

75582

ESCALANTE, MAXIMILIANO R.

Análisis fisiológico y químico de la rama embriónica de ginseng (BGS X 871) en el cultivo:

2016 **75582**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

**ANALISIS FISIOLÓGICO Y GENÉTICO DE LÍNEAS ENDOCRIADAS DE
GIRASOL (B59 X B71) CON DIFERENTE TOLERANCIA A SEQUIA.**

Lic. Maximiliano R. Escalante

Director: Dr. Sergio G. Alemanno

Co-Directora: Dra. Ruth A. Heinz

206.8

Río Cuarto, Octubre 2016

7.582

MFID:
Clasif:
T. 1063

COMISION ASESORA

Dra. Melina A. Talano: Universidad Nacional de Río Cuarto
Dra. Norma B. Paniego: INTA-Castelar
Dr. Jorge O. Giéco: Universidad Nacional del Litoral

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Universidad Nacional de Río Cuarto Fecha: 17 de Octubre de 2016
Calificación: 10 (sobresaliente)

Jurado

Firma.....

Aclaración: Melina A. Talano

Firma.....

Aclaración:.....

Firma.....

Aclaración: JORGE OMAR GIÉCO

A mis padres, Raúl y Alicia
a mis hermanos, Clarisa, Guillermo y Juan Pablo
y a Lucre mi amor y compañera de vida

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por permitirme realizar mi formación de posgrado.

A mi director Dr. Sergio Alemán por recibirme en su grupo de trabajo y por aportar toda su experiencia y conocimiento.

A mi Co-directora Dra. Ruth Heinz por los aportes que enriquecieron este trabajo y por la buena predisposición durante mis viajes a Castelar.

A los miembros de la comisión asesoras de tesis, Dra. Melina Talano, Dr Jorge Gieco y Dra. Norma Paniego por aceptar ser parte de esta comisión, por las sugerencias que enriquecieron mucho este trabajo y por la buena predisposición.

A Dra. Guillermina Abdala por permitirme realizar mi tesis en el grupo de Fisiología Vegetal.

A todas las personas del grupo de Fisiología Vegetal, docente, pasante y tesisistas por ayudarme ante cada inquietud y por compartir el día a día.

A la gente del INTA Manfredi, Vale, Gabi y Juan por su buena predisposición y por recibirme muy bien cada vez que los visitabas.

A la gente del Inst. de Biotecnología del INTA Castelar, Paula, Seba, Fede, Vero N. y el resto del grupo por sus predisposición tanto en el trabajo como fuera de él, siempre preocupándose para que no me falte nada.

A mis compañeros de trabajo y amigos, Osqui, Ani, Mary, Geno, Cele, Ana, Andrea, Juli, Nati y Diegol que permitieron que la adaptación a un nuevo lugar de trabajo fuera sencillo.

A mis amigos Cristian y Pauli que tuve la suerte de conocer durante la realización de este trabajo, por todos los momentos compartidos.

A mis padres y hermanos que me bancaron durante todo este tiempo.

Por último y el más importantes es para vos Lucre, amor mío, por no dudar en acompañarme a una nueva ciudad y proyecto, lejos de nuestras familias. Gracias por siempre apoyarme, acompañarme y amarme y por querer formar un futuro juntos.

RESUMEN

El déficit hídrico impacta negativamente sobre los cultivos; particularmente en el girasol (*Helianthus annuus* L.) a partir de que el mismo fue desplazado a zonas agrícolas marginales de la pampa argentina por el desarrollo del cultivo de soja. La germinación es la etapa más sensible del ciclo de vida de las plantas a la sequía (Ashraf y Mehmood 1990), lo que impacta en el establecimiento y en el rendimiento del cultivo.

Las plantas cuando se encuentran sometidas a condiciones de estrés hídrico producen cambios morfológicos y metabólicos, entre los que encontramos modificaciones en la síntesis y/o catabolismo de las hormonas relacionadas a estrés. Entre las proteínas efectoras que son activadas por las hormonas y la señal de estrés se encuentran los factores de transcripción, los cuales regulan la expresión génica y la transducción de señales, actuando como nodos en las redes de regulación de gran cantidad de genes que participan en numerosos procesos biológicos (Tripathi y col., 2013, Banerjee y Roychoudhury 2015).

Una de las estrategias para mejorar las respuesta de las plantas a estrés hídrico, es la de disponer de germoplasma tolerante a sequía, para lo cual es necesario contar con herramientas que permita la selección de dicho germoplasma. A partir de ello en este trabajo se planteó un abordaje integral desde estudios genéticos, moleculares y fenotípicos a nivel de plántula en girasol.

En este trabajo se utilizaron dos líneas endocriadas de girasol caracterizadas previamente por su comportamiento contrastante al déficit hídrico, línea B59, sensible, y B71, tolerante (Andrade y col., 2009; Andrade y col., 2013), como sus poblaciones segregantes, F₂ y F_{2,3}, desarrolladas en el INTA Manfredi. Se realizó una evaluación de tales líneas parentales mediante el uso de marcadores moleculares (Microsatélites) destinados a detectar alelos polimorfismos involucrados en la tolerancia a estrés hídrico. A su vez, se realizaron determinaciones del contenido de hormonas como ácido jasmónico (JA), ácido abscísico (ABA) y ácido salicílico (SA), como el patrón de expresión de genes

involucrados en la vías metabólicas de JA, ABA y SA, como de factores de transcripción (FTs) asociados a esas vías hormonales involucradas en la respuesta a estrés hídrico.

Paralelamente se desarrolló la caracterización fenotípica de las familias segregantes $F_{2,3}$ mediante variables de germinación y crecimiento temprano, como también del contenido de JA, ABA y SA. En cuanto al análisis genotípico, en las familias extremas F_2 se evaluaron los marcadores moleculares que presentaron polimorfismo en las líneas parentales mediante la estrategia Bulk Segregant Analysis (BSA) de manera obtener marcadores ligado al carácter tolerancia a estrés hídrico.

Como resultados relevantes se determinó que la variable poder germinativo relativo al control (PGR), resulto apropiada para discriminar germoplasma sensible y tolerante al estrés hídrico en germinación y crecimiento temprano en poblaciones segregantes ($F_{2,3}$) obtenidas del cruzamiento de B71 x B59.

Del análisis de las líneas parentales (B71 y B59) evaluadas a través de marcadores moleculares se observó un nivel de polimorfismo para el carácter tolerancia a estrés hídrico del 23 %. Además en las determinaciones hormonales se observó que los niveles de ABA y JA solo se incrementaron en la parte aérea de la línea tolerante (B71) expuesta a estrés hídrico, como también se destaco en tal línea el rol que cumplió el factor de transcripción MYC 2 como "*master switch*" de otros factores de transcripción como ANAC019/ANAC055 y genes de respuesta a estrés (RD20, RD22) participando de esta manera en el "cross talk" ABA y JA.

ABSTRACT

The water deficit has a negative impact on crops; particularly in sunflower (*Helianthus annuus* L.) from which it was displaced to marginal agricultural areas of the Argentina pampas for the development of soybean cultivation. Germination is the most sensitive stage life cycle of plants to drought (Ashraf and Mehmood 1990), which impacts the establishment and crop yield.

When plants are under drought stress conditions produce morphological and metabolic changes, among which are changes in the synthesis and / or catabolism of hormones related to stress. Among the effector proteins that are activated by hormones and stress signal are found transcription factors, which regulate gene expression and signal transduction, acting as nodes in networks regulation of many genes involved in numerous biological processes (Tripathi et al., 2013, Banerjee and Roychoudhury 2015).

One of the strategies to improve the response of plants to water stress is to have drought tolerant germplasm, which is necessary to have tools that allow selection of the germplasm. From this, in this paper a comprehensive approach was proposed from genetic, molecular and phenotypic level sunflower seedling studies.

This paper presents two inbred sunflower lines previously characterized by its contrast to water deficit behavior, line B59, sensitive, and B71, tolerant (Andrade et al., 2009; Andrade et al., 2013) were used as their segregating populations, F_2 and $F_{2:3}$, developed at INTA Manfredi. An assessment of such parental lines was performed using molecular markers (microsatellites) for detecting polymorphisms alleles involved in tolerance to water stress. Besides, the content of hormones such as jasmonic acid (JA), abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA) determinations, as the pattern of expression of genes involved in metabolic pathways JA, ABA and SA, as transcription factors (TFs) associated with these hormonal pathways involved in the response to water stress were performed.

In addition phenotypic characterization of families segregating $F_{2:3}$ developed by variables germination and early growth, as well as the content of JA, ABA and SA.

Regarding the genotypic analysis, in extreme families F_2 were evaluated with molecular markers that showed polymorphism in the parental lines through the strategy Bulk segregant analysis (BSA) so as to obtain markers linked to the character tolerance to water stress.

As relevant results it was determined that the variable germinating power related at control condition (PGR), turned out appropriate to discriminate sensitive and tolerant germplasm water stress on germination and early growth in segregating populations ($F_{2:3}$) obtained by crossing B71 x B59.

From the analysis of the parental lines (B71 and B59) evaluated through molecular markers was observed polymorphism level 23% for the character tolerance to water stress. In addition to hormonal determinations it was observed that the levels of ABA and JA was only increased in the aerial part of the tolerant line (B71) exposed to water stress, as also highlighted in this line role fulfilled transcription factor MYC 2 as a "master switch" to other transcription factors such as ANAC019/ANAC055 and stress response genes (RD20, RD22) thus participating in the "cross talk" ABA and JA.

ÍNDICE

	Pág.
Comisión asesora	i
Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Resumen en español e inglés	iv
Índice general	viii
Índice de tablas	xii
Índice de figuras	xiii
Abreviaturas	xvi
CAPITULO 1: INTRODUCCION	
1.1-Girasol	1
1.2-Efecto del estrés hídrico en plantas	5
1.3-Respuestas hormonales relacionadas a estrés hídrico	7
1.3.1-Jasmonico y sus derivados	7
1.3.2-Ácido Abscísico	9
1.3.3-Ácido Salicílico y respuesta a estrés abiótico	11
1.4-Análisis génico	12
1.5-Expresión génica	15
CAPITULO 2: HIPOTESIS Y OBJETIVOS	20
Hipótesis y Objetivo General	20
Hipótesis y Objetivos Específicos	21
CAPITULOS 3: Materiales y Métodos	
3-SECCIÓN A	23
Caracterización de material contrastante a estrés hídrico	

3. A.1-Líneas parentales B59 y B71	
3.A1.1-Material Vegetal	23
3.A.2-Evaluación de poblaciones segregantes $F_{2,3}$ (B71 x B59)	
3.A2.1-Material vegetal	23
3.A2.2-Condiciones de crecimiento	23
3.A2.3-Recuento final de germinación	24
3.SECCIÓN B.	24
Caracterización genotípica	
3.B.1-Líneas parentales B59 y B71	
Determinación de polimorfismos de ADN a través de SSR.	
3.B1.1-Extracción y cuantificación de ADN	24
3.B1.2-Amplificación por PCR	25
3.B1.3-Amplificación por PCR multiplexada	26
3.B1.4-Visualización de los productos de amplificación	27
3.B1.4.1- Empleo de geles de agarosa	27
3.B1.4.2-Empleo de electroforesis capilar	27
3.B.2-Poblaciones segregantes F_2 (B71 x B59)	28
3-SECCIÓN C	29
Determinaciones de hormonas vegetales	
3.C.1-Líneas parentales B59 y B71	
3.C1.1- Condiciones de crecimiento	29
3.C1.2-Extracción, purificación de hormonas	30
3.C1.3-Identificación y cuantificación de hormonas	30
3.C1.4-Análisis estadístico.	31
3.C.2-Poblaciones segregantes $F_{2:3}$ (B71 x B59)	

3.C2.1-Extracción, purificación de hormonas	31
3.C2.2-Identificación y cuantificación de hormonas	32
C2.3-Análisis estadístico	32
3-SECCIÓN D	33
3.D.1-Evaluación de la expresión génica de las líneas parentales B59 y B71.	
3.D1.1-Extracción de ARN total	33
3.D1.2- Expresión génica por micromatriz de oligonucleótidos (Chip)	
3.D1.2.1-Pre procesamiento de los datos	34
3.D1.2.2-Diseño experimental	35
3.D1.2.3-Análisis de la expresión génica diferencial	35
3.D1.3-Análisis de nivel de expresión utilizando el programa Mapman	36
3.D1.4-Cuantificación de niveles de expresión de genes candidatos por PCR en tiempo real (qPCR)	36
3.D1.4.1-Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real (qPCR)	37
CAPITULO 4: Resultados y Discusión	
4-SECCIÓN A	39
Caracterización de material contrastante a estrés hídrico	
4.A.1-Líneas parentales B59 y B71	39
4.A.2-Evaluación de poblaciones segregantes $F_{2,3}$ (B71 x B59)	39
4-SECCIÓN B.	41
Caracterización genotípica	
4.B.1-Líneas parentales B59 y B71	41
4.B.2-Poblaciones segregantes $F_{1,2}$ (B71 x B59)	42
4-SECCIÓN C.	45
Determinaciones de hormonas vegetales	

4.C.1-Líneas parentales B59 y B71	
4.C1.1-Contenido endógeno de ABA, JA y SA en condiciones control y estrés hídrico, en parte aérea y radical, de las líneas B59 (sensible) y B71 (tolerante)	45
4.C.2-Poblaciones segregantes F _{2:3} (B71 x B59)	
4.C2.1-Determinaciones de hormonas vegetales en familias F _{2:3}	49
4-SECCIÓN D.	54
Evaluación de la expresión génica de las líneas parentales B59 y B71	
4.D1-Cambios en la expresión de genes relacionados a la vía de síntesis de ABA, JA y SA en el contraste Manitol vs Control, en parte aérea y radical, para ambas líneas B59 sensible y B71 tolerante	54
4.D2-Análisis integrador de la expresión de genes relacionados a la vía metabólica de ABA, JA y SA en líneas parentales B59 y B71 expuestas a condiciones de estrés hídrico y las concentraciones hormonales endógenas	61
4.D2.1-Cambios de expresión de genes que codifican para Factores de transcripción en respuesta de estrés hídrico	63
CAPITULO 5: Conclusión	69
Bibliografía	71
Anexo A	85

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		Página
1	Nombre utilizado de los contrastes y descripción de los mismos	36
2	Cebadores empleados para realizar PCR en tiempo real (qPCR)	37
3	ANOVA individual de progenies $F_{2,3}$ (B71xB59) de girasol para la variable porcentaje de germinación (Manitol 400 mM) en relación al control (PGR).	39
4	Niveles endógenos de SA, JA y ABA relativos al control (%) en familias $F_{2,3}$ sensibles	50
5	Niveles endógenos de SA, JA y ABA relativos al control (%) en familias $F_{2,3}$ tolerantes	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de la parte aérea de planta adulta de girasol; Sistema radical; capítulo; cipsela y semilla	1
2	Superficie sembrada de girasol (ha) 1969-2015. SIIA, 2016. (http://www.sii.gov.ar/_apps/siia/estimaciones/salida.php)	2
3	Producción de girasol (tn)1969-2015. SIIA, 2016. (http://www.sii.gov.ar/_apps/siia/estimaciones/salida.php)	3
4	Principales áreas de cultivo de girasol en Argentina. Dirección de Coordinación de Delegaciones-Estimaciones Agrícolas- MAGyP, 2014	4
5	Vía de síntesis y localización de JAs (modif. de Wasternack y House 2013)	8
6	Vía de síntesis y de localización de ABA (modif. de Seiler y col., 2011).	10
7	Vía de síntesis de SA (modif. de Chen y col., 2009)	12
8	Diagrama del empleo de BSA para mapear genes utilizando marcadores co-dominantes (modificado de Gioco y col., 2011).	14
9	Principales grupos de factores de transcripción involucrados en la regulación de genes de respuesta al estrés hídrico en Plantas (Capiati y Muñiz García, 2011).	17
10	Electroferogramas visualizados con Genemapper	28

11	Validación de la micromatriz en las condiciones de estrés hídrico en líneas parentales B71 y B59	38
12	Distribución de PGR de las familias $F_{2,3}$ (B71xB59) por intervalos de porcentaje de germinación.	40
13	Determinación de PGR (%) en familias $F_{2,3}$ tolerantes y sensibles sometidas a estrés	41
14	Niveles endógenos de ABA en parte aérea y radical de plántulas de las líneas B59 y B71	46
15	Niveles endógenos de JA en parte aérea y radical de Plántulas de las líneas B59 y B71	47
16	Niveles endógenos de SA en parte aérea y radical de Plántulas de las líneas B59 y B71	48
17	Análisis de componentes principales de las familias $F_{2,3}$ extremas sensibles y tolerantes	53
18	Análisis discriminante lineal entre familias tolerantes (T) y sensibles (S).	53
19	Respuesta transcriptómica diferencial de genes pertenecientes a enzimas que forman parte de la vía de síntesis de ABA. .	55
20	Respuesta transcriptómica diferencial de genes pertenecientes a enzimas que forman parte de la vía de síntesis de JA	57

21	Respuesta transcriptómica diferencial de genes que codifican para enzimas que forman parte de la vía de síntesis de SA	60
22	Diagrama que muestra la respuesta transcriptómica diferencial de genes pertenecientes a FTs	65
23	Diagrama que muestra la relevancia de FTs en la respuesta diferencial a estrés hídrico de B71 (línea tolerante) respecto a B59 (línea sensible).	68

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
μl	Micro litro
11-OH-JA:	11-Hidroxi-JA
12-OH-JA:	12-Hidroxi-JA
13-HPOT:	13-hidroperóxido de Ácido Linolénico
13-LOX:	13-Lipooxigenasa
8'-HOABA	8'-hidroxi-ABA
9-HPOT:	9-hidroperóxido de Ácido Linolénico
9-LOX:	9-Lipooxigenasa
AAO:	Aldehído Oxidasa
ABA:	Ácido Abscísico
ABA-GE	Aba glucosa ester
ACP	Análisis de Componentes Principales
ADL	Análisis Discriminantes Lineal
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasas
ADNc	ADN complementario
ANOVA:	Análisis de la Varianza de una vía
AOC:	Aleno Ciclasa
AOS:	Aleno Sintasa
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
B59:	Línea Sensible
B71	Línea Tolerante
BC	Poblaciones generadas por retrocruzadas
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA:	Bulk Segregant Analysis
CC:	Capacidad de Campo
CiLi	Cloruro de Litio

col.	Colaboradores
Cq	Ciclo de Cuantificación
CTAB:	Bromuro de Cetil-Trimetil Amonio
DECP	Diethyl pyrocarbonate
DPA	Ácido Dihidrofaseico
EC	Electroforesis Capilar
EEA	Estación experimental agropecuaria
ESI-:	Electrospray Negativo
ESTs	Expressed Sequence Tags
ET	Etileno
F2 o F2:3	Poblaciones generadas por autofecundación
Fts	Factores de Transcripción
GLY	Glioxalasa I
HPL:	Hidroperóxido Liasa
HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
HR	Humedad Relativa
HRC	Hormona Relativo al Control
ICS:	Isocorismato Sintasa
INTA:	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
ISTA:	International Seed Testing Association
JA:	Ácido Jasmónico
JA-Ile:	Ácido Jasmonico-Isoleucina
JAME:	Metil-jasmónico
JAR1	Ácido Jasmonico amido sintetasa
JAs:	Jasmonatos
LC-ESI-MS/MS:	Cromatografía Líquida Asociados a Espectrometría Masas
log2	Logaritmo en base dos
LOX:	Lipoxigenasa
LSD	Least Significant Difference the Fisher
MeOH:	Metanol
MES	metil Esterasa
mM	Mili Molar
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MRM:	Monitoreo de Reacciones Múltiples

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCED:	9-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa
OPDA:	12-Oxo-Fitodienoico
OPR:	OPDA Reductasa
PA	Ácido Faseico
PAL	Fenilalanina amonio Liasa
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGR:	Poder Germinativo Relativo al Control
PICT:	Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
QTL:	Quantitative Traits Loci
RAPD:	Random Amplified Polymorphic
RG	Gen de referencia
RILs:	Líneas Endocriadas Recombinantes
SA:	Ácido Salicílico
SAG	SA glucosilado
SD	Desvío Estándar
SIR:	Reacción Selectiva de Iones
SNP:	Single Nucleotide Polymorphisms
SSR:	Simple Sequence Repeat
SUR	Sunflower Unigene Resource
TAE	Solución formada por Tris, Acetato y EDTA
Tn	Toneladas
TQD	Triple Cuadropolo
UPLC	Cromatografía Líquida Ultra performance
UV	Luz Ultravioleta
ZEP:	Zeaxantina Epoxidasa
α -LA	α -ácido linoléico

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1-Girasol

El género *Helianthus* pertenece a la familia Asteraceae, subfamilia Asteroideae, tribu Heliantheae y contiene 48 especies con distintos niveles de ploidía (diploides, tetraploides y hexaploides) (Seiler y Riesberg 1997). El representante diploide más conocido por su importancia económica es el girasol cultivado (*Helianthus annuus* L.), el cual posee 34 cromosomas ($2n=2x=34$) (Arumuganathan y Earle, 1991).

Esta especie posee un capítulo con flores tubulosas en el centro, masculinas y bilabiadas hacia afuera, femeninas o estériles. 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. 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 semilla (botánicamente, un fruto denominado cipsela), es un fruto seco, uniseminado, con pericarpio (cáscara) separado de la verdadera semilla (pepita) (Aguirrazabal y col., 2001) (Fig. 1).

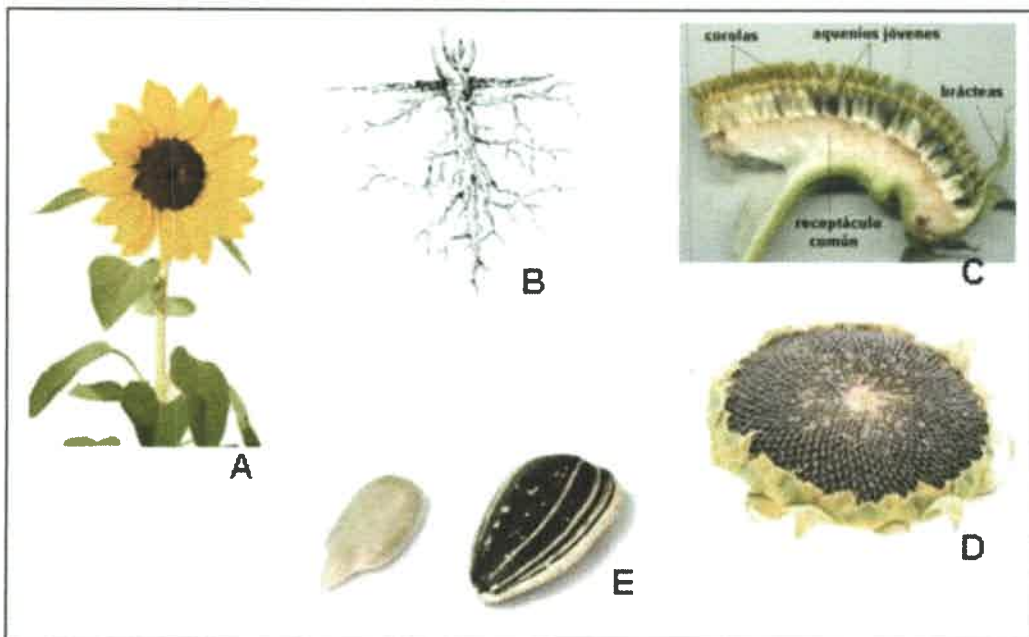


Fig. 1. A-Estructura de la parte aérea de planta adulta de girasol;
B-Sistema radical; C y D- Capítulo; E-cipsela y semilla.

Según sus aplicaciones, hay al menos tres variedades de girasol

- Girasol oleaginosa (se divide en tres variedades de acuerdo a la composición relativa de ácido oleico).
- Girasol confitero. Se utiliza para alimentación humana (crudos, tostados o salados), así como para la alimentación de aves y animales pequeños. Las semillas son típicamente más grandes que la variedad de semillas oleaginosas.
- Girasol ornamental.

