. En: <http://www.siiia.gov.ar/series>. Consultado: 06.06.2014.
- Mishra A, Choudhuri MA** (1999) Effect of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice. *Biologia Plantarum.* 42 (3): 409-415.
- Molina A, Bueno P, Marín MC, Rodríguez-Rosales MP, Belver A, Venema K** (2002) Involvement of endogenous salicylic acid content, lipoxygenase and antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension cultures to NaCl. *New Phytol.* 156: 409-415.

- Monte LM** (1986) Breeding plants for drought resistance the problem and its relevance. Drought resistance in plants physiological and genetic aspects. *Congress of Breeding Plant, Amalfi*. (IT) 1-11.
- Moons A, Prinsen E, Van Montagu M** (1997) Antagonistic effect of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *Plant Cell*. 9: 2243-2259.
- Mori IC, Pinontoan R, Kawano T, Muto S** (2001) Involvement of Superoxide Generation in Salicylic Acid-Induced Stomatal Closure in *Vicia faba*. *Plant Cell Physiol*. 42: 1383-1388.
- Mosher S, Moeder W, Nishimura N, Jikumaru Y, Joo SH, Urquhart W, Klessig DF, Kim SK, Nambara E, Yoshioka K** (2010) The lesion mimic mutant cpr22 shows alterations in abscisic acid signaling and abscisic acid insensitivity in a salicylic acid-dependent manner. *Plant Physiology*. 152: 1901-1913.
- Mueller MJ, Mene-Saffrane L, Grun C, Karg K, Farmer EE** (2006) Oxylin analysis methods *Plant J*. 45: 472-489.
- Mukhtarova LS, Mukhitova FK, Gogolev YV, Grechkin AN** (2011) Hydroperoxide lyase cascade in pea seedlings: Non-volatile oxylinins and their age and stress dependent alterations. *Phytochemistry*. 72: 356-364.
- Müller A, Duüchting P, Weiler EW** (2002) A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single run analysis of acidic phytohormones and related compounds and its application to *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 216: 44-56.
- Munné-Bosch S, Peñuelas J** (2003) Photo and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta*. 217: 758-766.
- Munns R, King RW** (1988) Abscisic acid is not the only stomatal inhibitor in the transpiration stream of wheat plants. *Plant Physiol*. 88: 703-708.
- Munns R, Passioura JB, Milborrow BV, James RA, Close TJ** (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.

- Mur LA, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C** (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.* 140: 249-62.
- Mustafa N, Kim H, Choi Y, Verpoorte R** (2008) Single step purification of salicylic acid from *Catharanthus roseus* cell culture (plant material) by anion exchange for NMR Analysis. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 31: 702-713.
- Mustafa NR, Kim HK, Choi YH, Erkelens C, Lefeber AWM, Spijksma G, Van der Heijden R, Verpoorte R** (2009) Biosynthesis of salicylic acid in fungus elicited *Catharanthus roseus* cells. *Phytochemistry.* 70: 532-9.
- Mustapha G, Tahar T, Mohamed N** (2009) Influence of water stress on seed germination characteristics in invasive *Diploaxis harra* (forssk.) Boiss (brassicaceae) in arid zone of tunisia. *Journal of Phytology.* 1(4): 249-254.
- Mwale SS, Hamusimbi C, Mwansa K** (2003) Germination, emergence and growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to osmotic seed priming. *Seed Science and Technology.* 31: 199-206.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2009) Promoters and transcription factors in abiotic stress-responsive gene expression. *Chapter: Book Abiotic stress adaptation in plants.* 199-216.
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 56: 165-185.
- Narusaka Y, Narusaka M, Seki M, Umezawa T, Ishida J, Nakajima M, Enju A, Shinozaki K** (2004) Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Mol. Biol.* 55: 327-342.
- Navarro L, Bari R, Achard P, Lison P, Nemri A** (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr. Biol.* 18: 650-5.

- Nayyar H, Walia DP** (2004) Genotypic variation in wheat in response to water stress and abscisic acid-induced accumulation of osmolytes in developing grains. *J Agron Crop Sci.* 190: 39-45.
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K** (2008) CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature.* 452: 483-486.
- Nelson GC, Rosegrant MW, Koo J, Robertson R, Sulser T, Zhu T, Ringler C, Msangi S, Palazzo A, Batka M, Magalhaes M, Valmonte-Santos R, Ewing M, Lee D** (2009) Climate Change: Impact on Agriculture and Costs of Adaptation International: *Food Policy Research Institute Washington, D.C. Updated October.*
- Nemeth M, Janda T, Horvath E, Paldi E, Szalai G** (2002) Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. *Plant Sci.* 162: 569-574.
- Nemhauser JL, Hong F, Chory J** (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely non overlapping transcriptional responses. *Cell.* 126: 467-475.
- Nickstadt A, Thomma B, Feussner I, Kangasjärvi J, Zeier J, Loeffler C, Scheel D, Berger S** (2004) The jasmonate-insensitive mutant jin1 shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 5(5): 425-434.
- Nieves N, Martínez M, Castillo R, Blanco M, González-Olmedo J** (2001) Effect of abscisic acid and jasmonic acid on partial desiccation of encapsulated somatic embryos of sugarcane. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 65: 15-21.
- Nilson SE, Assmann SM** (2007) The control of transpiration. Insights from Arabidopsis. *Plant Physiology.* 143: 19-27.
- Nishiyama R, Watanabe Y, Fujita Y, Le DT, Kojima M, Werner T, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Kakimoto T, Sakakibara H, Schmulling T, Tran LS** (2011) Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell.* 23: 2169-2183.

Noir S, Bömer M, Takahashi N, Ishida T, Tsui TL, Balbi V (2013) Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential standby mode. *Plant Physiol.* 161: 1930-51.