En la última década del siglo pasado, los altos precios internacionales permitieron el crecimiento del complejo oleaginoso global siendo el girasol argentino su mejor ejemplo. En la campaña 1994/95, se sembraron poco más de 3.000.000 de hectáreas (ha.) (Fig. 2), nivel que se sostuvo y aún trepó casi un 20% para la campaña 1997/98, antes del inédito registro de 4.200.000 ha. del ciclo siguiente, que permitió obtener una producción superior a 7.000.000 de toneladas (tn.) (Fig. 3), Argentina se convirtió en el ciclo agrícola 98/99 en el primer exportador mundial de aceite de girasol, desarrollando una de las más competitivas industrias procesadoras de aceite (Andreani, 2004). En la actualidad el girasol si bien redujo su área de cultivo a 1.400.000 ha, la tendencia del último quinquenio se encuentra en el orden de 1.600.000 a 1.800.000 ha.

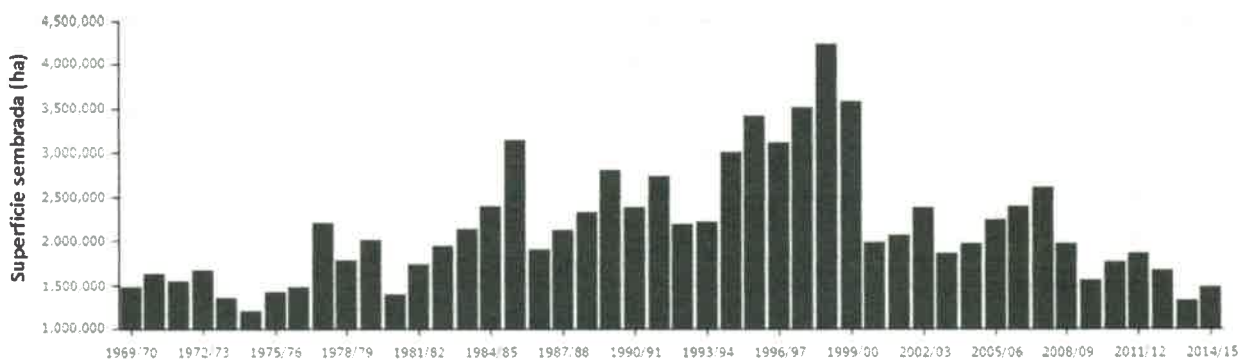


Fig.2. Superficie sembrada de girasol (ha) 1969-2015. Fuente: SIIA, 2016.

(http://www.siiia.gov.ar/_apps/siiia/estimaciones/salida.php)

La producción mundial de girasol (que oscila en torno a las 27/30 millones de toneladas) tiene cuatro principales protagonistas: la Federación Rusa, que habitualmente ofrece unas 6,5 millones de toneladas; Ucrania, que oscila entre las 4,2 y 5,3 millones de toneladas, y la Unión Europea, entre 4,8 y 6,5 millones. Los tres son grandes competidores en el Hemisferio Norte. El único país relevante, en cuanto a

producción de girasol, en el Hemisferio Sur es la Argentina, con 3,5/4,5 millones de toneladas (ASAGIR, 2012).

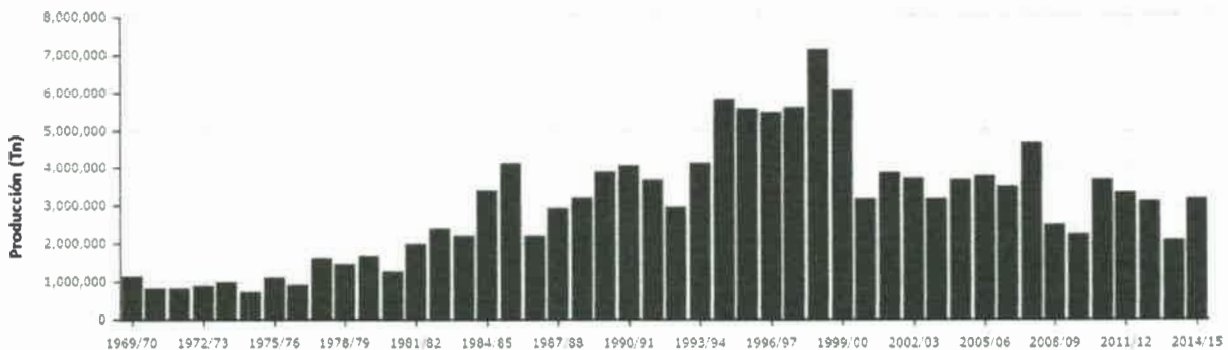


Fig.3. Producción de girasol (tn) 1969-2015. Fuente: SIIA, 2016.

(http://www.siiia.gov.ar/_apps/siia/estimaciones/salida.php)

El aceite de girasol es el tercer aceite vegetal más importante del mundo, con alrededor del 13% de la producción mundial total de aceite comestible. El aceite de girasol es considerado aceite Premium debido a su alta composición en ácidos grasos insaturados y bajo contenido de ácido linolénico.

De acuerdo a su composición de ácidos grasos, podemos diferenciar distintos tipos de aceite de girasol:

En las variedades tradicionales, los frutos tienen entre 40 y 55% de aceite, un 10% de ácidos grasos saturados y un 90% de insaturados. Los insaturados son el ácido oleico (15% - 35%) y el ácido linoleico (55% - 75%). La composición de ácidos grasos en los cultivares tradicionales, no es estable. Está influenciado por factores genéticos y ambientales. Por ejemplo, la temperatura, la cual ejerce una importante influencia en la relación oleico/linoleico.

En el mercado argentino los híbridos comerciales disponibles son: *Alto oleico* con más del 70% de ácido oleico y *Medio oleico* de 65% de ácido oleico. El hecho de tener un mayor porcentaje de ácido oleico los hace menos susceptibles a cambios oxidativos durante la refinación, el almacenaje y las frituras, confiriéndole mayor estabilidad. Son aceites que son cada vez más requeridos por la industria de alimentos de productos envasados como para el mercado de los snacks, por el beneficio que brindan a la salud. En la actualidad, la industria alimenticia mundial prioriza el cuidado de la salud y está utilizando cada vez más aceites vegetales con alto contenido de ácidos grasos insaturados, favoreciendo las perspectivas de uso para el aceite de girasol alto oleico (Minagri. 2016)

Además, debido a su abundancia relativa se utiliza en la elaboración de jabones y detergentes en el este de Europa. También se utiliza como "carrier" en la producción de agro-químicos, plaguicidas particularmente hidrófobos, agentes

tensioactivos, adhesivos, plásticos, suavizantes y lubricantes. Además, tiene un gran potencial para la producción de biodiesel, como un sustituto para el combustible diesel (Paniego y col., 2007).

En nuestro país, el área potencial de cultivo de girasol se extiende desde el norte de Chaco hasta el sur de la región pampeana (Fig. 4), extendiendo su utilización fuera del país al sur de Bolivia, Paraguay, Brasil y Uruguay. Los cultivares utilizados en cada zona tienden a ser distintos, como así también la estación del año en que se cumple buena parte del ciclo del cultivo y los sistemas de cultivos en los que se hallan incluidos. El hecho de que se cultive la especie y se logren rendimientos comercialmente rentables en ambientes tan dispares, resulta en parte, de su plasticidad y en parte del éxito de los fitomejoradores en seleccionar materiales adaptados a las diferentes zonas de esta gran región con sus diferentes patrones de oferta de recursos y de incidencia de adversidades (Trápani y col., 2003).

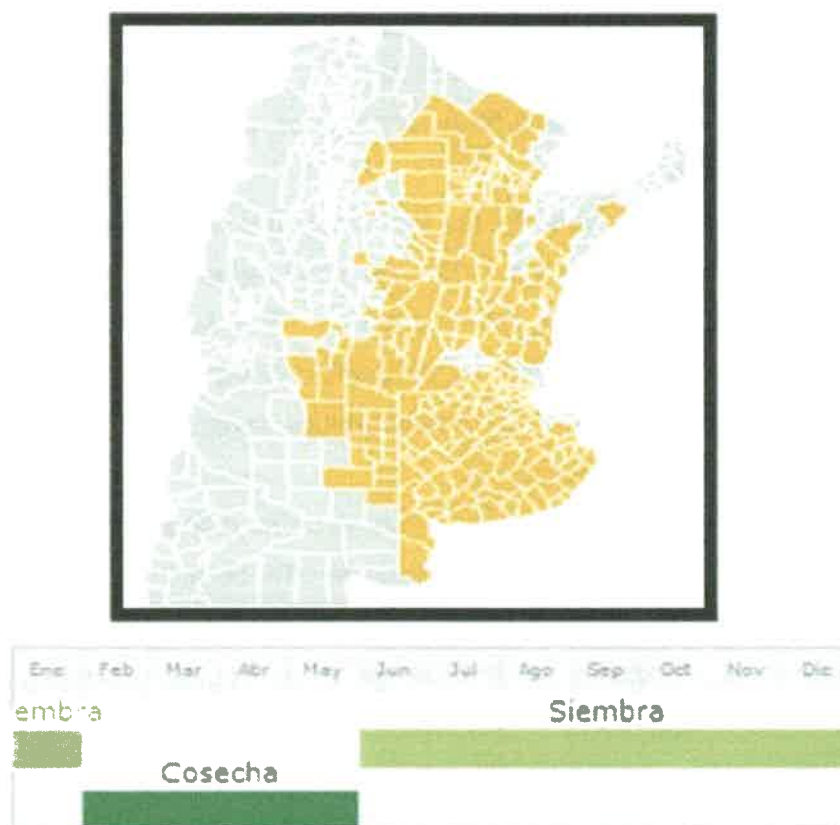


Fig.4 Principales áreas de cultivo de girasol en Argentina.

Fuente: Dirección de Coordinación de Delegaciones-Estimaciones Agrícolas- MAGyP, 2014

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 soja y la ocupación por parte del mismo de las

áreas más productivas de la Pampa húmeda. Este desplazamiento nos plantea un nuevo escenario, donde el estrés hídrico o sequía juega un rol determinante.

1.2-Efecto del estrés hídrico en plantas

De acuerdo con Singh (2000), la sequía es el principal factor abiótico, seguido en orden de importancia por la deficiencia y toxicidad por minerales y en tercer lugar, el frío. La sequía es el factor más limitante dado que afecta por encima de un tercio los suelos del mundo. Por otro lado, no sólo causa diferencias entre el rendimiento promedio y el rendimiento potencial, sino que además origina variaciones de rendimiento de año a año y consecuentemente inestabilidad de este carácter (Parry y col., 2004; Rosegrant y col., 2005).

Hay diferentes tipos de sequía,

- sequía meteorológica, cuando la precipitación es muy por debajo de sus expectativas para la época del año y la ubicación.
- sequía agrícola, cuando el agua de todas las fuentes es lo suficientemente baja como para causar grave déficit en el rendimiento del cultivo.
- sequía fisiológica, cuando el agua está presente en el suelo, pero la planta no puede aprovecharla debido a un menor potencial osmótico del suelo causado por sales.

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).

Las plántulas sufren a menudo estrés hídrico debido a que las siembras se realizan sin un contenido de agua adecuado en el perfil del suelo. En consecuencia, la germinación de las semillas es irregular y se presentan problemas en el establecimiento de las plántulas (Mwale y col., 2003), lo cual condiciona el rendimiento final del cultivo (Koornneef y col., 2002; Rajjou y col., 2006).

La sequía durante la fase vegetativa de las plantas afecta tanto a los rendimientos biológicos como a los económicos. Durante el desarrollo vegetativo, se reduce la altura del tallo principal, diámetro del tallo, el número de nodos o las hojas y el área foliar (Agele, 2003; Turhan y Baser 2004), y un aumento de la longitud de la raíz. Esto ha sido observado por una mayor relación raíz-tallo obtenida en condiciones de sequía (Sobrado y Turner 1986).

En Argentina las condiciones de estrés ambiental causan una reducción en el rendimiento del cultivo de girasol de hasta 1.500 kg/ha de granos, lo cual genera la necesidad de disponer de germoplasma tolerante a sequía a fin de reducir la pérdida de rendimiento.

Las plantas a lo largo del tiempo han desarrollado un amplio rango de mecanismos que les permiten afrontar en forma más o menos óptima condiciones adversas. Las respuestas a nivel celular y molecular que se manifiestan cuando una planta se encuentra en sequía incluyen cambios morfológicos, metabólicos así como ajuste en el transporte de iones. Estas modificaciones están regidas por la expresión de diversos grupos de genes que pueden estar involucrados en la síntesis de sustancias osmo-protectoras, de proteínas que confieren a la planta características especiales de resistencia al estrés hídrico o bien de proteínas enzimáticas intervinientes en la síntesis y/o metabolismo de las hormonas relacionadas a estrés. Diversos genes inducidos por estrés han sido identificados por análisis moleculares y genómicos en *Arabidopsis* y arroz, entre otras especies (Seki y col., 2001; Rabbani y col., 2003).

Nuestro grupo de trabajo ha caracterizado el comportamiento de las líneas endocriadas de girasol B59 y B71 de INTA, en su comportamiento frente a estrés hídrico en los estadios de plántula en condiciones de laboratorio, observándose para la línea tolerante B71 un mayor porcentaje de germinación relativo al control (PGR) en condiciones de estrés hídrico generado con 200mM y 400 mM de Manitol (Andrade y col., 2009). Además, la línea tolerante en condiciones de estrés hídrico presentó una

respuesta diferencial respecto a la línea sensible incluyendo gran reducción del área foliar, disminución del peso seco, mayor ajuste osmótico y aumento del contenido de prolina en la parte aérea. En parte radical se observó menor disminución del peso fresco y en ambos órganos se apreció alto contenido de clorofila. A su vez, presentó mayor contenido de carotenoides tanto en condición control como de estrés (Andrade y col., 2013)

Entre los mecanismos que poseen las plantas encontramos el fisiológico, que opera como sistema de ajuste a condiciones de estrés (altas o bajas temperaturas, salinidad y sequía), siendo de gran importancia las modificaciones en los niveles de ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA), etileno (ET) y ácido salicílico (SA).

1.3-Respuestas hormonales relacionadas a estrés hídrico

1.3.1-Jasmónico y sus derivados

La participación de los jasmonatos (JAs) en respuesta a estrés biótico y abiótico fue ampliamente estudiada en diversas especies vegetales (Lehmann y col., 1995, Penninckx y col., 1996; Kramell y col., 2000; Wasternack y Hause 2002; Wasternack, 2005; Kombrink 2012; Wasternack y Hause 2013; Dar y col., 2015; Riemann y col. 2015). Por ejemplo, en arroz el contenido endógeno de JA incrementó marcadamente bajo estrés hídrico severo (Du y col., 2013). En raíces de garbanzo perteneciente a la variedad tolerante se observó mayores niveles de JA, ácido 12-oxofitodienoico (OPDA) y JA-isoleucina (JA-Ile), respecto a la variedad sensible, en condiciones de sequía (De Domenico y col., 2012). A su vez, Savchenko y col. (2014) observaron que 12-OPDA actúa como un regulador de cierre estomático en respuesta a sequía, función que aumenta en presencia de ABA. En el mismo sentido, nuestro grupo ha demostrado la existencia de cambios en las concentraciones de los miembros de la familia de los JAs en semillas de girasol generadas por plantas cultivadas en sequía o en irrigación, tanto en líneas que se comportan como tolerantes o sensibles a sequía (Vigliocco y col., 2007).

El JA posee una estructura similar a la de los eicosanoides de animales, los cuáles se originan a partir del ácido araquidónico. JA y sus derivados son compuestos ciclopentanos originados de lípidos, y se encuentran en las plantas en forma de ácido libre JA, como forma metilada (metil-jasmónico-JAME) o conjugados con aminoácidos, por ejemplo (JA-Ile). También se han aislado derivados hidroxilados en posición 11 ó 12 (11-OH-JA y 12-OH-JA), y derivados glucosilados de JA. Todos los compuestos anteriormente mencionados son denominados colectivamente JAs. El OPDA y compuestos relacionados estructuralmente son llamados "octadecanoicos".

El camino de biosíntesis de los JAs (Fig. 5) comienza a partir de ácido graso poliinsaturado α -ácido linoleico (α -LA). Este ácido graso puede ser sustrato de una 9-lipooxigenasa (9-LOX) o de una 13-lipooxigenasa (13-LOX), enzimas que insertan un oxígeno en la posición 9 o 13 del α -ácido linoleico, generando 9-hidroperóxido de ácido linolénico (9-HPOT) o 13-hidroperóxido de ácido linolénico (13-HPOT), dependiendo de la enzima que actúe. 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 oxido de aleno inestable que es ciclado por una óxido de aleno ciclasa (AOC) para formar el OPDA (Stenzel y col., 2012; Wu y col., 2011). Este compuesto por acción de una OPDA reductasa (OPR) y tres ciclos subsecuentes de β -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 JAs (Thines y col., 2007; Schaller y col., 2005; Wasternack y Kombrink 2010; Scherer y col., 2010; Bannenberg y col., 2009).

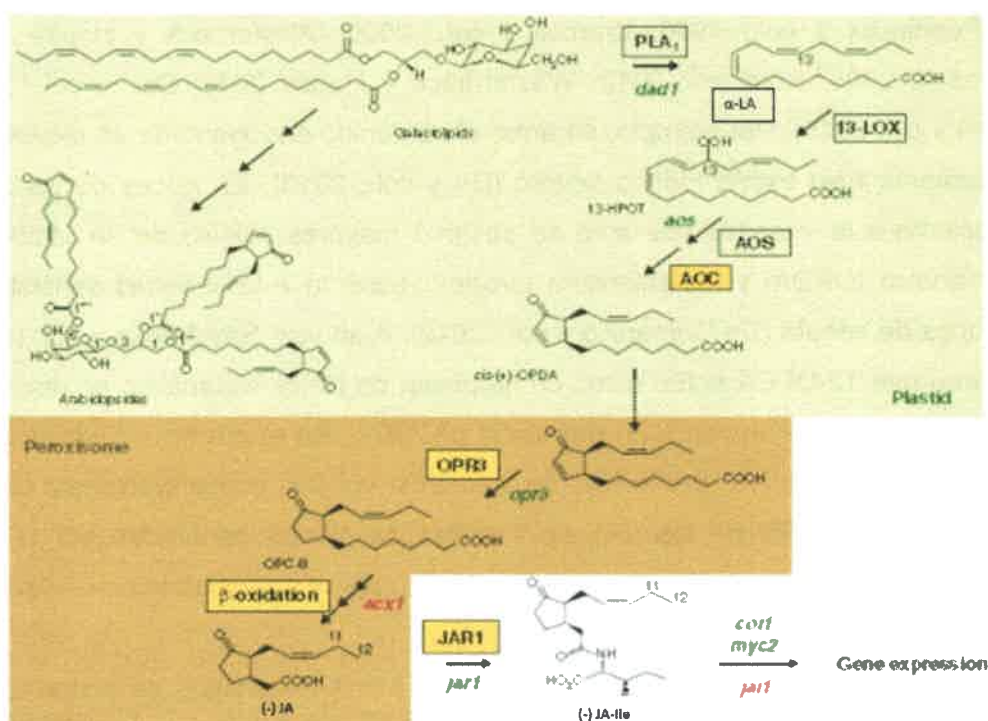


Fig. 5. Vía de síntesis y localización de JAs (modificado de Wasternack y House 2013).

La biosíntesis de los JAs ocurre en tres compartimentos celulares: en cloroplastos y eventualmente en otros plástidos donde JA es convertido a OPDA, en citosol OPDA es reducido por una OPR reductasa y en peroxisoma donde ocurren los tres pasos de β -oxidación. Luego en el citosol JA puede ser modificado por metilación, hidroxilación o conjugación como por ejemplo la producción de 7isoJA-Ile

por acción de JAR1 (Schaller y col., 2005; Seltmann y col., 2010; Schaller y Stintzi 2009; Wasternack y Kombrink 2010; Kombrink, 2012).

1.3.2-Ácido Abscísico

Por otra parte, ABA desempeña un rol primordial en la adaptación de las plantas a condiciones adversas tales como salinidad, sequía, bajas temperaturas y estrés osmótico (Zhu, 2002; Xiong y Zhu 2003). Además, ABA es responsable de la prevención de la germinación durante el desarrollo de la semilla (Berry y Bewley 1992). En semillas en desarrollo, ABA puede derivar de los tejidos maternos o bien ser sintetizado *de novo* en el embrión (Xiong y Zhu 2003). La dinámica de acumulación de ABA sugiere que su biosíntesis se halla bajo estricta regulación durante el desarrollo embrionario.

ABA es sintetizado en plantas superiores a través de una escisión oxidativa en el C₄₀ de su precursor carotenoide (Nambara y Marion-Poll 2005; Marion-Poll y Leung 2006). El primer paso en la biosíntesis de ABA (Fig. 6) es la epoxidación de la zeaxantina y anteraxantina a violaxantina, paso catalizado por una zeaxantina epoxidasa (ZEP). Violaxantina puede ser convertido a 9'-*cis*-violaxantina y/o neoxantina que luego pasa a 9'-*cis*-neoxantina. Por una escisión oxidativa de los epoxicarotenoides 9'-*cis* por la 9'-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) se obtiene un intermediario C₁₅, xantocina. El producto de xantocina es convertido en ABA a través de una reacción de dos pasos vía ABA-aldehído. Del mismo modo, ABA es desactivado a través de varias vías: la "vía oxidativa" que involucra la oxidación en diferentes posiciones, y la "vía de la conjugación" (Kushiro y col., 2004; Nambara y Marion-Poll 2005). Se ha demostrado la existencia de tres vías diferentes de hidroxilación de ABA, la hidroxilación del C-8, considerada la más común en el catabolismo en plantas, y que es iniciada por la hidroxilación del C-8 produciendo 8'-hidroxi-ABA (8'-HOABA), el cual por re-arreglos produce ácido faseico (PA). PA es subsecuentemente reducido a ácido dihidrofaseico (DPA) y/o su análogo, el ácido *epi*-dihidrofaseico (*epi*-DPA). Además, ABA e hidroxi-ABA puede ser conjugado como aba glucosa ester (ABA-GE) (Cutler y Krochko 1999; Andrade y col., 2009; Seiler y col., 2011).

Bajo condiciones de sequía, el ABA juega un rol en el cierre estomático, el cual reduce la pérdida de agua por transpiración (Assmann, 2003; Hartung y col., 2005). El ABA producido por raíces de plantas sometidas a sequía, es transportado por el xilema y regula la apertura de los estomas (Zhang y col., 1987; Zhang y Davies 1989; 1990a; 1990b; Wilkinson y Davies 2002; Schachtman y Goodger 2008).

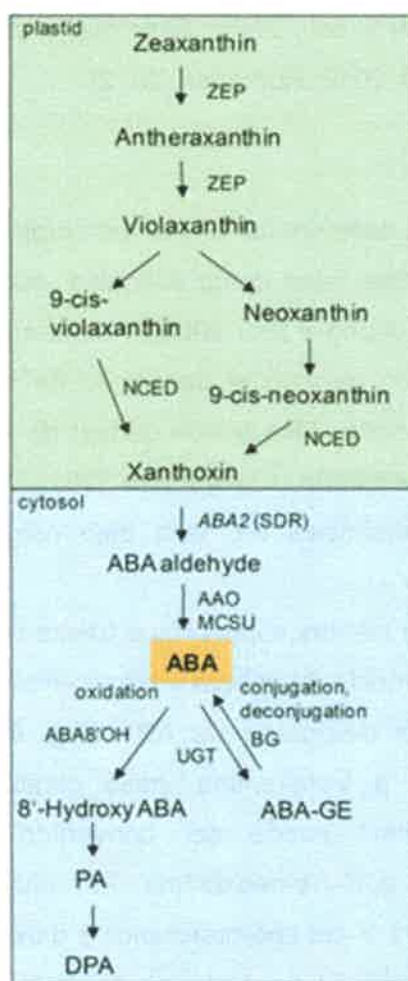


Fig. 6. Vía de síntesis y de localización de ABA (modificado de Seiler y col., 2011).

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 (Zhu, 2002; Dombrowski, 2003; Pedranzani y col., 2003; Boominathan y col., 2004; Wasilewska y col., 2008; Sánchez-Díaz y col., 2008; Sengupta y col., 2011; Xu y col., 2013).

En plántulas de *Arabidopsis thaliana*, el estrés hídrico promovió tanto la biosíntesis como el catabolismo de ABA, incrementando las concentraciones de ABA y sus catabolitos PA, DPA y ABA-GE (Huang y col., 2008). A su vez, la concentración de ABA fue mayor en hojas de *Laurus azorica* (Seub.) Franco sometidas a sequía que en las control (Sánchez-Díaz y col., 2008).

Aunque no todos los estudios muestran una correlación directa entre la tolerancia al estrés y un mayor contenido de ABA, hay varios trabajos que muestran mayor nivel ABA en individuos tolerantes a la sequía que en los susceptibles (Perales y col., 2005; Veselov y col., 2008; Thameur y col., 2011).

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).

A nivel molecular, ABA está relacionado con cambios de expresión de genes de respuesta a sequía (Zhang y col., 2006).

1.3.3-Ácido Salicílico y respuesta a estrés abiótico

Es un hecho conocido que el SA está involucrado en las respuestas de las plantas a estrés biótico; lo que aún no está bien dilucidado es su rol en los procesos de estrés abiótico (Horváth y col., 2007).

Es interesante señalar que en los últimos años se publicaron trabajos donde SA es capaz de inducir tolerancia a distintos tipos de estrés abiótico, por ej. estrés hídrico (Bhupinder y Usha 2003; Németh y col., 2002), salino (El-Tayeb, 2005; Szepesi y col., 2009; Rajjou y col., 2006), frío (Wang y col., 2006), calor (Larkindale y Huang 2004) y por irradiación con UV (Senaratna y col., 2000; Larkindale y Knight 2002; Clarke y col., 2004).

Dependiendo de la especie de la planta, el SA puede ser sintetizado por dos caminos distintos (Fig. 7), el camino de Isocorismato (ICS) y el camino de fenilalanina (PAL) (Dempsey y col., 2011). Ambos caminos tienen como precursor el corismato (Lee y col., 1995; Ribnicky y col., 1998) y presentan a la fenilalanina amonio liasa (PAL) o isocorismato sintasa (ICS), como principales enzimas intervinientes (Catinot y col., 2008; Uppalapati y col., 2007).

En girasol, Klanbt (1962) propuso que SA es sintetizado del benzoato, el cual es originado a través del camino PAL. El camino ICS es el responsable de la síntesis de más del 95% del SA en algunas especies de plantas.

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). Asimismo, nuestro grupo ha informado el incremento de SA en familias F₃ segregantes expuestas a estrés hídrico durante las etapas de germinación y crecimiento temprano (Fernandez y col., 2012a). En plantas de tomate y poroto se ha informado una mayor tolerancia a salinidad y sequía en respuesta a SA exógeno (Senaratna y col., 2000, Hayat y col., 2008).

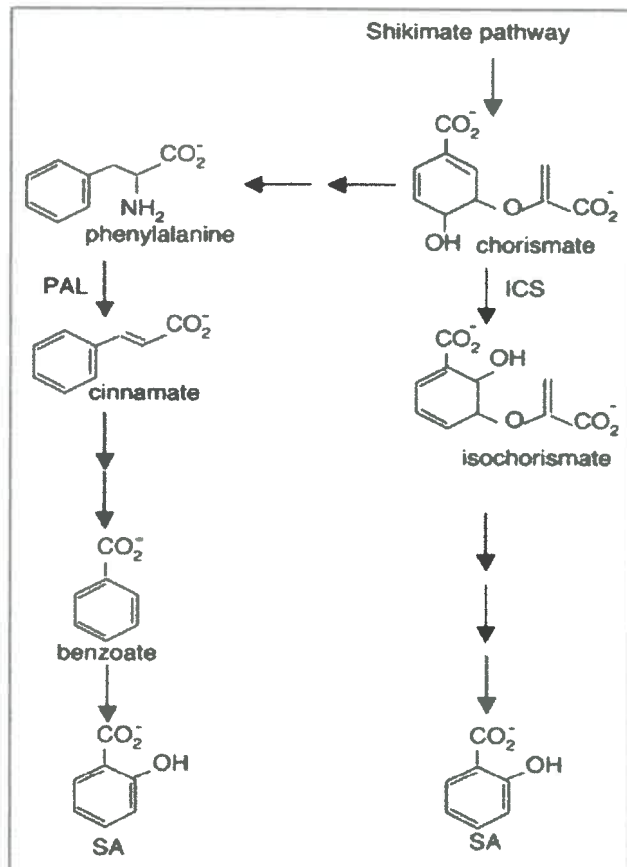


Fig. 7. Vía de síntesis de SA (modificado de Chen y col., 2009)

En hojas de *Phillyrea angustifolia* sometidas a estrés hídrico los niveles endógenos de SA se incrementaron más de 5 veces durante la sequía (Munne-Bosch y Peñuelas 2003), mientras que en raíces de plantas de cebada, un estrés hídrico moderado o severo aumentó los niveles de SA, mientras que su contenido no varió en hojas (Bandurska y Stroinski 2005).

1.4-Análisis génico

El desarrollo de nuevos genotipos con una mayor tolerancia a estrés hídrico es una estrategia importante para la expansión de la superficie agrícola para la siembra del girasol. El estudio de la base genética de la respuesta al estrés hídrico en distintas etapas de desarrollo es esencial para identificar genes que podrían servir como marcadores en los distintos estadios fisiológicos de la planta e identificar las rutas metabólicas en las que éstos intervienen, induciendo la síntesis de metabolitos secundarios en respuesta a estrés (Sorrells y col., 2000).

En los cultivos, la variación cuantitativa es una característica de muchos caracteres importantes, tales como rendimiento, calidad, resistencia a enfermedad y tolerancia a estrés abióticos, los cuales están bajo la acción combinada de múltiples

genes segregantes y factores ambientales (Asíns, 2002). El mayor avance de los análisis de variación cuantitativa se logró con el desarrollo de los marcadores moleculares en la década del 80 (Collard y col., 2005).

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 selección 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 (del inglés 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 es la necesidad de que la población de mapeo se encuentre en desequilibrio de ligamiento, caso contrario, los alelos de los *locus* 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 retrocruzadas (BC1), F₂ (generadas por autofecundación), líneas endocriadas (RIL), entre otras (Collard y col., 2005; 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). Entre los marcadores moleculares usados habitualmente los microsatélites (SSR) son, cuando están disponibles, los marcadores de elección para el análisis de ligamiento, debido al hecho que son altamente polimórficos, generalmente heredados de una forma co-dominante, y en muchos casos, específicos de cromosoma (Paniego y col., 2007).

Una alternativa dentro de las estrategias de mapeo de QTL de interés agronómico, es la de minimizar el número de individuos de la población a analizar haciendo una selección de aquellos que se ubican en los extremos de la distribución de la respuesta fenotípica estudiada. Este procedimiento se lo conoce como análisis de segregantes agrupados (BSA) y fue desarrollado por Milcheltmore y col., (1991).

Esta técnica ha sido utilizada para la identificación de marcadores moleculares ligados a un carácter monogénico, dominante o recesivo (Wang y col., 2007; Le Guen y col., 2013) así como también para el análisis de QTL mayor en poblaciones muy grandes (Altinkut y col., 2003; Salunkhe y col., 2011)

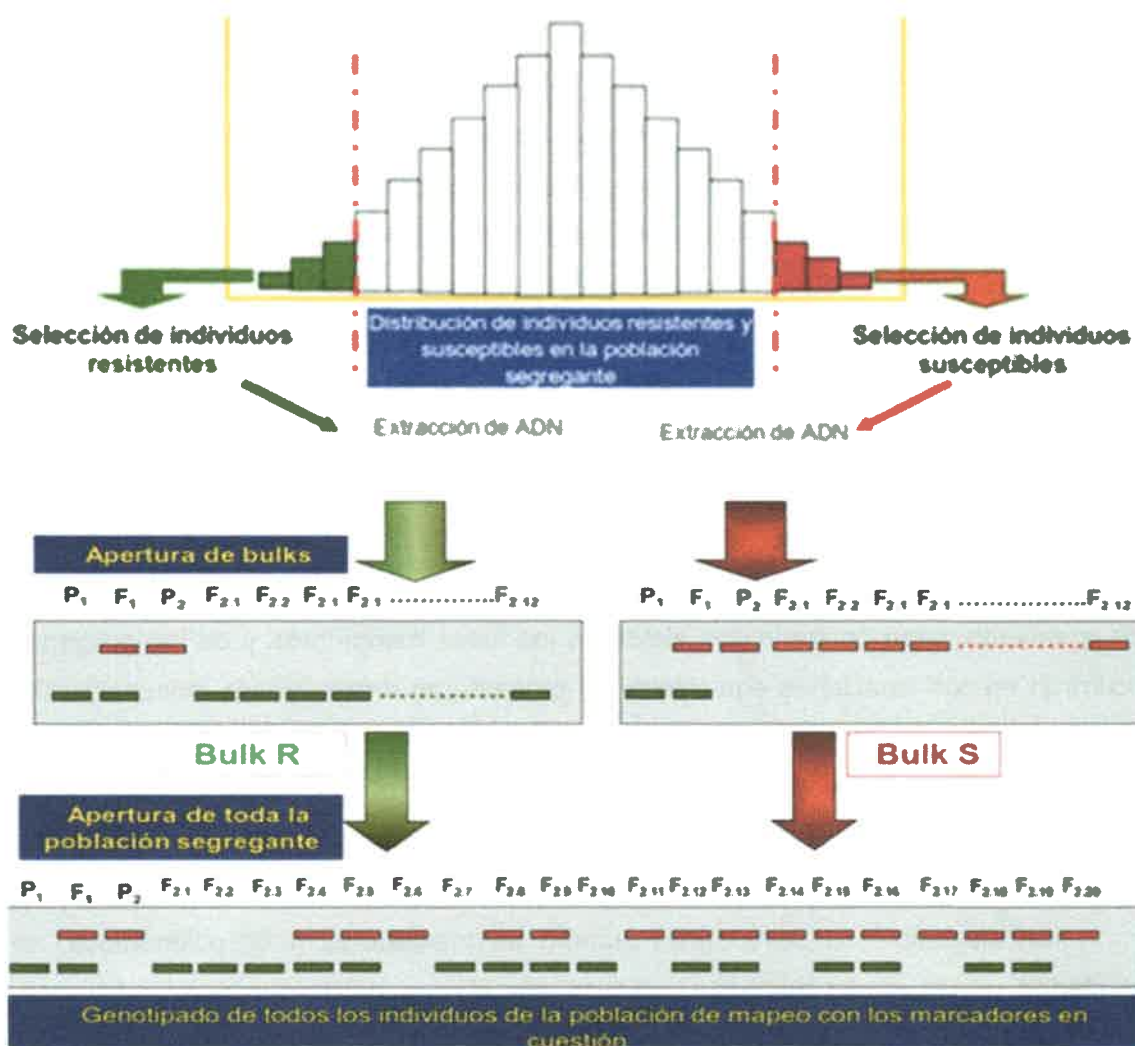


Fig. 8. Diagrama del empleo de BSA para mapear genes utilizando marcadores co-dominantes (modificado de Gieco y col., 2011).

En la figura 8 se muestra el esquema de uso de BSA para el mapeo de genes candidatos. La selección de individuos para la realización de los bulks, es realizada mediante la identificación de dos fenotipos extremos, resistente y susceptible (R o S) de una población segregante. Tanto el ADN de las líneas progenitoras, como el de los individuos que componen los grupos son analizados con marcadores moleculares, seleccionando aquellos que presenten la presencia de bandas en una muestra y la ausencia de estas bandas en la otra muestra. Asimismo evidencia, preliminarmente, una ligación genética entre un marcador polimórfico y el locus diana. Posteriormente



esa asociación es confirmada mediante el análisis de co-segregación entre un marcador y el grado de resistencia en todos los individuos de la población segregante. Confirmada la ligación, es posible calcular una frecuencia de recombinación entre un marcador y el locus diana.

Esta técnica es utilizada para identificación de genes de efecto mayor que condicionan diversos caracteres de interés agronómicos, como QTLs 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 (Altinkut y Gozukirmizi, 2003; Quarrie y col., 1999; Kanagaraj y col., 2010; Venuprasad y col., 2009; Vikram y col., 2011), así como QTLs 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).

La aplicación de esta estrategia en $F_2:F_{2,3}$ brindaría información de marcadores asociados estrés hídrico en plántula, en generaciones tempranas de selección, como una primera aproximación para identificar marcadores asociados al carácter.

1.5-Expresión génica

Las modificaciones a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico que se producen en la planta están regidas por la expresión de diversos grupos de genes que confieren a la planta tolerancia a estrés.

Existen diversas tecnologías para el estudio de la expresión génica, una de las técnicas pioneras de alto desempeño que permite el estudio simultáneo de miles de genes y que ha revolucionado la biología molecular fue el desarrollo de micro-arreglos. Una de las principales características de esta tecnología es el gran volumen de datos que puede generar, motivo por el cual es necesaria la complementación con técnicas de bioinformática y estadística (Dalma y col., 2006).

La utilización de la tecnología de micro-arreglos permite realizar un estudio transcriptómico concertado de lo que está sucediendo en la planta, por ejemplo qué vía de expresión génica esta inducida en mayor o menor medida en condiciones de estrés respecto al control, también nos permite agrupar los diferentes transcritos que se expresaron diferencialmente según su función biológica, pudiendo determinar qué genes están regulados positiva o negativamente, y cuál es su función molecular (Krugman y col., 2011; Le y col., 2012; Rasheed y col., 2016).

El análisis de expresión de genes inducidos por estrés en *Arabidopsis*, arroz y maíz entre otras especies, ha permitido identificar genes que están involucrados a nivel transcripcional en la respuesta a estrés hídrico y la afectan en diferentes niveles (Seki y col., 2002, Rabbani y col., 2003; Kawaguchi y col., 2004; Boominathan y col.,

2004). Entre estos genes se incluyen aquellos implicados en el metabolismo, vías de señalización de fitohormonas tales como JA, ABA y SA que producen cambios en la homeostasis hormonal, redistribución y señalización (Matsui y col., 2008). Ma y col., (2006) pusieron en evidencia la complejidad de las respuestas a estrés, para ello, estos autores analizaron 1500 genes mediante técnicas de micro-arreglos de DNA, de los cuales aproximadamente el 25% responden a tratamientos de estrés u hormonas. Krugman y col., (2011) trabajando en estrés hídrico con dos genotipos de trigo wild emmer, sensible y tolerante a sequía, observaron diferencias en la expresión de genes relacionados a ABA ya sea a nivel de metabolismo, señalización, respuesta y regulación a diferentes niveles.

A su vez hormonas, como JA, ABA y SA regulan la expresión de numerosos genes; específicamente los JAs inducen expresión de genes que codifican proteínas con numerosas funciones celulares, entre ellas quitinasas, glucanasas y PR-10 (asociadas a resistencia a *Fusarium* y *Pseudomonas*), proteínas protectoras de estrés (osmotina, salt (salinidad), JIP6 (sorbitol y sequía), JIP23 (inducida por sorbitol), proteínas antimicrobianas y antinutricionales (PIN1, PIN2). Asimismo, análisis por macro-arreglos de cDNA mostraron que tratamientos exógenos con compuestos de la familia de los JAs (como JAME y 12-OH-JA) estimulan la transcripción de genes que codifican enzimas de la propia síntesis y metabolismo de JA, tales como *LOX2*, *AOC* y *OPR3* (Ishiguro y col., 2001; Stenzel y col., 2003; Miersch y col., 2008).

Diversos genes regulados positivamente por ABA y estrés hídrico han sido caracterizados en distintas especies vegetales, entre ellos *RD29A* y *B*, *RAB18*, *LEA14* y *RD20* (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 1994; Jakab y col., 2005).

El SA induce la expresión de genes PR (*pathogenesis-related protein*) comúnmente asociados con estrés biótico, debido a que aumentan la resistencia a patógeno, también fueron inducidos en condiciones de estrés abiótico (Miura y col., 2013). Aplicaciones exógenas de SA podrían inducir cambios en el estado redox celular (Hayat y col., 2008).

Entre las proteínas efectoras que son activadas por las hormonas y la señal de estrés se encuentran los factores de transcripción. Ellos poseen una función determinante en la regulación de la expresión génica y, consecuentemente, en la transducción de señales, actuando como nodos en las redes de regulación de numerosos procesos biológicos (Nakashima y col., 2014, Banerjee y Roychoudhury 2015).

Son actores de importancia en la señalización del estrés hídrico y algunos son nodos de redes de señalización regulando gran cantidad de genes corriente abajo (Tripathi y col., 2013).

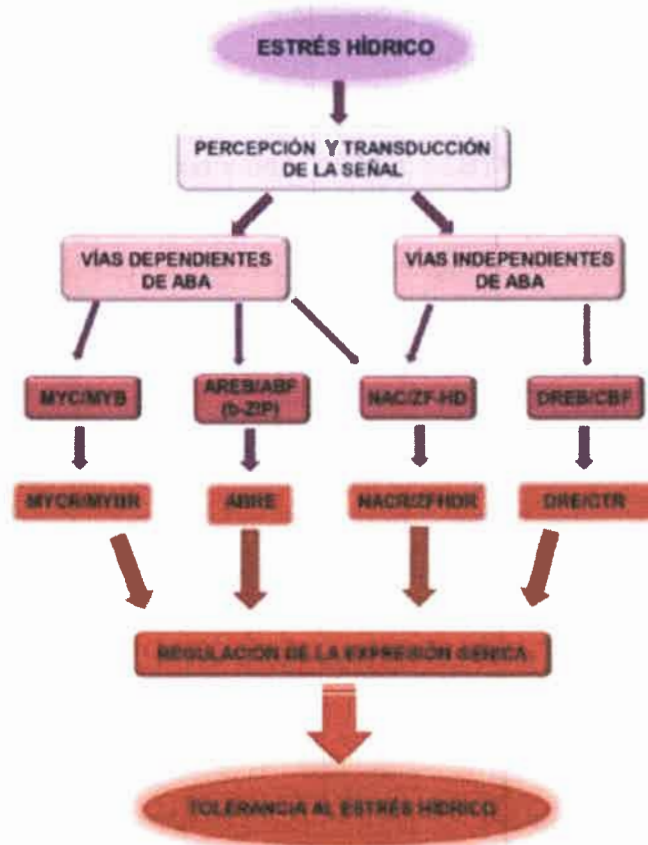


Fig. 9. Principales grupos de factores de transcripción involucrados en la regulación de genes de respuesta al estrés hídrico en plantas (Capiati y Muñiz García, 2011).

Como podemos observar en la figura 9, las vías de respuesta a sequía pueden clasificarse en 4 grupos que a su vez se dividen en aquellas que son dependiente e independiente de ABA (Umezawa y col., 2006). ABA además de provocar el cierre de estomas induce la expresión de numerosos genes de adaptación al estrés. Los promotores de muchos de estos genes contienen elementos de respuesta ABRE, uno de los principales elementos *cis* que actúan en señalización de la respuesta a estrés hídrico dependiente de ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2007). Se ha demostrado que este elemento dirige la señalización dependiente de ABA del gen RD29B de *Arabidopsis* a través de factores de transcripción bZIP (Uno y col., 2000). Los factores de transcripción tipo bZIP han sido nombrados como (AREB) proteínas de unión a elementos de respuesta ABA y (ABFs) factores de unión de elementos respuesta ABA (Kagaya y col., 2002; Uno y col., 2000). La sobre-expresión de genes AREB/ABF en *Arabidopsis* estuvo asociada a la tolerancia al estrés hídrico (Kim y col., 2004; Orellana y col., 2010; Yoshida y col., 2010).

Los factores de transcripción MYC/MYB actúan en la activación de genes de respuesta a estrés hídrico de manera dependiente de ABA (Hirayama y Shinozaki, 2010). La sobre-expresión de AtMYB15 aumentó la tolerancia a estrés hídrico en *Arabidopsis* (Ding y col., 2009). Similares resultados se observaron en plantas que sobre-expresaron AtMYC2, AtMYB2 o ambos (Abe y col., 2003). La expresión de gen RD22 (responsive to dehydration 22) es inducido por sequía y ABA (Nakashima y Yamaguchi- Shinozaki, 2013). La región promotora del gen RD22 posee elementos cis reconocidos por MYC y MYB, los cuales aumentan su expresión luego del incremento de ABA (Saibo y col., 2009). En soja se identificaron 156 genes de la familia MYB, de los cuales 43 fueron inducidos por ABA, sequía, salinidad y frío (Liao y col., 2008).

El estrés hídrico además activa otros factores de transcripción como es el caso de las familia NAC y las proteínas "zinc finger homeodomain" (ZF-HD). La sobre-expresión de los genes ANAC019, ANAC055 y ANAc072 en *Arabidopsis* incrementó la tolerancia a sequía (Tran y col., 2004; Tran y col., 2007).

El último de estos 4 grupos corresponde al de factores de transcripción DREB/CBF, del tipo AP2/ERF, los cuales inducen un conjunto de genes de respuesta a estrés abiótico independientemente de ABA (Hirayama y Shinozaki, 2010). Este grupo a su vez se dividen en dos subgrupos: La expresión de los genes DREB1/CBF (DREB1B/CBF1, DREB1A/CBF3 y DREB1C/CBF2 en *Arabidopsis*) es inducida por frío, mientras que la expresión de los genes DREB2 (DREB2A y DREB2B en *Arabidopsis*) es inducida por estrés hídrico (Liu y col., 1998). Los genes blancos de DREB2 (RD29A, RD29B, RD17 y LEA14) son inducidos solamente por la deshidratación (Sakuma y col., 2006). Como ambos subgrupos reconocen la misma secuencia DRE/CRT (dehydration responsive element /C-repeat) puede existir un entrecruzamiento entre la expresión de genes inducidos por frío o sequía. La sobre-expresión de los genes DREB1/CBF en *Arabidopsis* incrementó la tolerancia al estrés hídrico y frío y esto se correlacionó con un aumento en los niveles de transcriptos que codifican proteínas asociadas a la adaptación al estrés (Gilmour y col., 2004). La sobre-expresión del DREB1A/CBF3 de *Arabidopsis* en papa, tabaco, trigo y arroz incrementó la tolerancia a la sequía (Behnam y col., 2006).

Además de estos principales grupos, debemos tener en cuenta una importante familia de factores de transcripción llamada WRKY. Esta familia es un componente importante de la red de señalización que regulan muchos procesos en respuesta a estímulos bióticos y abióticos, en procesos de desarrollo incluyendo proteínas de unión a ADN y proteínas que interaccionan con otras proteínas (Rushton y col., 2010; Agarwal y col., 2011; Chen y col., 2012). Una de las funciones importante de WRKY es formar parte de la red de señalización hormonal en respuesta al estrés, actuando tanto

corriente arriba o corriente abajo de las hormonas. Por ejemplo están involucrados en la señalización de ABA (Rushton y col., 2012), en las funciones antagónicas de SA y JA /etileno (ET), el control de los procesos de desarrollo a través de auxinas, citoquininas y brasinoesteroides (Agarwal y col., 2011; Antoni y col., 2011; Nilsson y col., 2010).

Para realizar este análisis de expresión, nuestro grupo de trabajo formó parte del Proyecto PAE 37100-PME0024, en Colaboración con el Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, España, en el cual se ha desarrollado un chip de oligonucleótidos en Plataforma Agilent en formato 4x44k según la tecnología Agilent, disponible para estudios de genómica funcional en girasol cultivado (Fernández y col., 2012b).

CAPITULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL

2.1-Hipótesis General: “Dentro del germoplasma disponible para girasol cultivado existen materiales tolerantes y sensibles a estrés hídrico que pueden diferenciarse a partir del estudio de perfiles genotípicos y fenotípicos incluyendo análisis transcripcionales y hormonales obtenidos en ensayos conducidos en condiciones de déficit hídrico durante la germinación de la semilla o en estados vegetativos tempranos del desarrollo de la planta”.