Nordborg M, Borevitz JO, Bergelson J, Berry CC, Chory J, Hagenblad J, Kreitman M, Maloof JN, Noyes T, Oefner PJ, Stahl EA, Weigel D (2002) The extent of linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics.* 30: 190-193.

Oilseeds (2014) World Markets and Trade. USDA United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service.

Pal M, Szalai G, Horvath E, Janda T, Paldi E (2002) Effect of salicylic acid during heavy metal stress. *Acta Biol. Szegediensis.* 46: 119-120.

Pan X, Wang X (2009) Profiling of plant hormones by mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 877: 2806-2813.

Pan X, Welti R, Wang X (2008) Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Phytochemistry.* 69: 1773-1781.

Paniego N, Echaide M, Muñoz M, Fernandez L, Torales S, Faccio P, Fuxan I, Carrera M, Zandomeni R, Syarez EY, Hopp EH (2002) Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome.* 45: 34-43.

Paniego N, Heinz R, Fernandez P, Talia P, Nishinakamasu V (2007) Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, edited by C. KOLE. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Sunflower.* 155-179.

Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA (2005) Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxides generation and putrescine prevents programmed cell death syndrome induced by the polyamine oxidase generated hydrogen peroxide. *Planta.* 220: 826-837.

Pardo JM (2010) Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Current Opinion in Biotechnology.* 21: 185-196.

- Park HY, Seok HY, Park BK, Kim SH, Goh CH, Lee BH, Lee CH, Moon YH** (2008) Overexpression of Arabidopsis ZEP enhances tolerance to osmotic stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 375: 80-85.
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF** (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science.* 318: 113-116.
- Parkhi V, Kumar V, Campbell LM, Bell AA, Shah J, Rathore KS** (2010) Resistance against various fungal pathogens and reniform nematode in transgenic cotton plants expressing *Arabidopsis NPR1*. *Transgenic Res.* 19: 959-975.
- Parry ML, Rosenzweig C, Iglesias Ac, Livermore M, Fischer G** (2004) Effects of climate change on global food production under stress emissions and socio-economic scenarios. *Global Environmental Change.* 14: 53-67.
- Paterson AH, Sorrells ME** (1990) Inheritance of grain dormancy in whitekernelled wheat. *Crop Sci.* 30: 25-30.
- Pauwels L, Goossens A** (2011) The JAZ proteins: A crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *The Plant Cell.* 23: 3089-3100.
- Pauwels L, Morreel K, De Witte E, Lammertyn F, Van Montagu M, Boerjan W, Inze D, Goossens A** (2008) Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured Arabidopsis cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105: 1380-1385.
- Pedranzani H, Racagni G, Alemano S, Miersch O, Ramírez I, Peña-Cortés H, Taleisnik E, Machado-Domenech E, Abdala G** (2003) Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regul.* 41: 149-148.
- Pedraza MV, Pereyra VR, Aguirrezábal LAN, Lurlund A** (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. *INTA Balcarce (AR)* Pp. 150.
- Peerbolte RP, Peleman J** (1996) The Cartisol sunflower *RFLP* map (146 loci) extended with 291 *AFLP* markers. In: *Proc 18th Sunflower ResWorkshop, 11-12 Jan 1996, Fargo, ND.* pp 174-178.

- Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, Kozumplick V, Castiglioni P, Taramino G, Motto M** (1998) Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1248-1255.
- Peleg Z, Blumwald E** (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol.* 14: 290-295.
- Perales L, Arbona B, Gómez-Cadenas A, Cornejo MJ, Sanz A** (2005) A relationship between tolerance to dehydration of rice lines and ability for ABA synthesis under stress. *Plant Physiology and Biochemistry.* 43: 786-792.
- Peretti A** (1994) Manual para análisis de semillas. *INTA y Ed. Hemisferio Sur S.A.* Arg. 281p.
- Pereyra-Irujo GA, Velázquez L, Granier C, Aguirrezábal LAN** (2007) A method for drought tolerance screening in sunflower. *Plant Breeding.* 126: 445-448.
- Pérez-Molphe-Balch E, Gidekel M, Segura-Nieto M, Herrera-Estrella L, Ochoa Alejo N** (1996) Effects of water stress on plant growth and root proteins three cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) with different levels of drought tolerance. *Physiology Plant.* 96: 284-290.
- Petcu E, Arsintescu A, Stanciu D** (2001) The effect of drought stress on fatty acid composition in some Romanian sunflower hybrids. *Rom. Agric. Res.* 15: 39-42.
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, van Wees SCM** (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 28: 489-521.
- Pimratch S, Jogloy S, Vorasoot N, Toomsan B, Patanothai A, Holbrook CC** (2008) Relationship between biomass production and nitrogen fixation under drought-stress conditions in peanut genotypes with different levels of drought resistance. *J. Agronomy & Crop Science* ISSN 0931-2250.
- Plunknett DL, Smith NJH, Williams JT, Anishetty NM** (1987) A case study in rice germplasm. In: *Gene banks and the world's food* (Ed) IR. 36: 171-185.