2.2-Objetivo General: Teniendo en cuenta que la germinación y el crecimiento de las plántulas son estadios críticos del ciclo de vida de las especies cultivadas, nuestro grupo ha caracterizado en laboratorio y a campo líneas endocriadas de girasol resultando la línea B71 como tolerante y B59 como sensible a estrés hídrico (Andrade y col., 2009). En este trabajo proponemos estudiar la tolerancia a estrés hídrico en girasol mediante la caracterización del poder germinativo, los perfiles de expresión de genes y de hormonas inducidos mediante condiciones de estrés hídrico sobre las líneas B71 y B59, así como también identificar las regiones genómicas asociadas a la característica en estudio mediante la aplicación de estrategias de mapeo de QTL sobre una población segregante (F_2 y $F_{2:3}$) derivada del cruzamiento de B71 x B 59.

CAPITULO 2: HIPOTESIS Y OBJETIVOS ESPECIFICOS

Hipótesis 1: “Durante la respuesta de plántulas de girasol de familias segregantes $F_{2,3}$ (B59 x B71) a estrés hídrico se producen cambios germinación y crecimiento temprano. Para comprobar esta hipótesis se propone como primer objetivo específico determinar germinación y crecimiento temprano (V2) en familias $F_{2,3}$ para discriminar entre germoplasma sensible y tolerante a estrés hídrico.

Hipótesis 2: “Líneas de girasol con respuesta contrastantes a estrés hídrico presentan regiones génicas diferentes, las cuales determinan la expresión de genes relacionados a la tolerancia a ese estrés”. Como segundo objetivo específico se plantea caracterizar las líneas parentales B59 (sensible a estrés hídrico) y B71 (tolerante a estrés hídrico) con marcadores moleculares neutros (Microsatélites) para detectar polimorfismos que puedan ser utilizados en la detección de genes y/o QTL involucrados en la tolerancia a estrés hídrico en familias segregantes F_2 .

Hipótesis 3: “Plántulas de girasol en respuesta a estrés hídrico presentan cambios en el perfil de hormonas que explican el rol de estos compuestos en la tolerancia a estrés.” Para probar esta hipótesis se plantea como tercer objetivo específico cuantificar la concentración endógena de hormonas asociadas a estrés abiótico: ácido jasmónico (JA), abscísico (ABA) y salicílico (SA) en plántulas de líneas parentales B71 y B59 y en las familias segregantes $F_{2,3}$ con respuesta contrastante al estrés hídrico.

Hipótesis 4: “El estrés hídrico aplicado a plántulas de girasol modifica el patrón de expresión de genes involucrados en los mecanismos de tolerancia a dicho estrés”. Para comprobar esta hipótesis se plantea como cuarto objetivo específico estudiar el patrón de expresión génica en plántulas de líneas parentales contrastantes, control y sometidas a estrés hídrico.

Hipótesis 5: “El estrés hídrico modifica el contenido endógeno de hormonas de respuesta a estrés, lo cual puede estar asociado con cambios en los niveles de expresión de genes involucrados en el metabolismo de dichas hormonas y a factores de transcripción relacionados a las mismas.”. Como quinto objetivo específico se propone establecer asociaciones entre el contenido endógeno de JA, ABA y SA y el patrón de expresión y funcionalidad de genes de la vía biosintética de estas hormonas como factores de transcripción relacionados a las mismas, en plántulas crecidas en condiciones de estrés hídrico en líneas endocriadas contrastante para este carácter.

CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS

3-SECCIÓN A

Caracterización de material contrastante a estrés hídrico

3.A.1-Líneas parentales B59 y B71

3.A1.1-Material Vegetal

Se trabajó con líneas endocriadas de girasol tolerante (B71) y sensible (B59) a estrés hídrico, cedidas por el programa de mejoramiento genético de girasol perteneciente a la Estacion Experimental Agropecuaria (EEA)-INTA Manfredi. Tales líneas fueron seleccionadas a partir de ensayos a campo y en laboratorio (Andrade y col., 2009) y luego caracterizadas por parámetros morfo-bioquímicos por Andrade y col., (2013).

3.A.2-Evaluación de poblaciones segregantes $F_{2:3}$ (B71 x B59)

3A2.1-Material vegetal

Cabe destacar que estas familias son el resultado del cruzamiento de B59 y B71, líneas endocriadas contrastantes para el carácter tolerancia a estrés hídrico. La F_1 producida fue autofecundada para originar plantas F_2 y a partir de la autofecundación de estas últimas se obtuvieron las respectivas familias $F_{2:3}$. La producción de estas familias se realizó en la EEA-INTA Manfredi.

3A2.2-Condiciones de crecimiento

Veinticinco semillas de cada familia $F_{2:3}$ se colocaron en bandejas plásticas con arena fina (esterilizada). El contenido hídrico del sustrato al momento de la siembra fue de 60% de la capacidad de campo, realizándose posteriores riegos por capilaridad de campo a los 4, 7 y 10 días de la siembra mediante el método de ascenso capilar. Los tratamientos utilizados fueron:

- Agua destilada (control),
- Solución de manitol 400 mM (estrés hídrico).

Tanto controles como estresadas fueron colocadas en un cuarto ambiental Conviron programado con 16 hs. de iluminación ($200 \mu\text{moles.m}^2.\text{s}^{-1}$) a 28°C y HR 60% y 8hs. de oscuridad a 20°C y HR 70%. En estos ensayos se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 4 repeticiones.

Las plántulas se cosecharon a los 11 días y se determinaron parámetros de crecimiento tales como:

3A2.3-Recuento final de germinación

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

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

La evaluación del PGR, se realizó en aquellas plántulas cuya longitud de la parte aérea y/o radical fue de 0,5 cm o mayor, descartándose las que presentaron distintas anomalías *Seed Testing Association* (ISTA, 2006).

El material vegetal fue liofilizado y conservado en freezer -20°C para la cuantificación hormonal.

3-SECCIÓN B.

Caracterización genotípica

3.B.1-Líneas parentales B59 y B71

Determinación de polimorfismos de ADN a través de SSR.

3.B1.1-Extracción y cuantificación de ADN

El ADN genómico total de ambos parentales fue extraído de hojas jóvenes no lesionadas por agentes patógenos ni insectos, provenientes de plantas crecidas por 5 semanas en invernáculo de la EEA INTA Manfredi. Las hojas fueron liofilizadas luego del muestreo y se almacenaron en cámara a 4°C . La extracción se llevó a cabo con el procedimiento (kit) de extracción Nucleo Spin Plant II (Macherey-Nagel, Alemania), empleando como agente extractivo el bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) (Hoisington y col., 1994).

El ADN genómico se cuantificó empleando un fluorómetro Versaflúor mediante el uso del reactivo Hoechst N° 33258, estableciendo una curva patrón con estándares de ADN de timo de ternero 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. La electroforesis se llevó a cabo en buffer TAE 1X a un voltaje constante de 5 Volts/cm durante 30 min. La visualización del ADN se realizó por transiluminación con luz UV, en digitalizador de imágenes acoplado a PC con el programa Gene Quantitative (Biorad).

3.B1.2-Amplificación por PCR

La mezcla de reacción para la amplificación por PCR de ambos parentales estudiados se preparó como se indica a continuación.

Mezcla de reacción para amplificación por PCR

<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
Primer Forward + Reverse [5 µM]	0,30 µl
Taq Polimerasa Platinum (Invitrogen) [5 U/µl]	0,10 µl
H ₂ O Mili-Q o tridestilada estéril	8,80 µl
Volumen final de reacción	12 µl
ADN [15 ng/µl]	1 µl

Las amplificaciones se realizaron en placa de 96 pocillos empleando un termociclador GeneAmp system 9700 (Applied Biosystems) con el siguiente programa de amplificación:

Programa de amplificación empleado en este estudio

<u>Etapa del programa</u>	<u>Tiempo</u>
Desnaturalización inicial a 94°C	4 min

Touchdown (12 ciclos)	
Desnaturalización a 94°C	45 s
Hibridación a 64°C (-1°C/ciclo)	45 s
Elongación a 72°C	45 s
Amplificación (35 ciclos)	
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

Todas las placas preparadas para la amplificación incluyeron controles realizados con ADN de genotipo conocido para algunos de los marcadores utilizados y un control negativo (sin adición de ADN).

Los cebadores empleados en este trabajo se marcaron en el extremo 5' del *Forward* con alguno de los siguientes fluoróforos: 6-FAM (azul), HEX (verde) o NED (amarillo).

3.B1.3-Amplificación por PCR multiplexada

Con el fin de optimizar tiempos y costo se utilizó un protocolo basado en una reacción de PCR multiplexada, la cual permite analizar alrededor de 10 pares de cebadores por reacción.

Los últimos cien microsatélites fueron amplificados utilizando este protocolo para lo cual es necesario la utilización del programa Multiplex Manager (www.multiplexmanager.com). A partir de la información obtenida por este programa se optimizó la combinación de dichos cebadores marcados con los fluoróforos seleccionados para la técnica de genotipificación por electroforesis capilar (EC). El criterio de selección se basó en la longitud esperada de cada uno de los fragmentos amplificados, las temperaturas de hibridación de cada oligonucleótido con el templado y las posibles estructuras secundarias o complementariedades encontradas entre los iniciadores que conforman la mezcla.

Este sistema se evaluó mediante la co-amplificación de los fragmentos esperados utilizando el sistema PCR Type-it Microsatellite (Qiagen) modificado para las condiciones de trabajo establecidas en el laboratorio para amplificación de fragmentos de ADN de girasol. La reacción consistió en 0,2 μ M de cada iniciador disueltos en un volumen final de 10 μ l, conteniendo la "PCR Master Mix (Type-it Multiplex PCR Master Mix, que provee 3 mM de $MgCl_2$) y 30-100 ng de ADN.

<u>Etapas del programa</u>	<u>Tiempo</u>
Desnaturalización inicial a 95°C	5 min
Touchdown (28 ciclos)	
Desnaturalización a 95°C	30 s
Hibridación a 60°C (-0,3°C/ciclo)	90 s
Elongación a 72°C	30 s
Extensión final a 60°C	30 min

3.B1.4-Visualización de los productos de amplificación

3.B1.4.1- Empleo de geles de agarosa

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 μ g/ml). Se sembró un volumen de muestra de 5 μ l, incluyendo 2 μ l 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).

3.B1.4.2-Empleo de electroforesis capilar

La separación de los productos de amplificación se efectuó mediante EC 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 μ l de formamida (HiDi Formamide) como agente desnaturalizante y 0,1 μ l de GeneScan 500 (-250) ROX por cada placa de 96 pocillos. Se adicionaron 2 μ l de las muestras (en una dilución adecuada para favorecer la visualización de los picos fluorescentes), se centrifugó, se desnaturalizó a 94°C 5 min y se centrifugó nuevamente previo a la inyección de las muestras en el equipo.

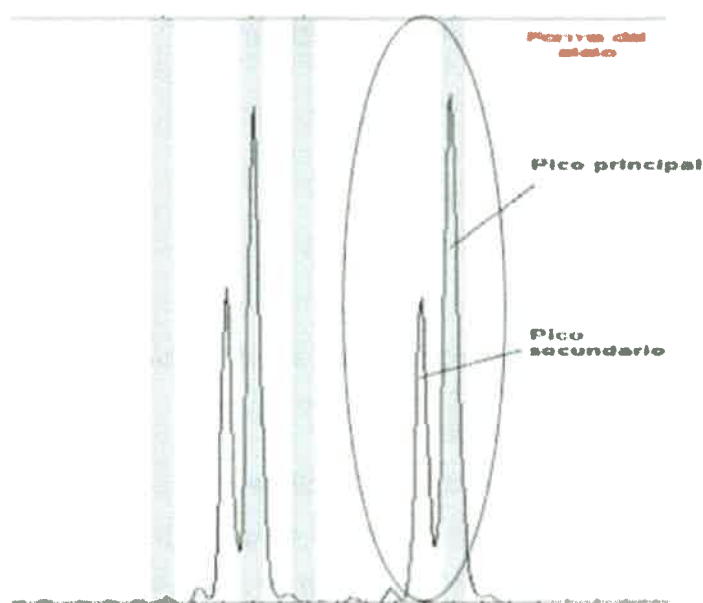


Fig.10. Electroferogramas visualizados con Genemapper. Las líneas grises verticales corresponden a cada uno de los bins detectados en el conjunto de muestras de germoplasma analizadas. La forma del alelo se indica con una elipse. En este caso el genotipo corresponde a un individuo heterocigota

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 son: intensidad de fluorescencia, forma del alelo (Fig. 10), selección del rango (bin) del alelo y requerimiento de amplificación unilocus.

3.B.2-Poblaciones segregantes F_2 (B71 x B59)

La extracción de ADN se realizó con el protocolo (kit) de extracción Nucleo Spin Plant II (Macherey-Nagel, Alemania). Para el genotipado se utilizó la técnica de *Bulk Segregant Analysis* (BSA) según Michelmore y col. (1991) para la cual se confeccionaron dos bulks (tolerante y sensible) con el ADN de las seis plantas F_2 extremas de cada extremo de la distribución de la población de plantas $F_{2,3}$.

La combinación óptima de la totalidad de los marcadores polimórficos obtenidos en las líneas parentales fue realizada con el programa Multiplex Manager y las amplificaciones se realizaron por PCR multiplexada en el ADN de las familias F_2 extremas, sensibles y tolerantes a estrés hídrico, las cuales se obtuvieron por fenotipado de las familias $F_{2,3}$ del cruzamiento (B71 x B59) para la variable PGR. Los productos de amplificación fueron separados por Electroforesis Capilar y analizados con el programa GeneMapper® 4.0 (Applied Biosystem, EUA).

3-SECCIÓN C.

Determinaciones de hormonas vegetales

3.C.1-Líneas parentales B59 y B71

3.C1.1- Condiciones de crecimiento

Cien semillas de las líneas B59 y B71, se colocaron a germinar en bandejas plásticas entre toallas de papel humedecidas a saturación con agua destilada durante 48 hs, luego se seleccionaron cincuenta semillas germinadas, en donde el largo de la radícula se encontraban en el rango (\bar{X} de la radícula emergida \pm 2 SD) cm, en condiciones controladas de crecimiento en cuarto ambientales Conviron (PR48) con temperatura media de 25°C en luz (200 $\mu\text{moles.m}^2.\text{s}^{-1}$), HR 85% y temperatura 18°C en oscuridad con HR 90 %.

Las semillas germinadas se trasplantaron a bandejas plásticas conteniendo arena fina estéril como sustrato. El contenido hídrico al momento de la siembra fue de 60% de la capacidad de campo y a los 6 días de edad de las plántulas se comenzó a aplicar los tratamientos, los cuales se realizaron cada 3 días a capacidad de campo mediante el método de ascenso capilar. :

- Solución de Hoagland 50% de fuerza iónica (control);
- Solución de manitol 400 mM (estrés hídrico), la cual genera un potencial osmótico -0,98 Mpa (Bigo, 2006; Andrade y col., 2009).

A partir del 4to. día del trasplante a arena, se tomaron al azar 15 plántulas y al finalizar el experimento (20 días).

3.C1.2-Extracción, purificación de hormonas

Para la extracción y pre-purificación de JA, ABA y SA se siguió el protocolo descrito por Durgbanshi y col. (2005). Se pesó 50 mg de material liofilizado de parte aérea (hojas verdaderas + tallo) y radical de plántulas de las líneas B59 y B71 crecidas en condiciones óptimas de humedad (control) y sometidas a estrés hídrico (manitol 400 mM), empleándose cuatro réplicas biológicas por condición. Las muestras fueron tratadas con 25 μ l de una mezcla de estándar interno que contenía 500 ppm de [$^2\text{H}_6$]-ABA, 200 ppm de [$^2\text{H}_4$]-SA y 100 ppm de [$^2\text{H}_6$]-JA (Sigma-Aldrich). A continuación se añadieron 5 ml de agua ultra pura y la mezcla se homogenizó empleando un molinillo de bolas a una frecuencia de 19 rpm durante 7 min. El homogenato obtenido se centrifugó a 4700 g durante 10 min a 4°C. Posteriormente se recogió el sobrenadante y se ajustó el pH: 3 añadiendo una solución de CH_3COOH al 30% (v/v). Sobre el extracto acidificado se realizaron dos particiones líquido-líquido consecutivas con 2 ml de éter dietílico. Las fases orgánicas combinadas se secaron en una centrifuga de evaporación a vacío (Speed-vac, Jouan, Saint Herblain Cedex, Francia). El residuo seco obtenido se resuspendió en 500 μ l de una solución agua:metanol (9:1) mediante sonicación durante 10 min. El extracto final se hizo pasar a través de filtros de acetato de celulosa de 0,22 μ m de tamaño de poro y una alícuota de 200 μ l se dispuso en viales para el análisis cromatográfico.

3.C1.3-Identificación y cuantificación de hormonas

La identificación y cuantificación se llevó a cabo mediante un equipo de UPLC™ *Acquity* (Waters, Milford, MA, E.E.U.U), con un inyector automático y una bomba capaz de generar un gradiente cuaternario. La separación cromatográfica se realizó en fase reversa sobre una columna de UPLC C18 (50 × 2,1 mm 1,8-µm tamaño de partícula, Macherey-Nagel GmbH, Germany) utilizando como fase móvil metanol y agua ultra pura, ambos suplementados con ácido acético al 0,1% (grado HPLC, Scharlau). Los efluentes procedentes de la columna cromatográfica fueron introducidos al espectrómetro de masas a través de una interfaz de electrospray operada en modo negativo (Orthogonal Z-spray Micromass, Manchester, Reino Unido). Como espectrómetro de masas se empleó un triple cuadrupolo (TQD, Micromass) que permite seleccionar un ión precursor que puede ser fragmentado en la celda de colisión, y a su vez, los fragmentos generados pueden ser seleccionados en el segundo cuadrupolo a modo de iones diagnóstico. Los datos procedentes de la adquisición instrumental con esta plataforma se procesaron empleando el software Masslynx 4.0 (Micromass).

Estas determinaciones fueron realizadas por la Dra. Andrade en una estadía de investigación realizada en el Laboratorio de Ecofisiología y Biotecnología del Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universitat Jaume I de Castellón, España 2015.

3.C1.4-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 ($p \leq 0,05$). El software empleado fue InfoStat. Versión E (www.infostat.com.ar).

3.C.2-Poblaciones segregantes $F_{2:3}$ (B71 x B59)

3.C2.1-Extracción, purificación de hormonas

En las familias correspondientes a extremos susceptibles y tolerantes a estrés hídrico que se obtuvieron a partir del análisis del poder germinativo relativo al control (PGR) según Fernández y col. (2012a), se extrajo y purificó JA, SA y ABA, usando el protocolo modificado de Durgbanshi y col. (2005).

A partir de 200 mg de peso seco de parte aérea y radical de plántulas se triturará en mortero con N₂ líquido y homogeneizará con 5 ml de solvente de extracción (agua deionizada). A los extractos se le adicionarán 50 ng [²H₆]-JA, [²H₄]-SA, [²H₆]-ABA como estándares internos. Las muestras se homogenizaron con Ultra-Turrax T50 (IKA, Germany) durante 40s y luego se centrifugaron durante 15 min a 5000 rpm. Se recogió el sobrenadante y se ajustó el pH a 2,8 con ácido acético 15%. Posteriormente se realizó una doble partición con 5 ml éter etílico, se descartaron las fases acuosas y se recogieron las fases orgánicas, llevándose a sequedad en evaporador rotativo. Los extractos secos se resuspendieron con 750 µl metanol pro-análisis (MeOH), y se filtraron a través de un filtro de jeringa en cámara de vacío Supelco y se secaron a 25°C en SpeedVac SC110 (Savant Instruments, Inc., New York, USA).

La purificación comenzó con la resuspensión de los extractos secos en MeOH al 100% y luego se inyectaron 15 µl en un HPLC Alliance 2695 (Waters, Inc., California, USA) equipado con una columna Resteck C18 (Resteck USA, 2.1 x 100 mm, 5 µm) a 25°C. La elución se llevó a cabo en gradiente con un sistema de solvente binario: 0,2% ácido acético en H₂O (solvente B)/ MeOH (solvente A) con un flujo de 200 µl min⁻¹, en las siguientes proporciones (v/v) de solvente A:(t (min), %A):(0, 40), (25, 80).

3.C2.2-Identificación y cuantificación de hormonas

La identificación y cuantificación de los compuestos se realizó mediante un espectrómetro de masa de doble cuadrupolo (Micromass Quattro *pt* Ultima, UK). Todos los análisis se realizaron utilizando la fuente de electrospray con ionización negativa (ESI-) con un voltaje de capilar: (kVol) 3.25, energía de cono 35 Volts, temperaturas de la fuente 120°C y temperatura de desolvatación 350°C, flujo de gas de cono 102 (L/hs) y flujo de gas de desolvatación 692 (L/hs). La cuantificación se llevó a cabo en modo MRM (Monitoreo de Reacciones Múltiples), monitoreando los iones parentales y sus fragmentos para JA, SA y ABA y sus estándares internos [²H₆]-JA, [²H₄]-SA, y [²H₆]-ABA respectivamente para todas las familias a excepción de las familias 2, 4, 36, 37 y 47 pertenecientes al extremo sensible y 43 y 111 del extremo tolerante, donde el contenido endógeno de SA fue determinado en el modo SIR (Registro de Ion Seleccionado).

Los valores de concentración se obtuvieron mediante curvas de calibración y se expresaron en pmol de hormona por gr. PS⁻¹. El software que se utilizó fue MassLynx TM v.4.1. (Waters-USA).

En familias $F_{2,3}$ se expresaron los niveles endógenos de las hormonas SA, JA y ABA relativos al control (HRC) en %, para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{HRC}(\%) = \text{HRC}_{400\text{mM}} (\text{pmol. gr PS}^{-1}) / \text{HRC}_{\text{Control}} (\text{pmol. gr PS}^{-1}) \times 100$$

3.C2.3-Análisis estadístico

Para comparar niveles endógenos dentro de cada familia $F_{2,3}$ extrema a estrés hídrico se realizó un Análisis de la Varianza de una vía (ANOVA) y a posteriori un test de Rangos Múltiples (LSD de Fisher; $p \leq 0,05$). Valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Se utilizó el programa InfoStat, versión E.

Para identificar patrones hormonales en las familias $F_{2,3}$ contrastantes para estrés hídrico, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) y uno de discriminante lineal (ADL) de los datos de HRC de SA, JA y ABA para las familia $F_{2,3}$. Para este último análisis se realizó una reducción de dimensionalidad; maximizando las varianzas entre las nuevas categorías creadas (*familias extremas/respuesta al estrés*) y minimizando las varianzas dentro de las nuevas categorías creadas. Se utilizó el programa InfoStat, versión E.

3-SECCIÓN D.

3.D.1- Evaluación de la expresión génica de las líneas parentales B59 y B71.

3.D1.1-Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN se utilizó el kit de extracción RNAqueous Plant RNA Isolation Aid (Ambion, Life Technologies Corporation. USA.).

Se partió de 100 mg de peso fresco de parte aérea y radical de plántulas (controles y estresadas) generadas según lo indicado en el ítem C.1.1., cosechadas y mortereadas con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Al material vegetal se agregó 400 μl solución de lisis y 100 μl de "RNA isolation aid". Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente, descartando el pellet y al sobrenadante se agregó 900 μl agua etanol 64%. Se colocó una columna de centrifugación en un tubo colector y se agregó la solución anterior en la columna de centrifugación, se centrifugó a 12000 rpm durante 1 min y se descartó lo eluido. A la columna de centrifugación anterior se le adicionó 700 μl de solución 1 y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 min.,

descartándose el eluido. A continuación, se realizó 2 lavados con 500 µl de buffer de lavado 2/3 y se centrifugó a 12000 rpm durante 1min., descartándose el eluido.

Se eluyó el ARN, que estaba retenido en la columna de centrifugación, con 2 tandas de 60 µl de buffer de elución a 80°C y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 min. Luego las muestras se colocaron en hielo.

Para limpiar la muestra de polifenoles se realizó precipitación con CILi (cloruro de litio). Se adicionó 60 µl CILi y dejó a 4°C toda la noche. Luego se centrifugó a 12000rpm durante 20s a 4°C, se trasvasó el sobrenadante y se agregó 150 µl de etanol 70% frío, se centrifugó a 12000 rpm durante 10s a 4°C. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente y el pellet se dejó secar. El pellet se resuspendió en 50 µl de agua DEPC y se colocó en hielo.

La cuantificación del ARN se realizó usando un espectrofotómetro Nanodrop-ND 1000 y para determinar la integridad del ARN extraído se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5%. (p/v) y tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml), utilizando como referencia concentraciones conocidas de ARN. Se sembró un volumen de 5 µl, 4 µl de buffer de siembra y 1 µl de muestra. La electroforesis se llevó a cabo en buffer MOPS 1X a un voltaje constante de 5 Volts/cm durante 30 min. La visualización del ARN se realizó por transiluminación con luz UV, en digitalizador de imágenes acoplado a PC con el programa Gene Quantitive (Biorad). La calidad de ARN extraído se confirmó por Bioanalizador Agilent (Agilent Technologies), mediante el uso del RNA 6000 Nano Kit.

Las muestras de ARN se llevaron a concentración adecuada y se enviaron para ser hibridadas en el chip de expresión, servicio que realizó la Unidad Genómica del Instituto Príncipe Felipe España (Fernández y col. 2012).

3.D1.2- Expresión génica por micromatriz de oligonucleótidos (Chip)

La expresión génica se realizó mediante el uso de un microarreglo de oligonucleótidos diseñado en plataforma Agilent en un formato de 4 x 44 K. Se realizaron las hibridaciones con sondas sintetizadas a partir de ARN de 3 muestras biológicas de los tratamientos constituidos por dos genotipos (B71 y B59), dos partes de la planta (raíz y tallo) y dos condiciones hídricas (control y estrés). El ensayo de hibridación del microarreglo involucró un diseño en bloques con un total de 8 micromatrices, con cuatro

campos cada una. Cada campo fue hibridado con ARN correspondiente a cada réplica biológica.

3.D1.2.1-Pre procesamiento de los datos

El pre-procesamiento de los datos se realizó utilizando la biblioteca limma (Smyth, 2005) a partir del paquete de R (R Core Team, 2013). La corrección de fondo se realizó mediante la función `backgroundCorrect`, utilizando el algoritmo "rma". La normalización entre matrices se ha realizado mediante la función `normalizeBetweenArray` utilizando el método de "cuantil". Finalmente, las expresiones de genes se transformaron a escala log₂ y la sumarización de réplicas técnicas se realizó calculando la mediana.

3.D1.2.2-Diseño experimental

El plan de hibridación fue diseñado como un diseño de bloque incompleto, para acomodar un experimento factorial 2³. Cuatro réplicas (de los 8 "tratamientos") se asignaron en 8 bloques de tamaño 4. Los factores evaluados fueron: líneas (dos líneas: L59, L71), estrés (control, Manitol) y parte de la planta (aérea y radical). Se realizó un plan de confundimientos donde algunas interacciones seleccionadas fueron confundidas con el efecto de bloque en cada réplica. En la Tabla 1 se describen el nombre de muestra, el factor y la estructura de los experimentos de cada archivo generado por Software de extracción de características Agilent (v9.5.1) siguiendo el protocolo de Agilent GE1_107Sep 09 y el Conjunto de mediciones GE1_QCMT_Sep09.

3.D1.2.3-Análisis de la expresión génica diferencial

El análisis estadístico se realizó con un conjunto de rutinas especiales para ajustar, gen por gen, un modelo lineal mixto. Debido a que cada chip de oligonucleótido de girasol incluye 4 arrays, el efecto de chip (bloque incompleto) se incluyó como un efecto aleatorio. El conjunto de rutinas mencionadas anteriormente se basaron en la función `lme` de biblioteca `nlme` de R (Pinheiro y col., 2012) implementado en software estadístico InfoStat (Di Rienzo y col., 2013).

Contrastes apropiados que se utilizaron para probar las hipótesis específicas.

CtrvsManitolAP59	Mean(Ctrl)- Mean(Manitol) en parte aérea, línea L59
CtrvsManitolAP71	Mean(Ctrl)- Mean(Manitol) en parte aérea, línea L71
CtrvsManitolRT59	Mean(Ctrl)- Mean(Manitol) en parte radical, línea L59
CtrvsManitolRT71	Mean(Ctrl)- Mean(Manitol) en parte radical, línea L71

Tabla 1: Nombre utilizado de los contrastes y descripción de los mismos.

Debido a la transformación log2 de expresiones de genes, los contrastes estimados se expresaron en escala log2 factor de cambio (FC).

3.D1.3-Análisis de nivel de expresión utilizando el programa Mapman

Con el objetivo de utilizar este programa con datos provenientes de girasol fue necesario adaptar la colección de datos para esta especie, ello a partir de una base de datos de girasol que contiene aproximadamente 41.000 unigenes, realizándose la anotación funcional y asignación de Bin code para cada uno de ellos.

El resultado de la anotación funcional permitió la creación de una tabla que contiene información del Bin code asociado para cada unigen, el nombre del gen y su descripción.

La tabla fue utilizada como librería del Mapman (mapman.gabipd.org) (Thimm y col., 2004), lo que permitió identificar y mapear los unigenes significativos en las distintas vías metabólicas. Tal librería fue gentilmente cedida por el Dr. Sebastian Moschen. La anotación funcional fue realizada en el Instituto de Biotecnología del INTA Castelar.

3.D1.4-Cuantificación de niveles de expresión de genes candidatos por PCR en tiempo real (qPCR)

El primer paso para la validación es la selección de genes candidato para la cual se utilizó la base de datos de unigenes curados y anotados para girasol, Sunflower Unigene Resource (SUR v1.0), desarrollada por la Unidad de Bioinformática del Instituto de Biotecnología (<http://atgc-sur.inta.gob.ar/>) (Fernández y col., 2012b).

La selección de los genes se basó en aquellos que presentaron un factor de cambio mayor a 1 o menor a -1. Dentro del grupo de los genes seleccionados algunos pertenecían a las vías de síntesis de ABA, JA y SA.

Se desarrollaron cebadores específicos para cada gen seleccionado utilizando el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) bajo parámetros preestablecidos.

Los cebadores empleados para amplificar las regiones candidatas se describen en la Tabla 2.

Nombre	Identificador sur	Cebador izquierdo	Cebador derecho
Ha-EF-1 α	HeAn_C_8757	5'ACCAAATCAATGAGCCCAAG 3'	5'GAGACTCGTGGTGCATCTCA 3'
3481	HeAn_C_3481	5'TTGACATTGAGGGTTGTCCA 3'	5'GCTACACATTCCGGTGGAGT 3'
4588	HeAn_C_4588	5'AATCCACATCTCCTCCATGC 3'	5'GTTAATGGCATTGCGCTTGT 3'
6342	HeAn_C_6342	5'ACCCCCACACAGATTAACCA 3'	5'ATCTCGACACCGTCAAACC 3'
6970	HeAn_C_6970	5'GTCACATGGTGGAGATCACG 3'	5' TTCACCTGCACCTTCATGTC 3'
9636	HeAn_C_9636	5'AAATGTTTGCAGGGAGGTTG 3'	5'AATTCCTTGGCCAGTCACAC 3'
10178	HeAn_C_10178	5'CGCGTTTGTGCTTATCTTGA 3'	5'TGCCCACATTGTGTCGAGT 3'
11465	HeAn_C_11465	5'GCCCTTGGTGCACCTAACAT 3'	5'CAAATCCCGCCTTCTTACA 3'
12829	HeAn_C_12829	5'CACGAGTCCTTTGCTCACAA 3'	5'AAGATGTGTGGCAACGAGTG 3'
14255	HeAn_S_14255	5'GAGGCCCAATTCAACTCTCA 3'	5'AACGCGGTCTTGAATGAAAC 3'
27358	HeAn_S_27358	5'CTCTCGGGTTGTGCGGAATA 3'	5'CCACCCCGACATTATTCATC 3'

Tabla 2: Cebadores empleados para realizar PCR en tiempo real (qPCR)

3.D1.4.1-Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real (qPCR)

A partir del ARN extraído de ambas líneas parentales y tratado con la enzima ADNasa se realizó la síntesis de ADN copia (ADNc) utilizando la enzima para transcripción reversa Superscript III (Invitrogen, EUA) y cebadores de hexámeros al azar. La cuantificación del nivel de expresión para los distintos genes se realizó a través de la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) utilizando el kit Fast Start SYBR Green (Roche, Argentina) en termociclador Step-One Real-Time PCR System (Applied Biosystems) a partir de los ADNc sintetizados.

La reacción de qPCR fue llevada a cabo en 25 μ l de reacción conteniendo 200 nM de cada cebador, 1 μ l de ADNc y 12,5 μ l de FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Applied Science). Se evaluaron simultáneamente controles negativos.

Se utilizó el siguiente programa de ciclado: 95°C durante 10 min, y 40 ciclos de 95°C por 15 s y 1 min a temperatura de hibridación.

La especificidad de la reacción fue verificada mediante el análisis de la curva de disociación o curva de *melting* luego de los 40 ciclos de la PCR. El ensayo de qPCR fue

llevado a cabo con tres réplicas biológicas para cada condición y tres réplicas técnicas para cada una de ellas.

Los datos crudos obtenidos se analizaron mediante el programa LinRegPCR, el cual permite calcular la eficiencia de la reacción de PCR y el Cq o ciclo de cuantificación, para cada una de las muestras evaluadas (Ruijter y col., 2009). Los niveles de expresión se evaluaron en relación a la expresión de genes de referencias (RGs) caracterizados previamente para girasol (Fernández y col., 2011) utilizando el programa fgStatistics (fgStatistics, 2009).

A partir de ello, diez genes fueron seleccionados en base a la tasa de cambio que presentaron durante el ensayo frente a estrés hídrico, en ambas líneas parentales B71 y B59, para ser validados mediante qPCR. La figura 11 muestra los valores de expresión obtenidos mediante el análisis de micromatrices y qPCR de los genes seleccionados tanto para la condición control como déficit hídrico.

Diferentes genes de referencia fueron evaluados seleccionando el Factor de Elongación-1- α (Ha-EF-1 α) como gen de referencia (RG) debido a que mostró un comportamiento estable en ambas líneas y condiciones.

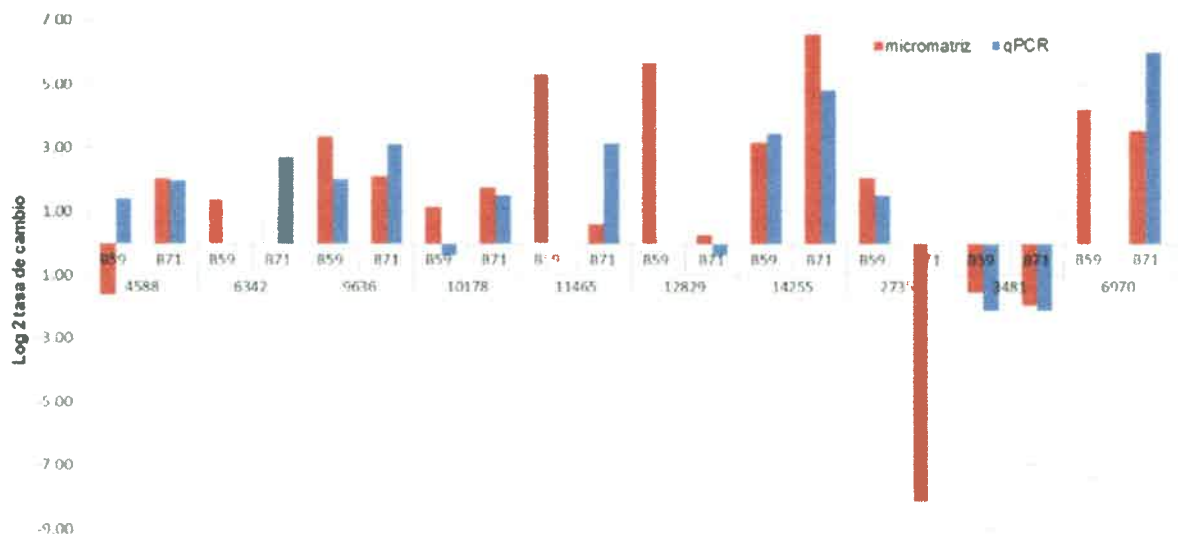


Fig.11. Validación de la micromatriz en las condiciones de estrés hídrico en líneas parentales B71 y B59. Niveles de expresión en escala logarítmica (Log2) de los diez unigenes (nombrados según el número de identificación en la base de datos de girasol utilizando el factor de elongación (Ha.EF1 α) como gen de referencia.

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSION

4-SECCIÓN A

Caracterización de material contrastante a estrés hídrico

4.A.1-Líneas parentales B59 y B71

Las líneas parentales utilizadas fueron caracterizadas fenotípicamente en su comportamiento frente a estrés hídrico por nuestro grupo de trabajo (Andrade y col., 2009; 2013).

4.A.2-Evaluación de poblaciones segregantes $F_{2:3}$ (B71 x B59)

Evaluated el total de la población segregante (89 familias $F_{2:3}$) se observaron diferencias significativas entre las mismas para el carácter PGR (tabla 3).

FV	GL	SC	CM	F	PR>F
Familia	93	140134.68	1506.82	9.66	<.0001
Error	270	39503.77	146.31		

CV: 13.88920; R^2 : 0.780093; PGR MEDIO: 87.08841; FV: fuentes de variación; GL: grados libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; NS: no significativo;

Tabla 3. ANOVA individual de progenies $F_{2:3}$ (B71xB59) de girasol para la variable porcentaje de germinación (Manitol 400 mM) en relación al control (PGR).

Con el objetivo de observar la segregación que presentó este carácter, las familias $F_{2:3}$ se agruparon en base a intervalos de PGR y se los representó en función del número de progenie $F_{2:3}$ en cada categoría, la distribución de PGR de la totalidad de las familias $F_{2:3}$ (B71 x B59) presentó una variación continua con tendencia a una distribución normal para el carácter estrés hídrico en el estadio fenológico de plántula (Fig. 12).

La distribución de PGR de las familias $F_{2:3}$, presenta un extremo de familias susceptibles; familias intermedias y otro extremo de familias tolerantes. 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 epistasia.

Esta distribución en la respuesta a PGR en familias $F_{2:3}$ sometidas a estrés, fue coincidente con lo observado por Fernández y col. (2012a) en familias $F_{2:3}$ (A59 x R432) de girasol.

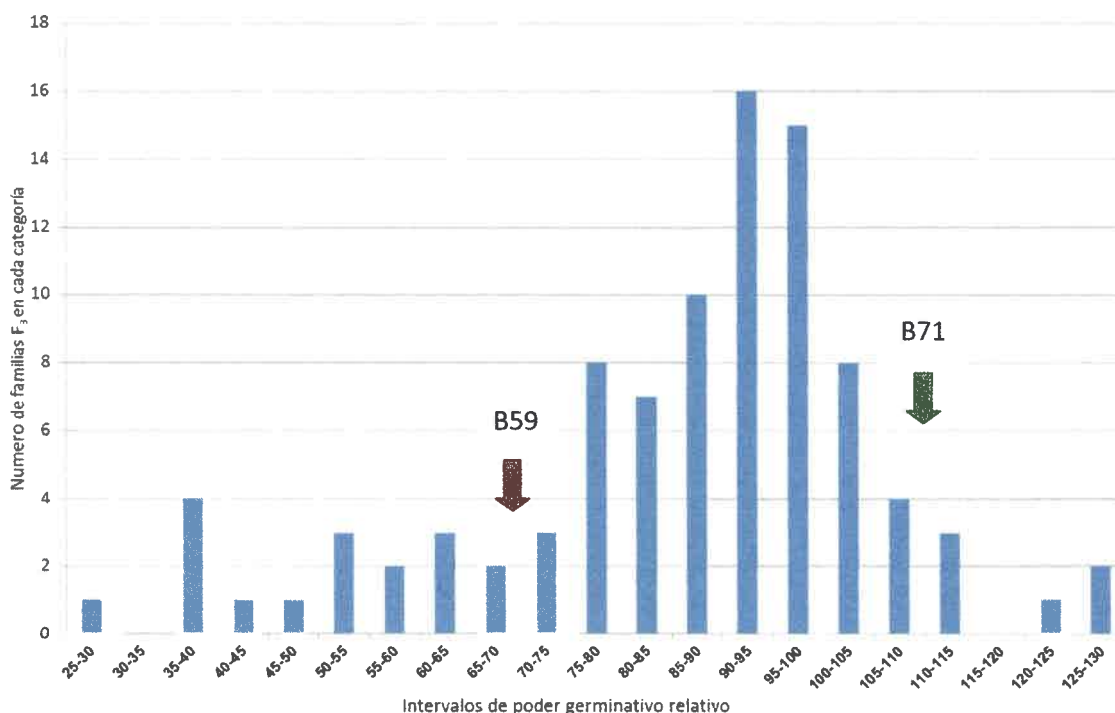


Fig.12. Distribución de PGR de las familias $F_{2:3}$ (B71xB59) por intervalos de porcentaje de germinación.

De los resultados obtenidos del fenotipado de la totalidad de las familias $F_{2:3}$ segregantes, para el carácter PGR, se determinaron dos grupos que presentaron respuesta contrastante al estrés hídrico. En el grupo sensibles se incluyó las familias 37, 4, 2, 36, 47 y 80, mientras que en el grupo con mayor tolerancia al estrés hídrico encontramos a las familias 18, 48, 43, 19, 111 y 31 (Fig. 13). Además, el análisis de PGR realizado a las familias $F_{2:3}$ sensibles y tolerantes determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre dichos grupos de familias extremas, lo que corroboraría su comportamiento contrastante ante condiciones de estrés hídrico (Fig. 13).

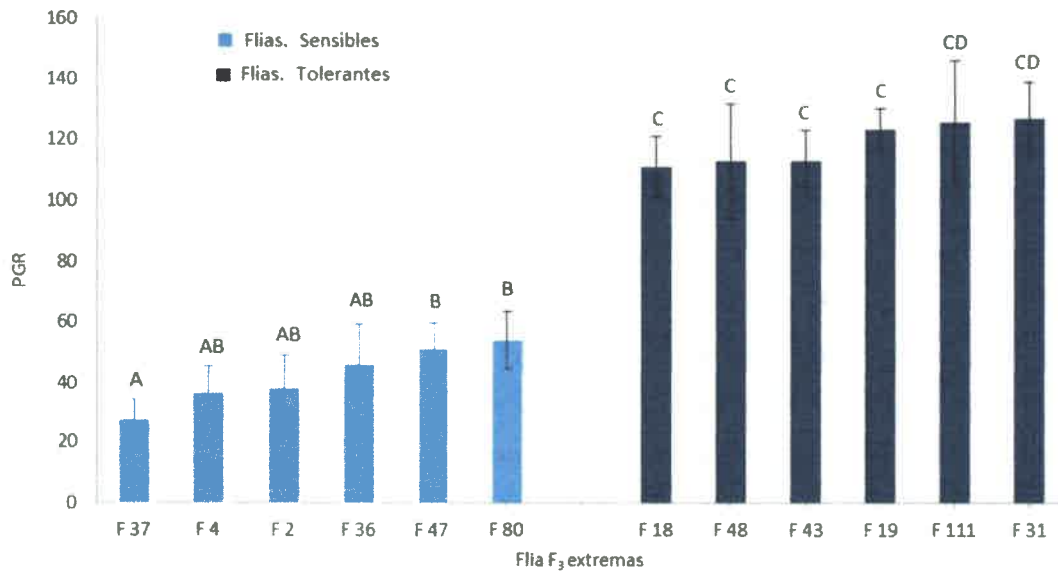


Fig.13. Determinación de PGR (%) en familias $F_{2:3}$ tolerantes y sensibles sometidas a estrés hídrico ($n=4$; $\bar{x} \pm EE$) $p<0,05$.

Este resultado mostraría la variabilidad existente para el carácter evaluado, y por otro lado nos indicaría la importancia de evaluar la respuesta a estrés hídrico en el estadio de germinación y crecimiento temprano, en concordancia con los resultados obtenidos por Ahmad y col. (2009).

La eficiencia de este parámetro en discriminar familias $F_{2:3}$ tolerantes o sensibles a estrés hídrico coincide con lo determinado por Fernández y col. (2012a) en el cruzamiento de las líneas endocriadas A59 x R432.

4-SECCIÓN B.

Caracterización genotípica

4.B.1-Líneas parentales B59 y B71

El primer paso para determinar genes o regiones génicas en poblaciones segregantes es determinar polimorfismo de marcadores moleculares (microsatélites) en las líneas parentales. Para ello se evaluaron 350 marcadores, de los cuales 245 pertenecían a los HA (Paniego y col., 2002) y 105 a los ORS (Tang y col., 2002).

Los cebadores fueron seleccionados por su reproducibilidad, facilidad de interpretación (ausencia de bandas producto del deslizamiento enzimático y sitio único de amplificación) y baja frecuencia de alelos nulos.

De los 350 cebadores evaluados, 73 microsatélites presentaron polimorfismo entre las líneas parentales (tabla 1a, Anexo A) lo que representa casi un 22% del total de los microsatélites, entre los marcadores descartados, algunos presentaron perfiles complejos y otros no amplificaron. Además se evaluaron 8 nuevos marcadores polimórficos (EST-microsatélites), desarrollados previamente por Filippi y col. (2015), con lo cual el número total de marcadores polimórficos ascendió a 81 (23%) entre las líneas endocriadas B71 y B59. Estos marcadores seleccionados fueron los utilizados para la genotipificación en $F_{1:2}$.

El porcentaje de marcadores polimórficos obtenidos en este trabajo puede considerarse bajo al compararlo con el 28% obtenido por Salunkhe y col. (2012) en dos líneas de arroz con sensibilidad y resistencia a sequía y 31.71% obtenido por Poormohammad Kiani y col. (2007) en girasol bajo condiciones de estrés hídrico.

El bajo porcentaje de marcadores polimórficos obtenido podría deberse en parte a que las líneas parentales no presentan una gran distancia genética.

Atendiendo al número de marcadores polimórficos disponibles y con el objetivo de poder tener una aproximación del comportamiento de estas líneas contrastantes al estrés hídrico y a su vez, definir la viabilidad de realizar un mapeo génico tradicional e identificación de QTL, se realizó un análisis de segregantes agrupados (*Bulked Segregant Analysis* o BSA) con extremos contrastantes al estrés hídrico y evaluado en forma individual (grupo abierto).

4.B.2-Poblaciones segregantes $F_{1:2}$ (B71 x B59)

Al analizar el resultado obtenido de la amplificación de los marcadores que resultaron polimórficos para las líneas parentales (B71 y B59) en las muestras de ADN de las familias que formaron parte del grupo sensible o tolerante, no se observaron asociaciones positivas con el carácter tolerancia al estrés hídrico evaluado a través del PGR.

En la tabla 2a (Anexo A), podemos observar el resultado obtenido del genotipado para ambos parentales como para las familias $F_{1:2}$ perteneciente a los grupos extremos

(sensible y tolerante a estrés hídrico). Las muestras de ADN de estos genotipos fueron amplificadas con los mix generados por la más adecuada combinación de los 73 microsatélites y los 8 EST-SSR (como se describe en la sección B1.3- de materiales y métodos). Los resultados obtenidos mostraron una segregación al azar de cada marcador en cada grupo extremo, no encontrándose hasta el momento una asociación positiva entre los marcadores polimórficos evaluados y el carácter PGR.

Estos resultados contrastan con otros trabajos donde se utilizaron marcadores moleculares combinados con el empleo de la técnica de BSA, los cuales han mostrado eficiencia en la identificación de genes de tolerancia a estreses bióticos y abióticos en cultivos de interés agrícola. 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, logrando identificar 8 RAPDs, 4 ISSRs y 3 R-ISSRs ligados a regiones genómicas responsables de la tolerancia a la deficiencia de nitrógeno y potasio. Además, Salunkhe y col. (2011) empleando una población de 330 líneas endocriadas recombinantes o RILs (*Recombinant Inbreed Lines*) de arroz genotipificadas con 343 microsatélites polimórficos lograron identificar una asociación positiva entre una región genómica (QTL) responsable de la tolerancia a sequía en arroz y un marcador SSR.