- Poormohammad Kiani S, Grieu P, Maury P, Hewezi T, Gentzbittel L, Sarrafi A (2007)** Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower *Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 114: 193-207.
- Poormohammad Kiani S, Maury P, Nouri L, Ykhlef N, Grieu P, Sarrafi A (2009)** QTL analysis of yield-related traits in sunflower under different water treatments. *Plant Breeding*. 128(4): 363-373.
- Poormohammad Kiani S, Talia P, Maury P, Grieu P, Heinz R, Perrault A, Nishinakamasu V, Hopp E, Gentzbittel L, Paniego N, Sarrafi A (2007)** Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Science*. 172: 773-787.
- Popko J, Hansch R, Mendel RR, Polle A, Teichmann T (2010)** The role of abscisic acid and auxin in the response of poplar to abiotic stress. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*. 12: 242-258.
- Potlakayala SD, DeLong C, Sharpe A, Robert PR (2007)** Conservation of non-expressor of pathogenesis-related genes1 function between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71: 174-183.
- Priano J, Pilatti M (1989)** Tolerancia a la salinidad de forrajeras cultivadas. *Ciencia del suelo* 7: 1-2.
- Price AH, Steel KA, Moore BJ, Barraclough PB, Clark LJ (2000)** A combined *RFLP* and *AFLP* linkage map of upland rice (*Oryza sativa* L.) used to identify QTLs for root-penetration ability. *Theor. Appl. Genet.* 100: 49-56.
- Quarrie S, Lazic-jancic V, Kovacevic D, Steed A, Pekic S (1999)** Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. *J. Exp. Bot.* 50: 1299-1306.
- Rachid Al-Chaarani G, Roustae A, Gentzbittel L, Mokrani L, Barrault G, Dechamp-Guillaume G, Sarrafi A (2002)** A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theor Appl Genet.* 104: 490-496.

Rahman M, Malik TA, Iqbal MJ, Zafar Y, Alam K, Perveen Z, Rehman S (1998) DNA marker for salinity resistance. *Rice Biotechnology Quarterly*. 35: 12-13.

Rajjou L, Maya B, Huguet R, Robin C, Moreau A, Job C, Job D (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 MV, Davis KR (2001) The physiology of ozone-induced cell death. *Planta*. 213: 682-690.

Rao MV, Davis RD (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in Arabidopsis: The role of salicylic acid. *Plant J*. 17: 603-614.

Rao MV, Lee HI, Davis KR (2002) Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant J*. 32: 447-456.

Rasquin I (1992) Role of salicylic acid in plants. *Ann Rev Pl Physiol Mol Biol*. 43: 439-463.

Ray JD, Yu L, McCouch SR, Champoux MC, Wang G, Nguyen HT (1996) Mapping quantitative traits associated with root penetration ability in rice (*Oryza sativa* L). *Theor. Appl. Genet*. 92: 627-636.

Raziuddin J, Bakht Swati ZA, Shafi M, Farhat U, Akmal M (2010) Effect of cultivars and culture medium on callus formation and plant regeneration from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L). *Pak. J. Bot*. 42: 639-652.

Reddy GKM, Dangji KS, Kumar SS, Reddy AV (2003) Effect of moisture stress on seed yield and quality in sunflower, *Helianthus annuus* L. *J. Oilseeds Res*. 20: 282-283.

Redoña ED, Mackill DJ (1996) Mapping quantitative trait loci for seedling vigour in rice using RFLPs. *Theor. Appl. Genet*. 92: 395-402.

Reguera M, Peleg Z, Blumwald E (2012) Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops. *Biochim Biophys Acta*. 1819: 186-194.

- Ren H, Gao Z, Chen L, Wei K, Liu J, Fan Y, Davies WJ, Jia W, Zhang J** (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.
- Rieseberg LH** (1998) Genetic mapping as a tool for studying speciation. In: Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ (eds) *Molecular Systematics of Plants*, 2nd edn. Chapman and Hall, New York, pp 459-487.
- Rieseberg LH, Archer MA, Wayne RK** (1999) Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity*. 83: 363-372.
- Rieseberg LH, Choi H, Chan R, Spore C** (1993) Genomic map of a diploid hybrid species. *Heredity*. 70: 285-293.
- Rieseberg LH, Ellstrand NC** (1993) What can morphological and molecular markers tell us about plant hybridization? *Crit. Rev. Pl. Sci.* 12: 213-241.
- Rivas-San Vicente M, Plasencia J** (2011) Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exp Bot.* doi: 10.1093/jxb/err031.
- Robel IM** (1967) Périodes critiques du tournesol Vis-a-Vis de la secheresse. *Francia: CETIOM. Information Techniques*. 12: 1-9.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG** (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just JASMONATE SALICYLATE antagonism. *Annual Review of Phytopathology*. 49: 317-343.
- Roche J, Hewezi T, Bouniols A, Gentzbittel L** (2009) Real-time PCR monitoring of signal transduction related genes involved in water stress tolerance mechanism of sunflower. *Plant Physiol Biochem*. 47: 139-145.
- Rosegrant MW, C Ringler T, Benson X, Diao D, Resnick J, Thurlow M, Torero C,** (2005) Agriculture and achieving the Millennium Development Goals. *Washington, D.C.: World Bank* [Report No. 32729-GLB].

Ross AR, Ambrose SJ, Cutler AJ, Feurtado JA, Kermod AR, Nelson K, Zhou R, Abrams SR (2004) Determination of endogenous and supplied deuterated abscisic acid in plant tissues by high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Anal Biochem.* 329: 324-333.

Ross GS, McWha JA (1990) The distribution of abscisic acid in *Pisum sativum* plants during seed development. *J. Plant Physiol.* 136: 137-142.

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner H, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 8: 1809-1819.

Sadeghian SY, Yavari N (2004) Effect of water-deficit stress on germination and early seedling growth in sugar beet. *J. Agron. Crop Sci.* 190: 138-144.

Sajedi N, Ardakani M, Madani H, Naderi A, Miransari M (2011) The effects of selenium and other micronutrients on the antioxidant activities and yield of corn (*Zea mays* L.) under drought stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 17: 215-222.

Sajjan AS, Badanur VP, Sajjanar GM (1999) Effects of external water potential on seed germination, seedling growth and vigor index in some genotypes of sunflower. In S. A. Faroda, N. L., S. Joshi Kathju & A. Kar (Eds), Proc. Symp. Recent Adv. in *Manag. of Arid Ecosystem.* 113-122.