Además, se encuentran trabajos donde la genotipificación se realizó en estadios previos de autofecundación ($F_{1:2}$) y se obtuvieron resultados positivos como es el caso de Barakat y col. (2011) que utilizaron 162 familias F_2 obtenidas del cruzamiento de cultivares tolerante y sensible al calor y encontraron 3 marcadores (microsatélites) ligados al carácter "llenado de grano" como indicador de tolerancia a calor en trigo. Además 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.

Dos características importantes que pudieron influir en la ausencia de detección de asociación entre marcadores y genes para el carácter PGR puede considerarse, el reducido número de marcadores polimórficos identificados, como se menciona en la sección B.1 de resultados y el bajo número de familias segregantes disponibles, 89 familias, debido a que muchas familias fueron descartadas por no llegar al número mínimo de semillas necesarias para realizar la fenotipificación en $F_{2:3}$.

El poder de detección de QTL depende del tamaño de la población (Verhoeven y col., 2006), donde un elevado número de individuos (mayor a 500) permite obtener QTL con efecto medio y se necesita contar con mayores tamaños de poblaciones para identificar QTL de efecto menor (Würschum 2012). La principal desventaja de trabajar con elevado número de individuos es el elevado costo económico tanto en la caracterización fenotípica como genotípica, además del tiempo y el espacio requerido (Ferreira y col., 2006). Por otro lado, poblaciones de tamaños reducidos pueden generar subestimación del número de QTL, sobre-estimación del efecto de QTL o el fracaso de encontrar QTL (Allison y col., 2002 y Schön y col., 2004). La mayoría de los trabajos de mapeo genético de caracteres complejos utilizan 100 individuos como mínimo (Vales y col., 2005), aunque Ferreira y col. (2006), en un estudio de simulación para el carácter estrés, observaron que un total de 200 individuos era suficiente para obtener mapas genéticos precisos, lo cual mejora la determinación de QTL.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se puede destacar la relevancia que tiene la selección de individuos contrastantes como parentales de poblaciones de mapeo con fondo genético más distante y con baja presencia de regiones génicas introgresadas de material silvestre, de manera de incrementar las posibilidades de encontrar asociaciones positivas entre marcadores polimórficos y el carácter en estudio en futuros proyectos de mejoramiento asistido de girasol.

Respecto al tipo de población a utilizar, Ferreira y col. (2006) encontraron que las poblaciones más eficientes para la obtención de mapas genéticos eran F_2 con marcadores co-dominantes y RILs. Teniendo en cuenta que el bajo número de semillas es una de las desventajas que se presenta al utilizar poblaciones $F_{2,3}$ respecto a usar poblaciones RILs (Burr y Burr, 1991), una alternativa para continuar y profundizar este trabajo es la utilización de poblaciones RILs (B71 x B59), de manera de utilizar la información obtenida según lo descrito en el ítem B.1.

Si bien este trabajo no concluyó en asociaciones genotipo-fenotipo, mostró que los parentales seleccionados presentaron polimorfismo para 73 marcadores neutros (microsatélites) y 8 funcionales (EST) y que es posible identificar en un futuro QTL, al menos mayores en F_2 - $F_{2,3}$, teniendo en cuenta las sugerencias planteadas en los párrafos anteriores.

4-SECCIÓN C.

Determinaciones de hormonas vegetales

4.C.1-Líneas parentales B59 y B71

4.C1.1-Contenido endógeno de ABA, JA y SA en condiciones control y estrés hídrico, en parte aérea y radical, de las líneas B59 (sensible) y B71 (tolerante)

En la figura 14 podemos observar cómo influye la condición de estrés en el nivel endógeno de ABA. En parte aérea de la línea B59, ABA presentó una tendencia de incremento (no significativo estadísticamente) en respuesta al tratamiento de estrés hídrico, mientras que en parte radical, ABA mostró un incremento leve en respuesta a manitol. En la línea B71, el contenido endógeno se incrementó en forma significativa (1,4 veces) en la condición de estrés respecto a la condición control en parte aérea, y en parte radical, el contenido de esta hormona no presentó cambio en plántulas estresadas por manitol.

En resumen, la parte de la planta donde se observa mayores incrementos en los niveles de ABA endógeno es en parte aérea, siendo más evidente en la línea tolerante; tal aumento podría deberse tanto al ABA sintetizado en esta parte de la planta (Christmann y col., 2007) como aquel sintetizado en raíz, generado a partir de que este órgano es el encargado de censar el estrés hídrico en el suelo, que luego es transportado por xilema (Thompson y col., 2007, Wilkinson y Davies, 2002).

El aumento de ABA en parte aérea es necesario para inducir el cierre estomático, lo que permite limitar la pérdida de agua (Levchenko y col., 2005 y Siegel y col., 2009). Por otra parte estimula la producción de compuestos osmotolerantes (Zhu, 2002, Zhang y col., 2013) y proteínas LEA, las cuales pueden proteger las macromoléculas en condiciones de sequía (Chakrabortee y col., 2007), activar varias cascadas de señalización (Fujita y col., 2009, Klingler y col., 2010, Raghavendra y col., 2010) e inducir y reprimir distintos factores de transcripción dependientes de ABA (Fujita y col., 2005, Fujii y col., 2011, Fujita y col., 2013).

Si analizamos la planta entera, se puede observar que el cultivar tolerante muestra una mayor concentración de la hormona y un aumento significativo en respuesta a estrés hídrico de 442 ng./g.PS en referencia a la sensible que sólo incrementó sus niveles de ABA en 262 ng./g.PS. El incremento observado por el estrés hídrico coincide con lo

observado en plántulas de maíz (Zhang y col., 2012), en trigo (Bano y col., 2012) y en tomate (Zhang y Haung, 2013), en las cuales se apreció acumulación de ABA en respuesta a condiciones de sequía y un mayor contenido de ABA en el cultivar tolerante respecto al sensible.

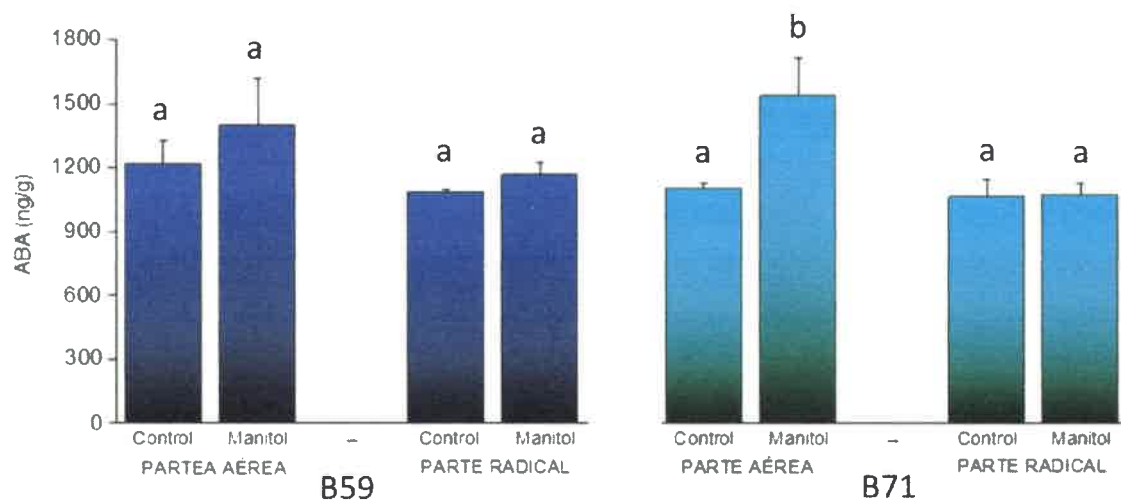


Fig.14. Niveles endógenos de ABA en parte aérea y radical de plántulas de las líneas B59 y B71, controles y tratadas con manitol ($n=4 \pm SE$). Distintas letras indica diferencias estadísticamente significativas a $p>0,05$.

Respecto al contenido de JA, en la figura 15 observamos que para la línea B59, tanto en parte aérea como radical, el contenido de esta hormona no mostró importantes modificaciones en su concentración por efecto del estrés. Por el contrario, en parte aérea de la línea B71 la condición de estrés generó un incremento significativo (1,5 veces) de JA respecto a la condición control, mientras que a nivel radical también se observó una tendencia al incremento de JA en la condición de estrés, aunque el cambio no fue significativo.

Los cambios en la concentración de JA están comúnmente relacionados a respuesta a estrés bióticos (Glazebrook 2005, Verhage y col., 2010, Erb y col., 2012), aunque existen trabajos que relacionan esta hormona a la respuesta a estrés abiótico como por ejemplo, los trabajos de Arbona y col. (2010) que observaron aumento en los niveles de JA en plántulas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a estrés salino y Du y col.

(2013) que hallaron aumento del nivel de JA en hojas de arroz expuestas a condiciones de sequía

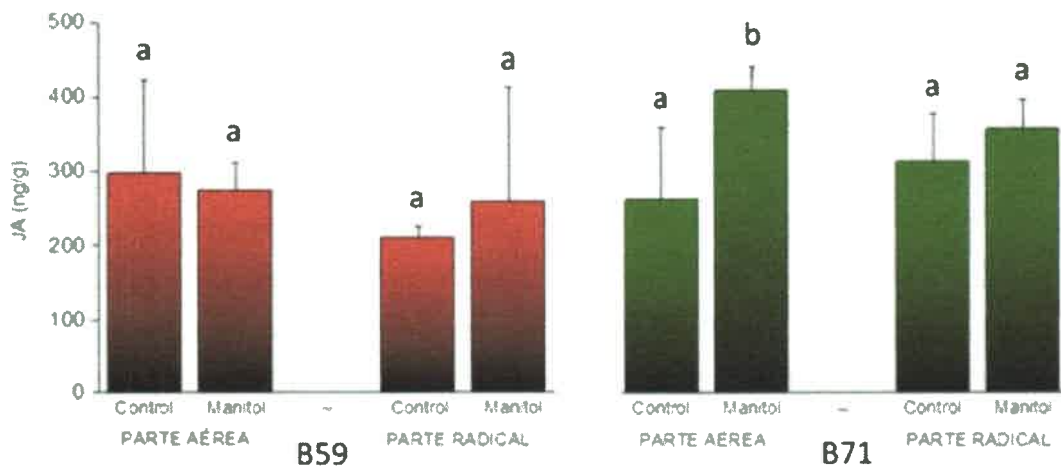


Fig.15. Niveles endógenos de JA en parte aérea y radical de plántulas de las líneas B59 y B71, controles y tratadas con manitol ($n=4 \pm SE$). Distintas letras indica diferencias estadísticamente significativas a $p>0,05$

. Los resultados obtenidos en nuestra experiencia en líneas contrastantes para estrés hídrico en girasol, muestran un aumento significativo en planta entera de la línea tolerante en respuesta a estrés hídrico de 191 ng./g.PS, mientras que la línea sensible sólo presentó un incremento de 26.5 ng./g.PS. Tales resultados se encuentran en concordancia con lo observado por Zhang y Haung (2013) en tomate, donde cultivares tolerantes a estrés hídrico mostraron una mayor concentración de JA que el cultivar sensible, al ser expuestos a condiciones de estrés hídrico, con lo cual se puede hipotetizar que esta hormona podría estar influyendo en la tolerancia de la planta a este tipo de estrés.

Para determinar cómo influye la condición de estrés en el contenido endógeno de SA observamos la figura 16 donde se aprecia que la línea B59, en la condición de estrés mostró un significativo incremento en el contenido de esta hormona (4 veces respecto a la condición control) en parte aérea, siendo leve en parte radical. De igual modo, pero en menor proporción, la línea B71 también presentó un aumento de SA en parte aérea (2 veces respecto a la condición control), mientras que en raíz, también fue leve.

Al igual que lo observado para ABA, la parte de la planta donde se observó el mayor incremento de SA fue en la parte aérea de ambas líneas. Este aumento de SA puede ser importante para las plantas a partir de que se ha observado en estos últimos años que esta hormona también cumpliría un rol en la modulación de la respuesta de la planta a varios tipos de estreses abióticos. La respuesta a este tipo de estreses mediada por SA ha sido la reportada en distintas especies y estaría relacionada a cambios en el balance redox de las células y protección a la planta del daño oxidativo (Horváth y col., 2007), también induce genes del tipo PR (1 y 2) y además estaría implicado en el cierre estomático a través de un camino de señalización diferente de ABA (Miura y col., 2013).

Al realizar el análisis de los resultados en planta entera se observó que ambas líneas mostraron un aumento significativo de SA en respuesta al estrés hídrico, en la línea sensible se observó un aumento de 3837.3 ng./g.PS y para la línea tolerante el aumento fue de 3162 ng./g.PS.

En nuestros resultados el aumento en la concentración de SA en respuesta a estrés hídrico fue el de mayor magnitud dejando en claro que SA es una señal de respuesta al estrés abiótico en girasol. Como la concentración de SA fue similar en ambas líneas podríamos pensar que la tolerancia de la línea B71 no estaría asociada a la concentración de esta hormona.

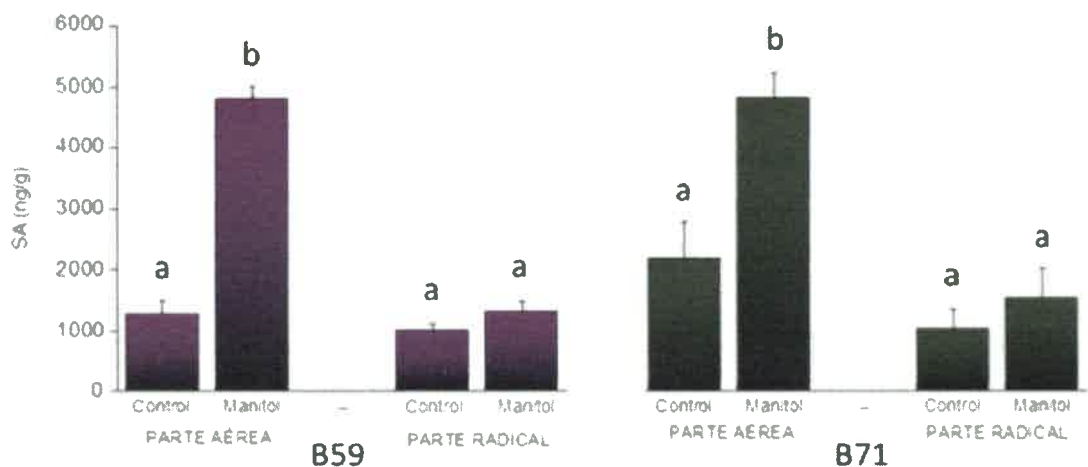


Fig.16. Niveles endógenos de SA en parte aérea y radical de plántulas de las líneas B59 y B71, controles y tratadas con manitol ($n=4 \pm SE$). Distinta letras indica diferencias estadísticamente significativas a $p>0,05$.

Analizando las figuras anteriores podemos mencionar que las tres hormonas estudiadas presentarían una función activa en la respuesta de la planta a las condiciones de estrés hídrico utilizadas, los cambios más importantes en concentración de hormonas se produjeron en parte aérea de ambas líneas, siendo SA la hormona que más aumento, siguiendo ABA y por último JA, la cual en la línea B59 disminuyó su concentración en condiciones de estrés. En parte radical los aumentos por la condición de sequía fueron menores.

Si tenemos en cuenta que la respuesta diferencial a nivel hormonal entre línea sensible y tolerante se observaron para ABA y JA podríamos hipotetizar que una parte de la respuesta a la tolerancia de la línea B71 podría deberse al “crosstalk” entre ABA y JA el cual es complejo y puede ser sinérgico o antagónico dependiendo de los diferentes mecanismos de regulación de ambas hormonas. Una respuesta conjunta entre estas dos hormonas se ha observado como respuesta a estrés biótico (Adie y col., 2007) y abiótico. En tal sentido, Arbona y col. (2010) observaron un aumento en la concentración de JA y ABA en *Arabidopsis* y Zhang y Huang (2013) determinaron aumentos en la concentración de ABA y JA en plántulas de tomates expuestas a sequía, siendo el cultivar tolerante quien presentó los mayores incrementos.

Por lo expuesto anteriormente y en concordancia con lo planteado por De Ollas y col. (2012) en evaluaciones de estrés hídrico en raíces de limón, se podría adjudicar a la interacción entre JA y ABA como un mecanismo de “sintonía fina” de las respuestas específicas a diferentes estímulos bióticos y abióticos, en este caso en particular al estrés hídrico.

4.C.2-Poblaciones segregantes $F_{2:3}$ (B71 x B59)

4.C.2.1-Determinaciones de hormonas vegetales en familias $F_{2:3}$

Las modificaciones en los niveles endógenos de SA, JA y ABA de las familias $F_{2:3}$ contrastantes (sensibles y tolerantes) para estrés hídrico valoradas por el PGR, se observan en las tablas 4 y 5.

Los resultados de la tabla 4 muestran que la condición de estrés hídrico generó un incremento del nivel endógeno de ABA para todas las familias extremas sensibles, mientras que JA no presentó una tendencia para todas las familias extremas. Por ejemplo las familias 4 y 47 presentaron incremento en los niveles endógenos de JA, aunque solo

en la familia 47 el cambio fue estadísticamente significativo, mientras que las 37, 2, 36 y 80 mostraron una reducción en los niveles de esta hormona cuando fueron colocadas en condición de estrés. Por último, observamos que SA se incrementó en las 4 familias más sensibles (37, 4, 2 y 36) aunque solo en la 37 y 2 presentaron cambios significativos, mientras que las familias que presentaron menor sensibilidad dentro de este grupo (47 y 80) mostraron una marcada disminución de los niveles de SA.

SENSIBLES	SA	EE	Dif. sig.	JA	EE	Dif. sig.	ABA	EE	Dif. sig.
F37	745.7	180.6	*	52.8	15.7	*	112.2	17.2	*
F4	259.1	181.4		140.9	86.0		154.0	13.5	*
F2	1024.1	575.8	*	87.0	63.4	*	124.9	16.9	*
F36	111.4	82.5		22.9	9.9	*	101.3	5.1	
F47	49.9	22.0	*	144.3	27.9	*	120.0	21.4	*
F80	33.3	6.8	*	30.3	3.3	*	220.7	56.6	*

Tabla 4. Niveles endógenos de SA, JA y ABA relativos al control (%) en familias F_{2,3} sensibles. (n=4 ± EE). Valores mayores a 100 indican aumento en la concentración de la hormona en condición de estrés; valores menores que 100 indican disminución de la concentración en condición de estrés. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas a p>0.05 entre los niveles hormonales en condición control y tratadas con manitol.

En referencia al comportamiento de las Familias F_{2,3} tolerantes (Tabla 5) no presentan una clara tendencia en la respuesta al estrés hídrico en los niveles de ABA. Ello es debido a que las familias (18, 48, 43 y 111) presentaron aumento en la condición de estrés mientras que las 2 familias restantes (19 y 31) del grupo mostraron reducción en los niveles endógenos de ABA, destacándose la familia 19 que mostró una reducción importante. Además, observamos que 3 de las 6 familias (18, 48 y 43) del extremo tolerante no presentan cambios estadísticamente significativos en la concentración de JA a la condición de estrés, mientras las tres familias restantes (19, 111 y 31) mostraron reducción del contenido endógeno de esta hormona, siendo la familia 111 la que mostró una importante disminución. Para SA, y al igual que para las familias sensibles, dos de ellas presentaron incrementos (43 y 31), una no presentó diferencia significativa (111) y las restantes mostraron una reducción del contenido hormonal (18, 48 y 19) respecto a las plantas control, observándose una importante reducción en la familia 18.

La acción del ABA ha sido extensamente estudiada en respuesta a estrés abiótico (Hirayama y Shinozaki, 2007; Wasilewska y col., 2008; Ji y col., 2011). En plántulas de

Arabidopsis thaliana se ha observado que en condiciones de estrés hídrico se detectan incrementos en los niveles de ABA como de sus catabolitos PA, DPA y ABA-GE (Huang y col., 2008). Los resultados de la evaluación de los niveles endógenos de ABA en familias F_{2:3} de girasol evaluadas, presentaron una concordancia parcial con lo observado en *Arabidopsis*, ello debido a que si bien en todas las familias sensibles a estrés hídrico se observó un incremento en la concentración de ABA, en las tolerantes solo 4 de las 6 familias lo mostraron.

TOLERANTES	SA	EE	Dif. sig.	JA	EE	Dif. sig.	ABA	EE	Dif. sig.
F18	8.5	1.5	*	94.2	12.5		242.5	60.6	*
F48	55.9	11.0	*	83.8	9.0		151.3	44.2	*
F43	421.9	56.5	*	124.3	72.9		122.8	18.6	*
F19	61.3	26.7	*	57.3	16.5	*	9.6	2.6	*
F111	97.9	27.3		22.3	3.2	*	156.4	50.6	
F31	220.5	120.1	*	74.3	12.2	*	42.0	6.6	*

Tabla 5. Niveles endógenos de SA, JA y ABA relativos al control (%) en familias F_{2:3} tolerantes (n=4 ± EE). Valores mayores a 100 indican aumento en la concentración de la hormona en condición de estrés; valores menores que 100 indican disminución de la concentración en condición de estrés. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas a p>0.05 entre los niveles hormonales en condición control y tratadas con manitol.

En referencia a los niveles endógenos de JA de las familias F_{2:3} tanto tolerantes como sensibles mostraron un comportamiento erráticos cuando las plantas fueron sometidas a estrés hídrico, lo cual concuerda con lo observado también en estudios de plántulas de girasol por Fernández y col., (2012a). Por otra parte estos resultados no mostraron concordancia con lo evaluado en otros cultivos como en cebada por Kramell y col. (2000) donde se reportaron incrementos de JA ante condiciones de estrés hídrico.

Los resultados obtenidos de SA en estas familias extremas cuando fueron sometidas en estadios tempranos de crecimiento a estrés hídrico mostraron respuestas contrastantes, ello concuerda con lo expresado por diferentes trabajos científicos que fueron realizados con aplicaciones exógenas de SA, donde en maíz (Guan y Scandalios, 1995) y en cebada se observó una inhibición de la germinación de ambas especies, mientras que Rajjou y col., (2006) y Alonso-Ramírez y col., (2009) por el contrario mostraron una promoción de la germinación en *Arabidopsis* al igual que Szepesi y col.,

(2009) en tomate. Ello demuestra que aún no está claro el efecto del SA en germinación y en estadios tempranos de crecimiento de la planta.

A partir de no encontrar una clara tendencia en la modificaciones en los niveles endógenos de SA, JA y ABA en ambos grupos extremos de respuesta a estrés hídrico en los análisis mostrados con anterioridad, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) y uno de discriminante lineal (ADL) de los datos de HRC (hormonas relativas al control) de SA, JA y ABA para las familia $F_{2,3}$.

En el análisis de componentes principales (Fig. 17), observamos que el componente 1 representa el 37,8% de la variabilidad total, la cual está altamente representada por las hormonas ABA (Eje positivo) y SA (eje negativo), el componente 2 explica el 34,2% de la variabilidad total y está mayormente representado por la variable JA en el eje Y. Por lo cual podemos afirmar que las hormonas SA y ABA tienen un efecto predominante en la dispersión sobre el eje X independientemente de las familias, mientras que JA tiene un efecto importante en la dispersión sobre el eje Y independientemente de las familias. El análisis de los dos primeros componentes representa el 72% de la variabilidad total, la cual está dada por hormonas.

Para identificar un perfil hormonal que permita discriminar entre las familias que forman parte del grupo sensibles y tolerantes, se realizó el análisis discriminante lineal (AD) con el fin de reducir la dimensionalidad y maximizar la variabilidad entre las categorías de interés (familias extremas/respuesta al estrés). De esta manera se pueden observar agrupamientos que surgen de la combinación de las variables analizadas por familias extremas en relación con su respuesta al estrés hídrico. En este análisis (Fig. 18) observamos que para un $p > 0,05$ no hay diferencias marcadas entre las familias sensibles (azules) y las familias tolerantes (rojas), la mayoría de las familias se solapan por lo cual no se aprecia una clara separación, a excepción de dos familias tolerantes (T19 y T31) que se muestran claramente discriminadas.