Salunkhe ASR, Poornima K, Silvas Jebakumar Prince P, Kanagaraj J, Annie Sheeba K, Amudha KK, Suji A, Senthil R, Chandra Babu (2011) Fine Mapping QTL for Drought Resistance Traits in Rice (*Oryza sativa* L.) Using Bulk Segregant Analysis. *Mol Biotechnol.* 49: 90-95.

Sánchez-Díaz M, Tapia C, Antolín MC (2008) Abscisic acid and drought response of Canarian laurel forest tree species growing under controlled conditions. *Environ. Exp. Bot.* 64: 155-161.

- Sánchez-Martín J, Heald J, Kingston-Smith A, Winters A, Rubiales D, Sanz M, Prats E, Luis A, Mur J** (2015) A metabolomic study in oats (*Avena sativa*) highlights a drought tolerance mechanism based upon salicylate signalling pathways and the modulation of carbon, antioxidant and photo-oxidative metabolism. *Plant Cell and Environment*. 38: 1434-1452.
- Santner A, Calderon-Villalobos LIA, Estelle M** (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol*. 5: 301-307.
- Sauter A, Dietz K, Hartung W** (2002) A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signaling. *Plan Cell and Env*. 25: 223-228.
- Schaller A, Stintzi A** (2009) Enzymes in jasmonate biosynthesis-Structure, function, regulation. *Phytochemistry*. 70: 1532-1538.
- Schaller F, Schaller A, Stintzi A** (2005) Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J Plant Growth Regul*. 23: 179-199.
- Scherer GFE, Ryu SB, Wang X, Matos AR, Heitz T** (2010) Patatin-related phospholipase A: nomenclature, subfamilies and functions in plants. *Trends in Plant Science*. 15: 693-700.
- Schillmiller AL, Howe GA** (2005) Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology*. 8: 369-77.
- Schmelz EA, Engelberth J, Alborn HT, O'Donnell P, Sammons M, Toshima H, Tumlinson JH** (2003) Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 10552-10557.
- Schmelz EA, Engelberth J, Tumlinson JH, Block A, Alborn HT** (2004) The use of vapor phase extraction in metabolic profiling of phytohormones and other metabolites. *Plant J*. 39: 790-808.
- Schommer C, Palatnik JF, Aggarwal P** (2008) Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biology* 6: e230
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0060230>.

Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001) Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 52: 627-658.

Schussler JR, Brenner ML, Brun WA (1991) Relationship of endogenous abscisic acid to sucrose level and seed growth rate of soybeans. *Plant Physiology.* 96: 1308-1313.

Schuster I, Cruz C (2004) Estadísticas genômicas aplicadas a populações derivadas de cruzamentos controlados. 1^o Ed. UFV, Viçosa, Brazil.

Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD (2004) Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes and enzymes. *Plant Physiol.* 131: 1591-1601.

Seiler C, Thammegowda Harshavardhan V, Rajesh K, Sudhakar Reddy P (2011) ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. *Journal of Experimental Botany.* 62: 2615-2632.

Seiler JG, Rieseberg LH (1997) Systematic, origin, resources of the wild and domesticated sunflower. In: Sunflower technology and production. Madison Wisconsin (USA) (Ed) *Agronomy series Agronomy.* 21-65 p.

Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr Opin Plant Biol.* 10: 296-302.

Seltmann MA, Stingl NE, Lautenschlaeger JK, Krischke M, Mueller MJ, Berger S (2010) Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology.* 152: 1940-1950.

Semagn K, Bjornstad A, Xu Y (2010) The genetic dissection of quantitative traits in crops. *Electronic Journal of Biotechnology.* 13: 5.

Senaratna T, Tuochell D, Bunn T, Dixon K (2000) Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regul.* 30: 157-161.

Seo M, Aoki H, Koiwai H, Kamiya Y, Nambara E, Koshiba T (2004) Comparative studies on the Arabidopsis aldehyde oxidase (AAO) gene family revealed a major role of AAO3 in ABA biosynthesis in seeds. *Plant and Cell Physiology*. 45: 1694-1703.

Seo M, Koshiba T (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci*. 7: 41-48.

Seo M; Koshiba T (2011) Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action. *J Plant Res*. 124: 501-507.

Septiningsih EM, John Carlos I. Ignacio, Sendon PMD, Sanchez DL, Abdelbagi MI, Macki DJ (2013) QTL mapping and confirmation for tolerance of anaerobic conditions during germination derived from the rice landrace. *MaZhan Red Theor Appl Genet*. 126: 1357-1366.

Septiningsih EM, Prasetyono J, Lubis E, Tai TH, Tjubaryat T, Moeljopawiro S, McCouch SR (2003) Identification of quantitative trait loci for yield and yield components in an advanced backcross population derived from the *Oryza sativa* variety IR64 and the wild relative *Oryza rufipogon*. *Theor Appl Genet*. 107: 1419-1432.

Septiningsih EM, Sanchez DL, Singh N, Sendon PMD, Pamplona AM, Heuer S, Mackill DJ (2012b) Identifying novel QTLs for submergence tolerance in rice cultivars IR72 and Madabar. *Theor Appl Genet*. 124: 867-874.

Shah J (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant. Biol*. 6: 365-371.

Shakirova FM, Sakhabutdinova AR, Bezrukova MV, Fatkhutdinova RA, Fatkhutdinova DR (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci*. 164: 317-322.

Shan C, Liang Z (2010) Jasmonic acid regulates ascorbate and glutathione metabolism in *Agropyron cristatum* leaves under water stress. *Plant Sci*. 178: 130-139.

Sharma YK, Leon J, Raskin I, Davis KR (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.

Sharp RE, LeNoble ME (2002) ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J Exp Bot.* 53: 33-37.

Shen Y, Tang MJ, Hu YL, Lin ZP (2004) Isolation and characterization of a dehydrin like gene from drought-tolerant *Boea crassifolia*. *Plant Sci.* 166: 1167-1175.

Shi Q, Zhu Z (2008) Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environ. Exper. Bot.* 63: 317-326.

Shichang L; Weiqi C; Long Q; Ying G; Xiangning J (2013) Simultaneous determination of 24 or more acidic and alkaline phytohormones in femtomole quantities of plant tissues by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 405: 1257-1266.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and crosstalk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol.* 3: 217-223.

Shulaev V, Silverman P, Raskin I (1997) Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature.* 385: 718-721.

Singh BD (2000) Plant Breeding-Principles and Methods. Ludhiana. New Delhi (IN): *Kalyani Publishers.* 896.

Sirichandra C, Davanture M, Turk BE, Zivy M, Valot B, Leung J, Merlot S (2010) The Arabidopsis ABA-activated kinase OST1 phosphorylates the bZIP transcription factor ABF3 and creates a 14-3-3 binding site involved in its turnover. *PLoS ONE* 5(11): e13935. doi:10.1371/journal.pone.0013935.

Skirycz A, De Bodt S, Obata T, De Clercq I, Claeys H, De Rycke R, Andriankaja M, Van Aken O, Van Breusegem F, Fernie AR, Inzé D (2010) Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of Arabidopsis leaves to prolonged mild osmotic stress. *Plant Physiol.* 152: 226-244.

Skoric D (2009) Sunflower breeding for resistance to abiotic stresses. *Helia* 32 (50): 1-16. Disponible en: <http://www.doiserbia.nb.rs/issue.aspx?issueid=859>. Consultado: Marzo 2012.

Skriver K, Mundy J (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *The Plant Cell*. 2: 503-512.

Smok MA, Chojnowski M, Corbineau F, Come D (1993) Effects of osmotic treatments on sunflower seed germination in relation with temperature and oxygen. In D. Come & F. Corbineau (Eds.), *Proc. 4th Intl. Workshop on seed: Basic and Applied aspects of Seed Biology.*, (1033-1038). Angers, France.

Smolik M (2013a) Discrimination of population of recombinant inbred lines of rye (*Secale cereale* L.) for different responses to nitrogen-potassium stress assessed at the seedling stage under in vitro conditions. *Electronic Journal of Biotechnology*. 16: 1.

Solodenko A, Sivolap Y (2005) Genotyping of *Helianthus* sp. based on microsatellite sequences. *HELIA*. 28(42): 19-26.

Song J, Feng G, Tian C, Zhang F (2005) Strategies for adaptation of *Suaeda physophora*, *Haloxylon ammodendron* and *Haloxylon persicum* to a saline environment during seed germination stage. *Annals of Botany*. 96: 399-405.

Song JT (2006) Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, AtSGT1, is an early disease response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecules and Cells*. 22: 233-238.

Sreenivasulu N, Sopory SK, Kavi Kishor PB (2007) Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. *Gene*. 388: 1-13.

Stacey G, McAlvin CB, Kim SY, Olivares J, Soto MJ (2006) Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicas* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*. 141: 1473-1481.

Stenzel I, Otto M, Delker C (2012) ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC) gene family members of *Arabidopsis thaliana*: tissue and organ specific promoter activities and in vivo heteromerization. *Journal of Experimental Botany*. 63: 6125-6138.

Sun X, Liu D, Zhang X, Li W, Liu H, Jiang C, Guan N, Ma C, Zeng H, Xu C, Hong W, C, Junjie Shi, Rui Wang, Xianhu Zheng, Cuiyun Lu, Xiaowu Wang, Long Huang , Hongkun Zheng (2013) SLAF-seq: An Efficient Method of Large-Scale De Novo SNP Discovery and Genotyping Using High-Throughput Sequencing. *PLOS ONE* 8: 3-e58700.

Szalai G, Horgosi S, Soós V, Majláth I, Balázs E, Janda T (2010) Salicylic acid treatment of pea seeds induces its de novo synthesis. *J Plant Physiol.* 168: 213-219.

Szczegieliński J (2007) Wound signal transduction pathways in plants. *Post.* 53: 121-32.

Szepesi Á, Csiszár J, Bajkán S, Gémes K, Horváth F (2005) Role of salicylic acid pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt and osmotic stress. *Acta Biologica Szegediensis.* 49: 123-125.

Szepesi Á, Csiszár J, Gémes K, Horváth E, Horváth F, Simon ML, Tari I (2009) Salicylic acid improves acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increase Na⁺ content in leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *J Plant Physiol.* 166: 914-925.

Szepesi AJ, Csiszár S, Bajkán K, Horváth F (2005) Role of salicylic acid pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt and osmotic stress. *Acta Biologica Szegediensis.* 49: 123-125.

Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics.* 105(2): 437-460.

Talia P, Nishinakamasu V, Hopp HE, Heinz RA, Paniego NB (2010) Genetic mapping of EST-SSR, SSR and InDel to improve saturation of genomic regions in a previously developed sunflower map. *Electronic Journal of Biotechnology.* 13 (6).