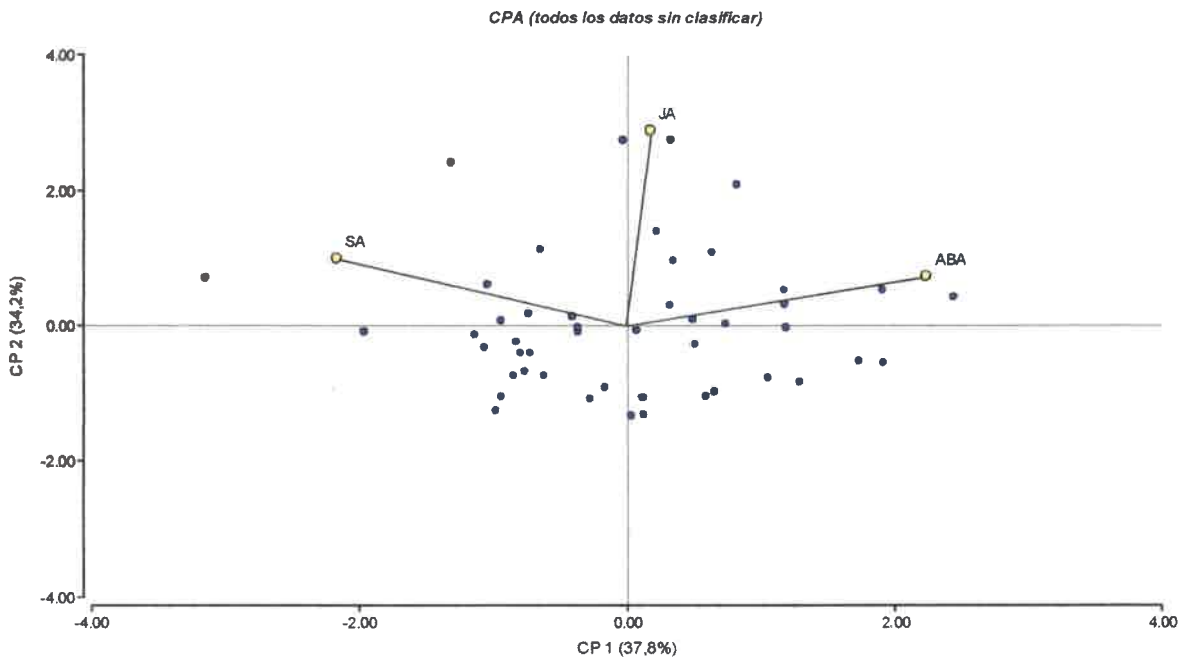


Fig.17. Análisis de componentes principales de las familias $F_{2:3}$ extremas (sensibles y tolerantes) con un $n=4$.

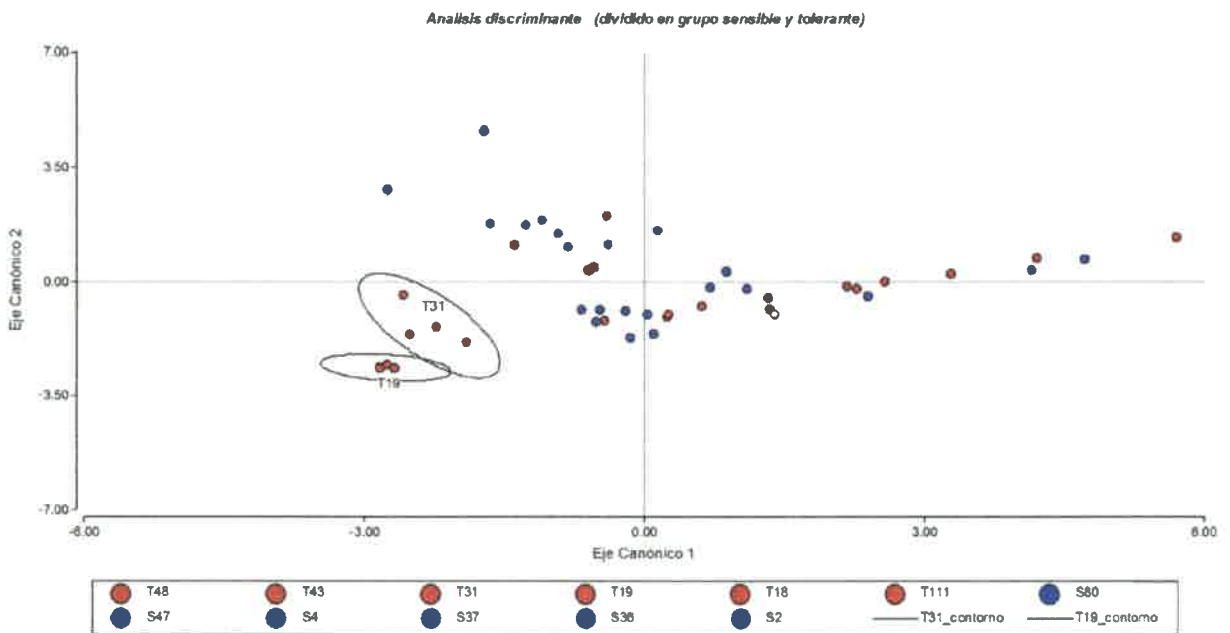


Fig.18. Análisis discriminante lineal entre familias tolerantes (T) y sensibles (S) con un $n=4$ con un $p>0,05$.

4-SECCIÓN D.

Evaluación de la expresión génica de las líneas parentales B59 y B71

4.D1-Cambios en la expresión de genes relacionados a la vía de síntesis de ABA, JA y SA en el contraste Manitol vs Control, en parte aérea y radical, para ambas líneas B59 sensible y B71 tolerante

Para determinar los genes relacionados a las vías de las hormonas (ABA, JA, y SA) que presentaron una expresión diferencial a estrés hídrico se utilizaron 2 estrategias. La primera se basó en la búsqueda de genes de girasol que intervienen en la vía de síntesis de las hormonas y que presenten similitud a genes de Arabidopsis y vid. Las secuencias de los RNAm de los genes que codifican para las proteínas de las vías de síntesis de las hormonas fueron obtenidas de la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information). A partir de esas secuencias se identificaron los unigenes Hean y sus sondas (CUST) representadas en la micromatriz de oligonucleótidos de girasol en plataforma Agilent (Fernandez y col., 2012b), disponibles en la base de datos de girasol Sunflower Unigene Repository (SUR V1.0).

Para garantizar que las sondas seleccionadas pertenecen a genes inducidos por estrés, se consideraron aquellas que presentaron un p-valor menor a 0,05 y un $\text{Log}_2 \text{FCt} < -1$ o $\text{log}_2 \text{FCt} > 1$, en el contraste manitol vs control.

La segunda estrategia que utilizamos fue el uso del programa Mapman, una herramienta bioinformática muy útil para analizar e interpretar gran volumen de datos cuantitativos de ensayos transcripcionales y metabólicos. Los resultados obtenidos del programa Mapman referidos a las hormonas (ABA, JA y SA) fueron asociados a imágenes adecuadas de estas vías, de manera de obtener esquemas que permitan apreciar como el estrés hídrico influyó en el nivel de expresión. En estos análisis se consideró la tasa de cambio en escala logarítmica (log_2), donde cada símbolo cuadrado corresponde a un gen.

Según lo analizado, en la parte aérea de la línea B59 se observó un aumento de la expresión en genes que corresponderían a las enzimas de la familia ZEP, a la familia de enzimas de SDR (Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta) y a la isoforma SDR₄ y a la enzima UTG1 (ABA glucosil-transferasa). Además se obtuvo una disminución de la expresión en genes que codificarían para AAO₃, ABA8-OH y UTG71B6 (ABA glucosil transferasa 76B1) en condiciones de estrés (Fig. 19). En la parte radical de la línea sensible, se obtuvo un aumento de la expresión en genes de la familia ZEP, de la

isoforma SDR y UGT1 y una disminución de la expresión en genes relacionados a la familia SDR₄ en condición de estrés.

Para la línea B71, en la parte aérea se observó un aumento de la expresión en genes que presentaron similitud a la familia ZEP, isoforma SDR₄ y a la familia SDR y una disminución de los que corresponderían a ABA-8OH en la condición estrés. A su vez, en la parte radical, se destacó un aumento en la expresión de genes con similitud a ZEP, NCED₁ y NCED₄ y UGT1.

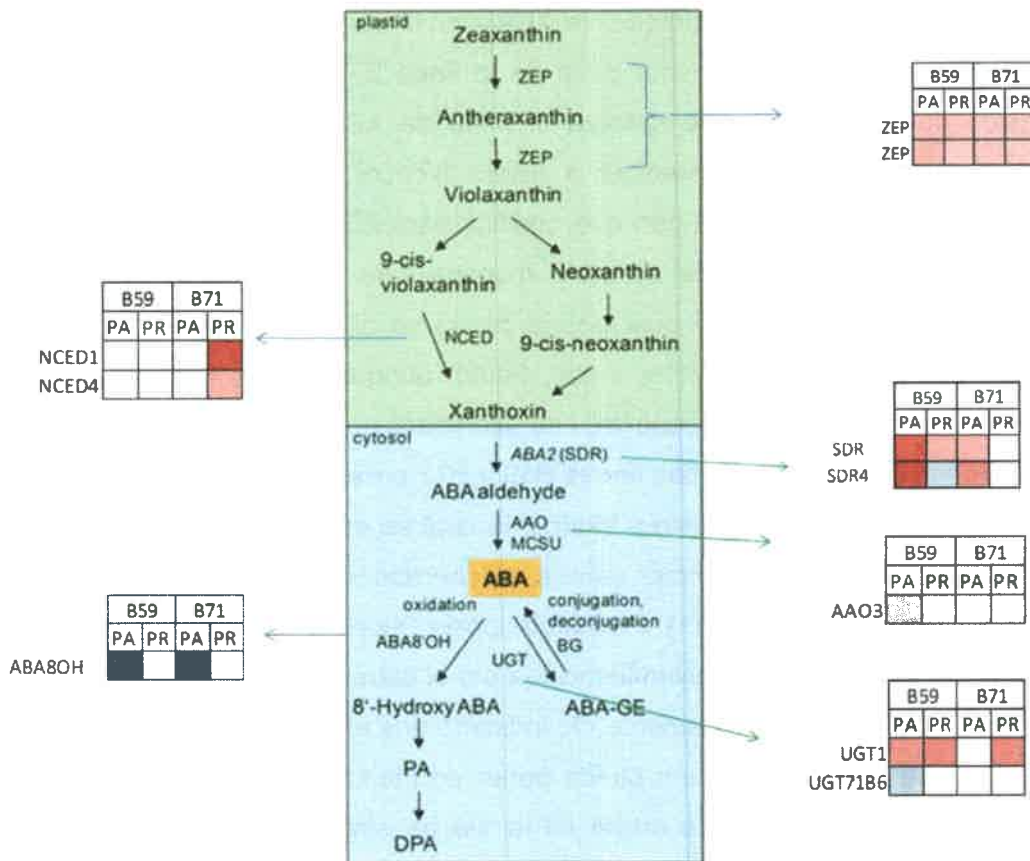


Fig.19. Respuesta transcriptómica diferencial de genes pertenecientes a enzimas que forman parte de la vía de síntesis de ABA. B59 (línea sensible), B71 (línea tolerante). PA: parte aérea, PR: parte radical. Escala de colores; Rojo: aumento de expresión, Blanco: sin cambio en la expresión, Azul: disminución de la expresión en condiciones de estrés hídrico (Modificado de Seiler y col., 2011).

Observando los resultados obtenidos para la vía de metabolismo de ABA vemos un aumento en los niveles de expresión de los genes involucrados en la síntesis de la hormona, con lo cual podríamos pensar en un aumento de la actividad de esta vía en ambos órganos y ambas líneas en condiciones de estrés hídrico. Además observamos

claramente una menor actividad de la principal vía de catabolismo de ABA, catalizada por ABA-8OH, responsable de regular la biodisponibilidad de ABA en el tejido y de mantener la homeostasis (Zhu y col., 2009; Seiler y col., 2011) en la parte aérea de ambas líneas en condiciones de estrés. La otra vía catabólica por la cual ABA es conjugado con glucosa formando ABA-GE (Dong y col., 2014; Liu y col., 2015), forma de almacenamiento de ABA o de transporte (Sauter y col., 2002; Jiang y Hartung 2008), se observa aumentada principalmente en la parte radical de ambas líneas.

Al analizar los resultados obtenidos de manera puntual, podríamos pensar en una menor actividad de la vía de síntesis de ABA a nivel transcripcional, en la parte aérea de la línea B59 respecto a la misma parte de la línea B71 debido a una reducción de la expresión del gen AAO_3 , que cataliza el paso de ABA aldehído a ABA, cuando las plántulas se encontraron expuestas a estrés hídrico, a pesar que la línea sensible presenta mayor expresión del gen que codifica para ZEP. A su vez, a nivel de las vías catabólicas del ABA, la línea sensible muestra una mayor expresión de UTG1 en condiciones de estrés con lo cual podría pensarse que parte del ABA sintetizado es transformado en ABA-GE (Sauter y col., 2002), aunque el gen que codifica para ABA glucosil transferasa 71B6 se encuentre sub-expresado.

En la parte radical, ambas líneas B59 y B71 presentaron una mayor expresión del gen ZEP en condiciones de estrés hídrico, lo cual se encuentra en concordancia con lo observado en raíz de trigo emmer salvaje en condiciones de sequía por Krugman y col. (2011), en trigo (Ji y col., 2011) y en *Arabidopsis* (Xiong y col., 2002), indicando que la expresión de este gen está muy influenciada por el estrés hídrico. Sin embargo, un mayor nivel de expresión de ZEP solamente, no indicaría una mayor actividad en la vía, teniendo en cuenta que este gen también puede poner en marcha otras vías metabólicas, ello a partir de encontrarse corriente arriba en la vía de síntesis. Aunque el aumento de la expresión de genes relacionados a $NCED_4$ y CCD_1 en la línea tolerante y a la isoforma SDR_4 , en la línea sensible, acompañado con un aumento de la expresión de genes que codifican para la enzima UTG1 en ambas líneas, sugieren una mayor actividad de la vía metabólica de ABA bajo la condición de estrés en la parte radical.

Analizando la respuesta mediante el programa Mapman perteneciente a los genes de las enzimas participantes en la vía de síntesis de JA se obtuvieron los resultados representados en la figura 20. En la línea B59 en la parte aérea, se observó un aumento

de la expresión de genes de algunos miembros de la familia 13-LOX (LOX₂ y LOX₃), HPL₁ (hidroperóxido liasa), OPR₁ y OPR₃ y AtST2a (sulfotransferasa 2a) en condición de estrés. Los niveles de expresión de la línea B59 en la parte radical, mostraron un aumento de la expresión de los genes que codifican para las isoformas LOX₃ y LOX₅, HPL₁ y para dos miembros de la familia OPR (OPR₁ y OPR₂) y un menor nivel de expresión para el gen que codifica a LOX₂ en condición de estrés.

La línea B71 en la parte aérea presentó mayores niveles de expresión para los genes que codifican para enzimas LOX₃ y HPL₁ y un menor nivel de expresión de LOX₂. En la parte radical de esta línea se observó un aumento en el nivel de expresión de los genes correspondiente a las enzimas LOX y LOX₂ y OPR₁ y OPR₂, acompañado por una disminución de la expresión del gen que codifica para AOS en condición de estrés.

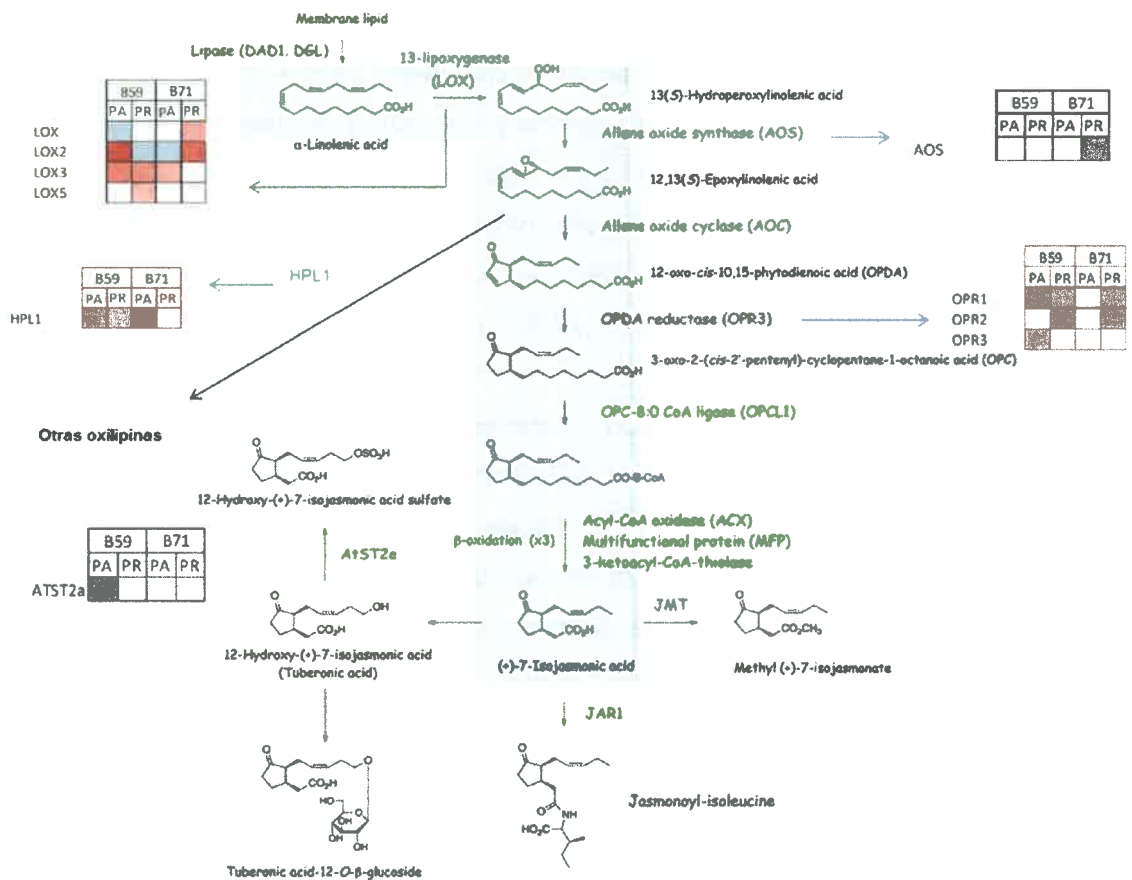


Fig.20. Respuesta transcriptómica diferencial de genes pertenecientes a enzimas que forman parte de la vía de síntesis de JA (área sombreada) y algunas vías de catabolismo. B59 (línea sensible), B71 (línea tolerante). PA: parte aérea, PR: parte radical. Escala de colores; Rojo: aumento de expresión, Blanco: sin cambio en la expresión, Azul: disminución de la expresión en condiciones de estrés hídrico.

Analizando la expresión de los genes que codifican para las enzimas de la vía de síntesis de JA en condiciones de estrés hídrico podemos mencionar un aumento de la expresión de los genes de las familias 13-LOX y OPR, en la línea sensible. A su vez, en la parte aérea de la línea B71 se observaron mayores niveles de expresión de genes de la familia 13-LOX, además de un aumento en la expresión del gen que codifica a la enzima HPL1 en parte aérea de ambas líneas. Al comparar ambas líneas en condiciones de estrés se podría esperar una mayor producción de JA en parte aérea de la línea sensible, debido a una mayor expresión en genes de las enzimas OPR1 y OPR3 que catalizan el pasaje de OPDA a JA que sería fundamental en el control de la síntesis de JA, debido a que mutaciones en genes de esta familia reducen drásticamente la producción de JA (Yan y col., 2012). A su vez un aumento en la expresión de AtST2a, que codifica para una sulfotransferasa que actúa específicamente en 11OHJA y 12OHJA generando 12-HSO₄-JA, podría disminuir la concentración de JA a partir de que se hipotetiza que tal vía regula la concentración de JA en planta (Gidda y col., 2003). En parte aérea de la línea tolerante por su parte, podría suponerse que la falta de expresión diferencial en el paso catalizado por OPR podría deberse a que parte del OPDA generado es utilizado como compuesto activo (con actividad biológica). Savchenko y col. (2014) observaron que elevados niveles de OPDA actuando solo o con ABA, promueven el cierre estomático, aumentando tolerancia a sequía.

Ambas líneas presentaron un aumento de la expresión del gen de la enzima HPL₁, involucrada en la producción de oxilipinas volátiles y no-volátiles, siendo esta una vía alternativa a la de JA dentro del grupo de las oxilipinas (Andreou y col., 2009; Santino y col., 2010), con lo cual se podría esperar una disminución en la vía de síntesis de JA en parte aérea de la línea tolerante, debido a no presentar aumento en la expresión de genes que se encuentren corriente abajo de AOS.

Al comparar los resultados obtenidos en la parte radical de ambas líneas en condiciones de estrés, observamos una coincidencia en el aumento de expresión de genes pertenecientes a la familia 13-LOX y OPR con lo cual se podría pensar en una mayor actividad de la vía de síntesis de JA, principalmente para la línea B71 debido que la línea B59 a su vez presenta un aumento en la expresión de HPL₁. Por lo tanto, la concentración de JA en la parte radical de la línea sensible dependerá de la competencia por el sustrato común que tienen ambas vías (Tong y col., 2012).

Analizando la figura 21 en la que están representados los genes de girasol que presentaron similitud con los genes de las enzimas participantes en la vía de síntesis de SA, se obtuvieron los siguientes resultados: en la parte aérea de la línea B59, se observó un incremento en la expresión de genes que presentaron similitud con genes que codifican para Corismato mutasa (CM), PAL₁ y las metil transferasas At4g36470, NAMT₁, metiltransferasa de la familia SABATH (BSMT₁), y metil esterasa 1 (MES₁) y una disminución en la expresión de genes de la familia de MES. En parte radical de esta línea, encontramos una mayor expresión en genes que codificarían para las siguientes enzimas NAMT₁, BSMT₁ y MES₁.

Un aumento en la expresión de los genes que presentaron similitud a genes que codifican a las siguientes enzimas CM, PAL, At4g36470, NAMT₁, BSMT₁, MES₁ y una disminución de la expresión en genes de MES9 y de la familia MES fueron encontrados en la parte aérea de la línea B71 en condiciones de estrés. En la parte radical de la línea tolerante expuesta a condiciones de estrés se observó un aumento en los niveles de expresión de genes que codificarían para NAMT₁ y BSMT₁ y una disminución de la expresión para un gen relacionado a la familia de enzimas MES.

Analizando la expresión de los genes que codifican para las enzimas de la vía de síntesis de SA en la parte aérea de ambas líneas observamos que la condición de estrés aumenta la actividad a nivel transcripcional de la vía de síntesis denominada PAL o camino de fenilalanina debido al aumento de expresión de CM y PAL (Wildemuth y col., 2001; Dempsey y col., 2011). Además se observó una mayor actividad en una de las vía de conjugación de SA dada por un aumento de la expresión de genes que codificarían metiltransferasas, sistema que desarrollaron las plantas para controlar la toxicidad por alta concentraciones de SA (Vlot y col., 2009). A su vez se sabe que MeSA es volátil y sería la señal móvil que viaja por floema y activaría SAR en estrés abiótico (Park y col., 2007). Un aumento de expresión de BSMT1 en hojas de *Arabidopsis*, en respuesta a estrés biótico y abiótico fue observado por Song y col. (2009) y Liu y col. (2011) con lo cual se observa que un aumento de MeSA estaría implicado en la señalización de ambos tipos de estreses. Por último, el mayor nivel de expresión de genes que codificaría a MES1, parecería contradictorio con los niveles de AT4G36470, NAMT1 y BSMT1, ya que la metil esterasa 1 cataliza el paso de desmetilación del MeSA, para obtener SA (Dempsey y col., 2011), pero como observó Jung y col. (2009), para que se pueda desarrollar SAR debería haber un balance entre SA, MeSA y compuestos adicionales. Con lo cual el aumento de

expresión de MES1 podría deberse a la necesidad de mantener ese balance. Además, al MeSA también se lo vincula con la regulación en el cross-talk entre el camino de señalización de SA y JA (Robert-Seilaniantz y col., 2011).