Talia PM (2008) Desarrollo de un mapa genético y físico integrado para girasol cultivado y su aplicación en la caracterización de regiones genómicas involucradas en la resistencia a enfermedades. *PhD diss. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.*

- Tang S, Hass CG, Knapp J** (2006) Ty3/gypsy-like retrotransposon knockout of a 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinone methyltransferase is non-lethal, uncovers a cryptic paralogous mutation, and produces novel tocopherol (vitamin E) profiles in sunflower. *Theor Appl Genet* 113: 783-799.
- Tang S, Knapp SJ** (2003) Microsatellites uncover extraordinary diversity in native American land races and wild populations of cultivated sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*. 106: 990-1003.
- Tang S, Yu J, Slabaugh M, Shintani D, Knapp S** (2002) Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor. Appl. Genet.* 105: 1124-1136.
- Tarkowski P, Ge L, Yong JWH, Tan SN** (2009) Analytical methods for cytokinins. *TrAC-Trend AnalChem.* 28(3): 323–335.
- Thameur A, Ferchichi A, López-Carbonell M** (2010) Quantification of free and conjugated abscisic acid in five genotypes of barley (*Hordeum vulgare* L.) under water stress conditions. *S Afr J Bot.* 77: 222-228.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J** (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF (COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature.* 448: 661-665.
- Thomson MJ, Tai TH, McClung AM, Hinga ME, Lobos KB, Xu Y, Martinez C, McCouch SR** (2003) Mapping quantitative trait loci for yield, yield components, and morphological traits in an advanced backcross population between *Oryza rufipogon* and the *Oryza sativa* cultivar Jefferson. *Theor Appl Genet.* 107: 479-493.
- Tomokazu K, Mitsunori S** (2011) Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action. *J Plant Res.* 124: 501-507.
- Ton J, Flors V, Mauch-Mani B** (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 14: 310-317.
- Trejo CL, Davies WJ** (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.

Truman W, Bennett MH, Kubigsteltig I, Turnbull C, Grant M (2007) Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104: 1075-80.

Tuna A, Kaya, Cengiz K, Dikilitas M, Higgs D (2008) The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. *Environ. Exp. Bot.* 62: 1-9.

Uddin N, Krieg C, Stöggli W, Stecher G, Abel G, Popp M, Bonn GK, Huck C (2014) Quantitative analysis of salicylic acid and its derivatives in *Primulae radix* by high performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI-MS) and simultaneous determination of total polyphenol content (TPC). *Current Analytical Chemistry*. 10: 271-279.

Uddin N, Kriega C, Stögglib W, Stecherb G, Abelc G, Poppc M, Bonna G, Hucka C Uppalapati SR, Ishiga Y, Wangdi T, Kunkel BN, Anand A, Mysore KS, Bender CL (2007) The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 955-965.

Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17: 113-122.

Vahisalu T, Kollist H, Wang YF (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature*. 452: 487-491.

Vahisalu T, Puzorjova I, Brosche M (2010) Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species and is controlled by SLAC1 and OST1. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. 62: 442-453.

Van Ha C, Leyva-González MA, Osakabe Y, Thi Tran U, Nishiyama R, Watanabe Y, Tanaka M, Seki M, Yamaguchi S, Van Dong N, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Herrera-Estrella L, Phan Tran LS (2014) Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 111: 851-856.

- Van K, Hwang EY, Kim MY, Park HJ, Lee SH, Cregan PB** (2005) Discovery of SNPs in soybean genotypes frequently used as the parents of mapping populations in the United States and Korea. *Journal of Heredity*. 96: 529-535.
- Vanacker H, Lu H, Rate DN, Greenberg JT** (2001) A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in *Arabidopsis*. *Plant J*. 28: 209-216.
- Vassilevska-ivanova R, Kraptchev B, Stancheva I, Geneva M, Iliev I, Georgiev G** (2014) Utilization of related wild species (*Echinacea purpurea*) for genetic enhancement of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Turk J Agric For*. 38: 15-22.
- Venuprasad R, Bool ME, Quiatchon L, Sta Cruz MT, Amante M, Atlin GN** (2011) A large-effect QTL for rice grain yield under upland drought stress on chromosome 1. *Mol. Breeding*. <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-011-9642-2>.
- Venuprasad R, Dalid CO, Del Valle M, Zhao D, Espiritu M, Sta Cruz MT, Amante M, Kumar A, Atlin GN** (2009) Identification and characterization of large effect quantitative trait loci for grain yield under lowland drought stress in rice using bulk segregant analysis. *Theor. Appl. Genet*. 120: 177-190.
- Vicente J, Cascon T, Vicedo B, Garcia-Agustin P, Hamberg M, Castresana C** (2012) Role of 9-lipoxygenase and α -dioxygenase oxylipin pathways as modulators of local and systemic defense. *Molecular Plant*. 5: 914-928.
- Vicente M, Plasencia J** (2011) Salicylic acid beyond defense: Its role in plant growth and development. *J Exp Bot*. 62: 3321-3338.
- Vick B, Zimmerman D** (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol*. 75: 458-461.
- Vigliocco A, Alemano S, Miersch O, Alvarez D, Abdala G** (2007) Endogenous jasmonates during sunflower germination in seeds from plants grown under different soil moisture content. *Seed Science Research*. 17: 91-98.
- Vinocur B, Altman A** (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*. 16: 123-132.

- Vikram P, Swamy BPM, Dixit S, Sta Cruz MT, Ahmed HU, Singh AK, Kumar A** (2011) qDTY1.1, a major QTL for rice grain yield under reproductive-stage drought stress with a consistent effect in multiple elite genetic backgrounds. *BMC Genetics*. 12: 89.
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF** (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47: 177-206.
- Vranceanu AV** (2000) Floarea-soarelui hibrida. Bucuresti (RO). *Editura Ceres*. 1147 p.
- Walton D, Li Y** (1995) Abscisic acid biosynthesis and metabolism. In *Plant Hormones*, Ed. P. Davis. 140-157. Dordrecht: Kluwer Acad.
- Wang C, Yang A, Yin H, Zhang J** (2008) Influence of water stress on endogenous hormone contents and cell damage of maize seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology*. 50: 427-434.
- Wang J, Sun PP, Chen CL, Wang Y, Fu XZ, Liu JH** (2011) An arginine decarboxylase gene PtADC from *Poncirus trifoliata* confers abiotic stress tolerance and promotes primary root growth in Arabidopsis. *J Exp Bot.* 62: 2899-2914.
- Wang L, Chen S, Kong W, Li S, Archbold DD** (2006) Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. *Postharvest Biol Technol.* 41: 244-251.
- Wang RS, Pandey S, Li S, Gookin TE, Zhao Z, Albert R, Assmann SM** (2011) Common and unique elements of the ABA-regulated transcriptome of Arabidopsis guard cells. *BMC Genomics*. 12: 216. doi:10.1186/1471-2164-12-216.
- Wang TL, Cook SK, Francis RJ, Ambrose MJ, Hedley CL** (1987) An analysis of seed development in *Pisum sativum* VI Abscisic acid accumulation. *J Exp Bot.* 38: 1921-1932.
- Wang ZJ, Yang Q, Zhu Z, Zhang Y, Lang X, Wang M** (1998) Reasons for poor grain filling in inter sub specific hybrid rice. *Acta Agron Sin.* 24: 782-787.
- Ward JM, Maser P, Schroeder JI** (2008) Plant ion channels: gene families, physiology and functional genomics analysis. *Annual Review of Physiology*. 71: 59-82.

- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frei dit Frey N, Leung J** (2008) An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Mol Plant*. 1: 198-217.
- Wasternack C** (2006) Oxilipins: biosynthesis, signal transduction and action. In: Hedden P, Thomas S. eds. Plant hormone signaling. *Annual Plant Reviews*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 185-228.
- Wasternack C** (2007) Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot (Lond)*. 100: 681-697.
- Wasternack C** (2014) Action of jasmonates in plant stress responses and development Applied aspects. *Biotechnology Advances*. 32: 31-39.
- Wasternack C, Hause B** (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*. 1-38.
- Wasternack C, Kombrink E** (2010) Jasmonates: Structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chemical Biology*. 5: 63-77.
- Wenger JW, Schwartz K, Sherlock G** (2010) Bulk segregant analysis by high-throughput sequencing reveals a novel xylose utilization gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Plos Genet*. 6(5): e1000942.
- Whitney KD, Randell RA, Rieseberg LH** (2010) Adaptive introgression of abiotic tolerance traits in the sunflower *Helianthus annuus* L. *New Phytologist*. 187: 230-239.
- Wildermuth MC** (2006) Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. *Curr Opin Plant Biol*. 9: 288-96.
- Wildermuth MC, Dewdney J; WuG Ausubel FM** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*. 414: 562-5.
- Wilkinson S, Davies WJ** (2002) ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ*. 25: 195-210.

- Wilkinson S, Davies WJ** (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell & Environment*. 33: 510-525.
- Wills DM, Burke JM** (2007) Quantitative trait locus analysis of the early domestication of sunflower. *Genetics*. 176: 2589-2599.
- Wolters H, Jurgens G** (2009) Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat Rev Genet*. 10: 305-317.
- Wright S** (1978) Variability within and among natural populations in evolution and the genetics of populations. Chicago (USA): *University of Chicago*. 580.
- Wu Q, Wu J, Sun H, Zhang D, Yu D** (2011) Sequence and expression divergence of the AOC gene family in soybean: Insights into functional diversity for stress responses. *Biotechnology Letters*. 33: 1351-1359.
- Wuest SB** (2007) Vapour is the principal source of water imbibed by seeds in unsaturated soils. *Seed Science Research*. 17: 3-9.
- Xiangqing P, Xuemin W** (2009) Profiling of plant hormones by mass spectrometry *Journal of Chromatography B*. 877: 2806-2813.
- Xiao BZ, Chen X, Xiang CB, Tang N, Zhang QF, Xiong LZ** (2009) Evaluation of seven function known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under field conditions. *Mol Plant*. 2: 73-83.
- Xin Z, Zhou X, Pilet P** (1997) Level changes of jasmonic, abscisic and indole-3acetic acids in maize under desiccation stress. *J Plant Physiol*. 151: 120-124.
- Xiong L, Zhu JK** (2003) Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol*. 133: 29-36.
- Xu W, Jia L, Shi W, Liang J, Zhou F, Li Q, Zhang J** (2013) Abscisic acid accumulation modulates auxin transport in the root tip to enhance proton secretion for maintaining root growth under moderate water stress. *New Phytol*. 197: 139-150. doi:10.1111/nph.12004.

- Yamaguchi S, Van Dong N, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Herrera-Estrella L, Phan Tran LS** (2014) Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 111: 851-856.
- Yang JC, Zhang JH, Huang ZL, Zhu QS, Wang L** (2000) Remobilization of carbon reserves is improved by controlled soil-drying during grain filling of wheat. *Crop Science*. 40: 1645-1655.
- Yang JC, Zhang JH, Liu K, Wang ZQ, Liu LJ** (2006) Abscisic acid and ethylene interact in wheat grains in response to soil drying during grain filling. *New Phytologist*. 171: 293-303.
- Yang JJ, Zhang Z, Wang Q, Zhu W, Wang M** (2001) Hormonal changes in the grains of rice subjected to water stress during grain filling. *Plant Physiol*. 127: 315-323.
- Yang SH, Zeevaart JA** (2006) Expression of ABA 8'-hydroxylases in relation to leaf water relations and seed development in bean. *The Plant Journal*. 47: 675-686.
- Yang ZM, Wang J, Wang SH, Xu LL** (2003) Salicylic acid induced aluminium tolerance by modulation of citrate efflux from roots of *Cassia tora L.* *Planta*. 217: 168-174.
- Yasuda M, Ishikawa A, Jikumaru Y** (2008) Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid mediated abiotic stress response in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 20: 1678-1692.
- Ye G, Smith KF** (2010) Marker-assisted gene pyramiding for cultivar development. *Plant Breeding Reviews, John Wiley and Sons*. 3: 219-256.
- Ye N, Jia L, Zhang J** (2012) ABA signal in rice under stress conditions. *Rice*. 5: 1-9.
- Yoshida Y, Sano R, Wada T, Takabayashi J, Okada K** (2009) Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in Arabidopsis. *Development*. 136: 1039-1048.
- Young ND y Tanksley SD** (1989) Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. *Theor. Appl. Genet*. 77: 95-101.

- Younis RAA, Ahmed MF, Mervat M, EL-Menshawi** (2007) Molecular genetic markers associated with salt tolerance in grain sorghum. *Arab J. Biotech.* 10: 249-258.
- Yu J, Buckler ES** (2006) Genetic association mapping and genome organization of maize. *Biotechnology.* 17: 155-160.
- Yu JK, Mangor J, Thompson L, Edwards KJ, Slabaugh MB, Knapp SJ** (2002) Allelic diversity of simple sequence repeat markers among elite inbred lines in cultivated sunflower. *Genome.* 45: 652-660.
- Yu JK, Tang S, Slabaugh MB** (2003) Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. *Crop Science.* 43: 367-387.
- Yu JK, Tang S, Slabaugh MB, Heesacker A, Cole G, Herring M, Soper J, Han F, Chu WC, Webb DM, Thompson L, Edwards KJ, Berry S, Leon AJ, Grondona M, Olungu C, Maes N, Knapp SJ** (2003) Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. *Crop Sci.* 43: 367-387.
- Yun-xia G, Li-jun Z, Feng-hai L, Zhi-bin Ch, Che W, Yun-cong Y, Zhen-hai H, Jie Z, Zhen-sheng S** (2010) Relationship between jasmonic acid accumulation and senescence in drought-stress. *African J Agric Res.* 5 (15): 1978-1983.
- Zaharia LI, Gay Y, Nelson KM, Ambrose SJ, Abrams SR** (2004) Oxidation of 8'-hydroxy abscisic acid in Black Mexican Sweet maize cell suspension cultures. *Phytochemistry.* 65: 3199-3209.
- Zaharia LI, Walker-Simmons M K, Rodriguez CN, Abrams SR** (2005) Chemistry of abscisic acid, abscisic acid catabolites and analogs. *Journal of Plant Growth Regulation.* 24: 274-284.
- Zang X, Komatsu S** (2007) A proteomic approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochemistry.* 68: 426-437.
- Zeevaart JAD, Creelman RA** (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol.* 39: 439-473.

Zhang C, Huang Z (2013) Effects of endogenous abscisic acid, jasmonic acid, polyamines, and polyamine oxidase activity in tomato seedlings under drought stress. *Scientia Horticulturae*. 159: 172-177.

Zhang P, Zhu Y, Wang L, Chen L, Zhou S (2015) Mining candidate genes associated with powdery mildew resistance in cucumber via super-BSA by specific length amplified fragment (SLAF) sequencing. *Genomics* 16: 1058 DOI 10.1186/s12864-015-2041-z.

Zhang D, Chen S, Peng Y, Shen Y (2001) Abscisic acid-specific binding sites in the flesh of developing apple fruit. *J. Exp. Bot.* 52: 2097-2103.

Zhang FJ, Jin YJ, Xu XY (2008) Study on the extraction, purification and quantification of jasmonic acid, abscisic acid and indole-3-acetic acid in plants. *Phytochem Anal.* 19: 560-567.

Zhang GL, Chen LY, Xiao GY, Xiao YH, Chen XB, Zhang ST (2009) Bulk segregant analysis to detect QTL related to heat tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using SSR markers. *Agric. Sci. China.* 8: 482-487.

Zhang HX, Hodson JN, Williams JP, Blumwald E (2001) Engineering salt-tolerant Brassica plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 12832-12836.

Zhang J, Jia W, Yang J, Ismail AM (2006) Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research.* 97: 111-119.

Zhang T, Liu Y, Yang T, Zhang L, Xu S, Xue L, An L (2006b). Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 274-283.

Zhang Y, Turner JG (2008) Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLoS ONE* 3: e3699. [http:// dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003699](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003699).

Zhang Y, Wu R, Qin G, Chen Z, Gu H, Qu LJ (2011b) Overexpression of WOX1 leads to defects in meristem development and polyamine homeostasis in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology.* 53: 493-506.

Zhang Y, Yang Y, Fang B, Gannon P, Ding P, Li X, Zhang Y (2010) *Arabidopsis snc2-1D* activates receptor like tein-mediated immunity transduced through WRKY70. *Plant Cell*. 22: 3153-3163.

Zheng QF, Xinnian D (2013) Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annu Rev Plant Biol*. 64: 839-63.

Zheng YZ, Li T (2000) Changes in proline levels and abscisic acid content in tolerant/sensitive cultivars of soybean under osmotic conditions. *Soybean Genetics NewsLetter* 27 [online journal] available at [http // www.soygenetics.org/articles/sgn2000-016.htm](http://www.soygenetics.org/articles/sgn2000-016.htm) (accessed February 2009).

Zhou R, Cutler A, Ambrose S, Galka M, Nelson K (2004) A new abscisic acid catabolic pathway. *Plant Physiol*. 134: 361-369.

Zhou R, Squires TM, Ambrose SJ, Abrams SR, Ross AR, Cutler AJ (2002) Rapid extraction of abscisic acid and its metabolites for liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogra*. 1010: 75-85.

Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 53: 247-273.

Zoeller M, Stingl N, Krischke M (2012) Lipid profiling of the *Arabidopsis* hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: Biogenesis of pimelic and azelaic acid. *Plant Physiology*. 160: 365-378.