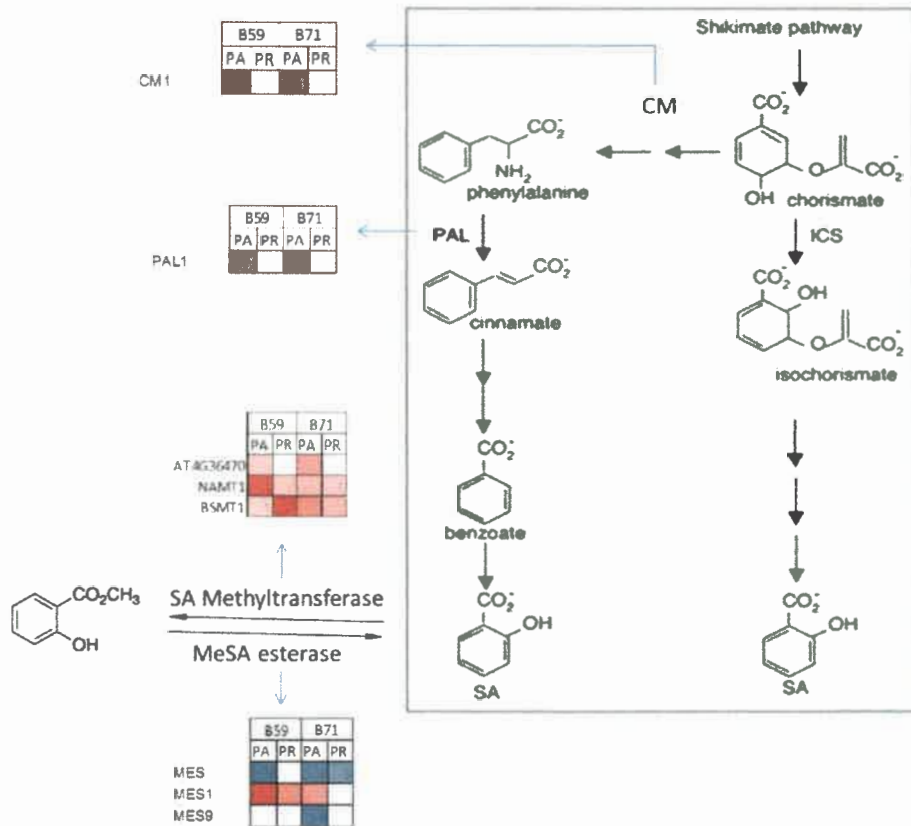


Fig.21. Respuesta transcriptómica diferencial de genes que codifican para enzimas que forman parte de la vía de síntesis de SA. B59 (línea sensible), B71 (línea tolerante). PA: parte aérea, PR: parte radical. Escala de colores; Rojo: aumento de expresión, Blanco: sin cambio en la expresión, Azul: disminución de la expresión en condiciones de estrés hídrico (Modificado de Chen y col., 2009).

En la parte radical de plantas expuestas a estrés hídrico observamos mayor expresión en genes que codificarían a NAMT₁, BSMT₁ y MES₁, en el caso de la línea sensible. A su vez la línea tolerante presentó un aumento en los niveles de expresión de NAMT₁ y BSMT₁ y una disminución de expresión en un gen relacionado a la familia de enzimas MES.

En síntesis, estos resultados pondrían en evidencia que el estrés no activaría la vía de síntesis de SA a nivel transcripcional en la parte radical, siendo las únicas enzimas que presentaron modificaciones en la expresión las que están relacionadas al proceso de

metilación/desmetilación. En la línea tolerante se aprecia una mayor actividad a nivel de expresión del paso de metilación debido a que la expresión de los genes encargados de la desmetilación no se ve afectada por el estrés. Por otra parte, en la línea sensible, se observó un aumento de los dos procesos, lo cual le permitiría a la planta regular el balance SA/MeSA.

4.D2-Análisis integrador de la expresión de genes relacionados a la vía metabólica de ABA, JA y SA en líneas parentales B59 y B71 expuestas a condiciones de estrés hídrico y las concentraciones hormonales endógenas

Con los resultados obtenidos de niveles endógenos de ABA, JA y SA, junto al nivel de expresión de genes de la vía de síntesis de las mismas se pretende ampliar las bases del conocimiento que permitan dilucidar la participación de las hormonas en la tolerancia al estrés hídrico.

Analizando los resultados referidos a ABA, obtenidos en parte aérea de las líneas B59 y B71 (Fig.19), se observó que en general ambas líneas presentan una sobre-expresión de genes de la biosíntesis (ZEP, SDR y SDR4) y una sub-expresión en ABA8OH que codificaría para la enzima encargada de catalizar la principal vía catabólica irreversible. Con estos resultados transcriptómicos, era de esperar que la concentración de ABA en la parte aérea en ambas líneas fuera superior en condiciones de estrés respecto a la condición control, lo cual fue corroborado por el incremento en los niveles endógenos de ABA según lo observado en la figura 14, aunque solo en la línea tolerante tal cambio se mostró estadísticamente significativo. Una posible respuesta a la diferencia del comportamiento entre la línea tolerante y la sensible, en parte aérea, podría estar dada por la sub-expresión de AAO3, enzima que cataliza el paso de ABA aldehído a ABA y/o una sobre-expresión del gen UGT1, que codifica para la enzima que cataliza la vía de conjugación formando ABA-GE, en la línea sensible.

En la parte radical de la línea B59 detectamos genes de la vía de síntesis de ABA, sobre-expresados como ZEP y SDR (Fig. 19), a partir de lo cual se esperaría un aumento de la concentración de ABA en este órgano en condiciones de estrés, lo cual fue confirmado con los incrementos, aunque no significativos, en los niveles de ABA cuantificados en forma endógena (Fig. 14). La parte radical de la línea B71 presentó sobre-expresión de ZEP, NCED1 y NCED4 (Fig.19) pero no presenta cambios en el nivel de expresión de otro gen que participe en los pasos que ocurren en el citosol, con lo que

es posible esperar un menor incremento de ABA que el observado en línea B59. Por otra parte, ambas líneas presentan sobre expresión de UTG1 (Fig. 19), que contribuiría para que ocurra una reducción en la concentración de ABA libre formando ABA-GE, el cual puede almacenarse o bien ser transportado por xilema hasta la parte aérea y ser deconjugado. Además, el nivel de expresión de UTG1 podría ser responsable del mínimo cambio observado en el nivel endógeno de ABA en la parte radical de ambas líneas, bajo condiciones de estrés (Fig.14).

El paso de deconjugación de ABA-GE que aumentaría la concentración de ABA en la parte aérea, no fue posible evaluarlo debido a que en la base de datos de transcritos con alta similitud a *Arabidopsis*, con la cual trabajamos, no se contaba con ninguna beta-glucosidasa específica para ABA. A partir de ello se hipotetiza que una de las fuentes de ABA en la parte aérea de ambas líneas podría provenir del ABA sintetizado en raíces.

Analizando los niveles de expresión de genes de la biosíntesis de JAs obtenidos en la parte aérea de las líneas B59 y B71 en condiciones de estrés hídrico (Fig. 20), se observa que la línea sensible presenta una sobre-expresión de genes LOX (2 y 3) y genes OPR (1 y 3), lo cual podría implicar que tal línea incrementaría los niveles de JA en respuesta a estrés respecto a la condición control. Sin embargo, se observa una disminución, aunque no significativa, en el nivel de la hormona (Fig.15) que podría deberse a la sobre-expresión de *AtST2a*, que codifica para una sulfotransferasa asociada a una posible vía catabólica de regulación del nivel de JA endógeno y podría generar una reducción en la concentración de esta hormona. Otra explicación posible, es que algunos genes que presentan mayor expresión en condiciones de estrés (LOX 2 y 3 y OPR1 y 3) estén sufriendo una regulación post- transcripcional.

Por su parte, en la parte aérea de la línea tolerante, se observa sobre-expresión únicamente de LOX3 enzima de los primeros pasos de la vía de síntesis. Además se observaron mayores niveles de expresión de la HPL1, con lo cual sería esperable un menor aumento en la concentración de JA en esta línea en comparación con B59, como respuesta a la condición de estrés. Los resultados de las determinaciones del contenido endógeno de JA en la parte aérea de la línea tolerante (Fig. 15), mostraron un incremento significativo cuando las plántulas se encontraron en condición de estrés, lo cual no concuerda con lo esperado, a partir de lo cual se plantea que tal incremento de JA podría deberse a la existencia del catabolismo de las formas conjugadas de JA, aunque esta

alternativa no se encuentra aún confirmada. Además al no observarse cambios significativos en el nivel de expresión de OPR, se esperaría una acumulación de OPDA, el cual podría cumplir alguna función biológica en la respuesta a estrés, por ejemplo en la apertura estomática (Kazzan, 2015).

En la parte radical de ambas líneas expuestas a condiciones de estrés hídrico, observamos un incremento del nivel de expresión en 2 familias de genes que codificarían a las enzimas LOX y OPR (Fig. 20). Estos niveles de expresión génica de LOXs y OPRs implicarían una mayor actividad de la vía de síntesis de JA, lo cual no se tradujo en un incremento significativo en la concentración de JA en condición de estrés respecto a la condición control (Fig. 15). Esto podría deberse a que la isoforma OPR3, citada por su actividad en *Arabidopsis* por Santino y col., (2013) y Savchenko y col., (2014), en la parte radical no mostró expresión diferencial para la condición de estrés ó por incrementos en la actividad de vías de conjugación de JA, como ser formación de JA-Ile, JAME entre otros (Wasternack y Kombrink, 2010; Wasternack y Hause, 2013).

Respecto a la relación entre el nivel de expresión de la vía de síntesis y el contenido endógeno de SA podemos mencionar que en la parte aérea de ambas líneas expuestas a condiciones de estrés, en general se observa el mismo patrón de expresión de varios genes de la vía de PAL como son CM1, PAL1 (Fig. 21). La sobre-expresión de estos genes se correspondió con un incremento en el contenido endógeno de SA cuando ambas líneas (B71 y B59) fueron sometidas a estrés hídrico (Fig. 16).

En la parte radical de ambas líneas no se observaron cambios a nivel de expresión en genes que codifiquen para enzimas de la vía de síntesis de SA (Fig. 21), lo cual podría explicar la poca variación en el contenido endógeno de SA cuando las plántulas fueron sometidas a estrés hídrico (Fig. 16).

4.D2.1-Cambios de expresión de genes que codifican para Factores de transcripción en respuesta de estrés hídrico

Las hormonas vegetales median la respuesta a los efectores bióticos o abióticos a través de proteínas conocidas como factores de transcripción (FTs), que poseen la característica de unirse al ADN y regular la expresión de cascadas de genes involucrados en tal respuesta. Como forma de dilucidar esta acción se analizan los resultados obtenidos en el nivel de expresión de FTs y genes de respuestas relacionados a ABA, JA y SA.

Observando los resultados de la figura 22 para los FTs relacionados a las tres hormonas antes mencionadas, podemos realizar cuatro agrupaciones. Entre los FTs relacionados a ABA encontramos que tanto ABF3 como ABF4 mostraron el mismo patrón de respuesta a estrés hídrico exhibiendo un mayor nivel de expresión en la parte aérea de ambas líneas en condiciones de estrés hídrico. Además se incrementó la expresión, en la parte aérea de ambas líneas, de los genes HVA22 y HVA22E los cuales codifican para dos proteínas LEA.

Entre los FTs relacionados a JA y ABA que mostraron una expresión génica diferencial al estrés hídrico encontramos a MYC2, que presentó un mayor nivel de expresión en la parte aérea y disminución en la parte radical de la línea tolerante, no mostrando cambio de actividad en la línea sensible. Además se detectaron tres miembros de la familia NAC, entre los que podemos mencionar el ANAC019 y ANAC055, que mostraron una disminución de la expresión en parte aérea en la línea sensible, mientras que en la línea tolerante el ANAC019 mostró mayor nivel de expresión en ambos órganos de la plántula, y el ANAC055 un incremento de la expresión solo en la parte radical.

Otro de los miembros de la familia NAC que encontramos en girasol fue el gen RD26, que presentó un aumento en la expresión en parte radical de ambas líneas, siendo mayor la expresión en la línea tolerante. Además encontramos dos genes de respuesta a estrés relacionados a MYC2 como son el RD20 y el RD22, los cuales presentaron un mayor nivel de expresión en parte aérea de la línea tolerante. RD20 también presentó una menor expresión en parte radical de la línea B59.

Un tercer grupo de FTs que mostraron respuesta diferencial significativa ante condiciones de estrés hídrico y que están relacionados al "cross-talk" entre JA y SA está constituido por los WRKY11, WRKY17 y MYB44 que presentaron una disminución de expresión génica en la parte aérea de la línea B59. Otro FT que presentó un aumento de la expresión en parte aérea de la línea sensible y en ambos órganos de la línea tolerante fue el WRKY70.

ATAF1, FT miembro de la familia NAC, constituye el cuarto grupo de FTs que mostraron respuesta ante el estrés hídrico, el cual es influenciado tanto por ABA, JAs y SA y no solo actuaría en este estrés abiótico sino también en condiciones de estrés biótico (Wu y col., 2009). ATAF1 mostró, en nuestros experimentos de estrés hídrico, mayor expresión en parte radical de la línea sensible (B59).

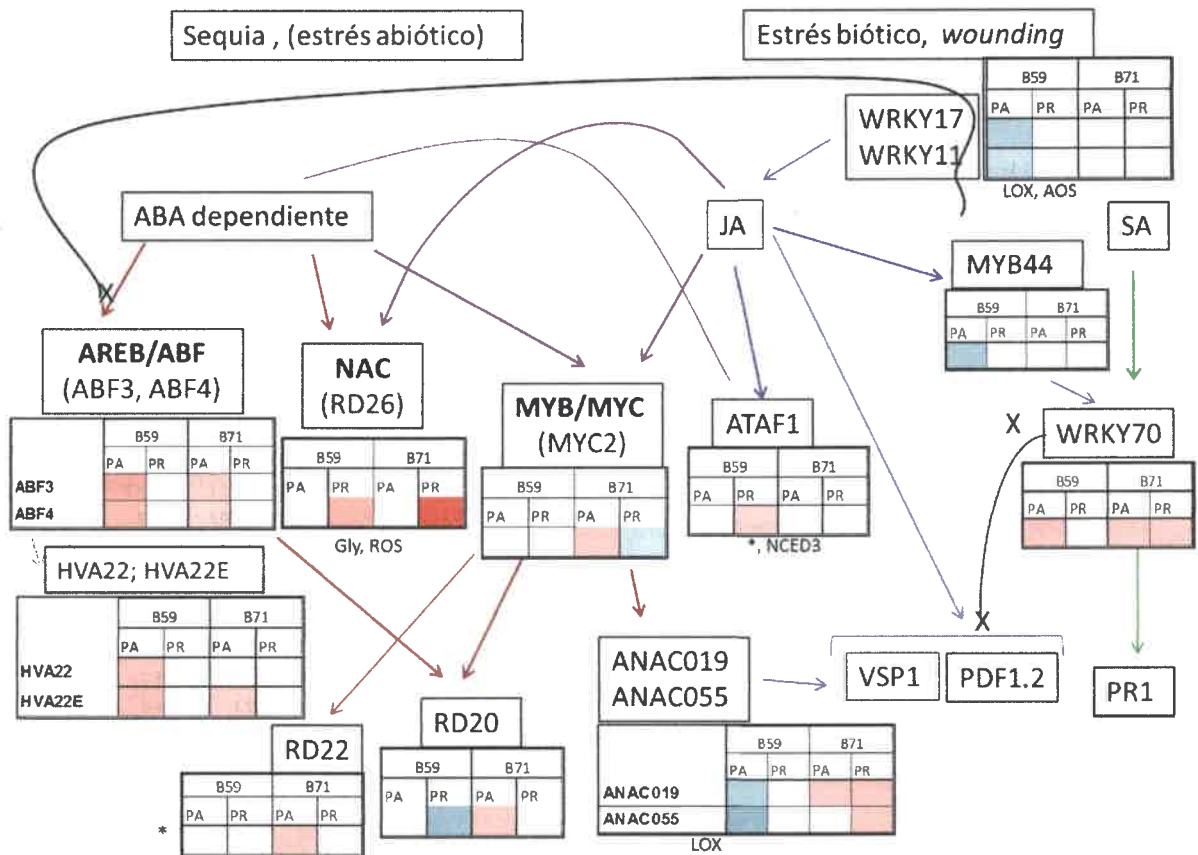


Fig.22. Diagrama que muestra la respuesta transcriptómica diferencial de genes pertenecientes a FTs B59 (línea sensible), B71 (línea tolerante). PA: parte aérea, PR: parte radical. Escala de colores; Rojo: aumento de expresión, Blanco: sin cambio en la expresión, Azul: disminución de la expresión en condiciones de estrés hídrico

En parte aérea de la línea B59 observamos un aumento de la expresión de ABF3 y ABF4, FTs de la familia bZIP, perteneciente a una de las vías de señalización dependiente de ABA (AREB/ABF). Los FTs AREB1/ABF2, AREB2 /ABF4 y ABF3 son inducidos en deshidratación, alta salinidad y tratamientos de ABA (Fujita y col., 2005). En plantas transgénicas que se sobre-expresaron estos FTs mostraron una mayor tolerancia a sequía (Kang y col., 2002; Kim y col., 2004; Fujita y col., 2005). Además, Kang y col. (2002) observaron hipersensibilidad de ABA, reducción de la tasa de transpiración en plantas de *Arabidopsis* transgénicas que sobre-expresaban ABF3 y ABF4.

Además, observamos un incremento de la expresión en genes que codificarían para dos proteínas LEA (HVA22 y HVA22E), que concuerda con lo informado en hojas de cebada como de *Arabidopsis* cuando las plantas fueron colocadas en sequía, frío y estrés

salino ó inducidas por ABA exógeno (Shen y col., 1993, 2001; Chen y col., 2002). Tales genes estarían regulados por la acción de los FTs de la familia ABF (Shen y col., 1996).

MYB44 es otro de los FT que presentó una disminución en la expresión diferencial en parte aérea de la línea sensible cuando fue expuesta a estrés hídrico. Esa respuesta podría ser importante, atendiendo a que Jung y col., (2008) observaron que plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresaban MYB44 presentaron aumento de la tolerancia a estrés abiótico. Si bien en estrés abiótico aún no se ha relacionado este FT con el "cross-talk" entre JA y SA, en estrés biótico hay evidencias que MYB44 regularía positivamente la señalización de SA y negativamente la señalización de JA, modificando positivamente la expresión de WRKY70 (Li y col., 2004). En estrés osmótico WRKY70 regularía los primeros momentos del cierre estomático, permaneciendo los estomas abiertos cuando este FT esta sobre-expresado (Li y col., 2013). El aumento en la expresión de WRKY70 coincide con la disminución de la expresión de 2 FTs (WRKY 17 y 11) que lo regulan corriente arriba de manera negativa. Journot-Catalino y col. (2006) observaron que al aumentar la expresión de WRKY17 y 11, aumentaba la expresión de los genes de la biosíntesis de JA, LOX2 y AOS y disminuía la expresión de WRKY70 bajo estrés biótico.

En la parte radical de la línea sensible, observamos un incremento en la expresión de AtAF1 y RD26, FTs de la familia de las NAC, que se ha demostrado que presentan respuesta a sequía y alta salinidad como también a hormonas como ABA y JA (Lu y col., 2007). En tal sentido, Jensen y col. (2013) observaron que en plantas que sobre-expresaban AtAF1 producía un inducción de la expresión de NCED3 incrementando los niveles endógenos de ABA. Además se observó que plantas que sobre-expresaron AtAF1 mostraron una mayor tolerancia a sequía (Wu y col., 2009). Por otra parte, RD26 no activaría genes típicos de la respuesta de ABA como ser LEA, RD, ERD sino que estaría relacionado con la activación de genes GLY que codifican para una proteína glioxalasa I encargada de la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (Fujita y col., 2004).

Cuando se analizó el comportamiento de la parte aérea de la línea tolerante B71, se observó un incremento de la expresión de los FTs ABF3 y ABF4 y del gen de respuesta a estrés hídrico HVA22E, indicando que la vía de señalización dependiente de ABA estaría activa en esta línea.

Además se observó un incremento en la expresión de MYC2, FT maestro que interactúa entre ABA, JA y SA. MYC2 es un gen de respuesta a ABA y sequía y varios

reportes han mostrado su rol en la señalización de ABA (Abe y col., 2003; Lorenzo y col., 2004). Además, se ha observado que MYC2 es capaz de activar la expresión de RD22 (respuesta a desecación 22), gen de respuesta a ABA, sugiriendo que MYC2 es un regulador positivo de la señalización de ABA (Abe y col., 2003). Un incremento en la expresión de RD22 también fue observado en nuestros resultados indicando que esta vía de respuesta a estrés está activa en parte aérea de la línea B71. Otro gen de respuesta que parecería tener su expresión regulada por MYC2 y que presentó un aumento en la expresión en nuestro trabajo fue RD20, debido que la región promotora de RD20 muestra un enriquecimiento significativo en sitios de unión a MYC2 (Abe y col., 2003). El nivel de expresión de RD20 se vio aumentado por ABA, deshidratación y estrés osmótico mediante experimentos con *microarray* y *Northern blot* (Takahashi y col., 2000, Seki y col., 2001). A su vez, RD20 participa en los mecanismos de tolerancia a la sequía a través de la regulación de la apertura de los estomas, crecimiento de la planta y uso eficiente del agua (Aubert y col., 2010).

Como se había mencionado anteriormente, MYC2 regula el “cross-talk” entre los caminos de señalización de ABA y JA. Corriente abajo de MYC2 actúan 2 FTs de la familia NAC, ANAC019 y ANAC055 (Tran y col., 2004; Jiang y col., 2009) que son inducidos tanto por ABA como por JA (Winter y col., 2007; Bu y col., 2008). En la parte aérea de B71 se observó un aumento de ANAC019 el cual regularía positivamente a VSP1 el cual participaría en respuesta a insectos (Bu y col., 2008) e interviene en el incremento de tolerancia a la sequía en plantas que sobre-expresan este miembro de la familia NAC (Tran y col., 2004). Por último, fue detectado en esta línea tolerante un incremento en la expresión de WRKY70 no así de WRKY 17 y 11, como fue observado en B59.

En parte radical de la línea tolerante (B71) observamos un importante incremento en la expresión de RD26 con respecto a B59, FT que podría activar una proteína Gly que estaría asociada a la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, dando probablemente una mejor capacidad de respuesta a la planta cuando es colocada en estrés hídrico. Además, encontramos un incremento de la expresión de ANAC019 y ANAC055, FTs que actuaban corriente abajo de MYC2, el cual en parte radical de B71 presentó una disminución de su expresión. Estos dos FTs de la familia NAC están regulados por MYC2, y en plantas mutantes de *Arabidopsis* para el gen *myc2*, se observó un aumento de la expresión de ANAC019 y ANAC055 por aplicación exógena de ABA y

un leve incremento de la expresión de ANAC055 luego de la aplicación de MeJA (Jiang y col., 2009). A partir de ello podemos inferir que ambos FTs inducen su expresión por ABA aumentando la tolerancia a la sequía al incrementar la expresión de un grupo de genes de respuesta a estrés (Tran y col., 2004). Por otra parte en parte radical y aérea de la línea B71 se observó un incremento en la expresión de WRKY70 en concordancia con lo mencionado en parte aérea de B59.

A partir del análisis integrado de los resultados obtenidos en este trabajo respecto a la respuesta diferencial que presenta la línea tolerante en relación a la línea sensible en condiciones de estrés hídrico, se plantea la importancia de la respuesta que podría generar el aumento de ABA y JA que interactúan con MYC2, factor de expresión maestro, que a su vez regula la expresión de cuatro genes de respuesta como son RD22, ANAC019, ANAC055 y RD20 (Fig. 23).

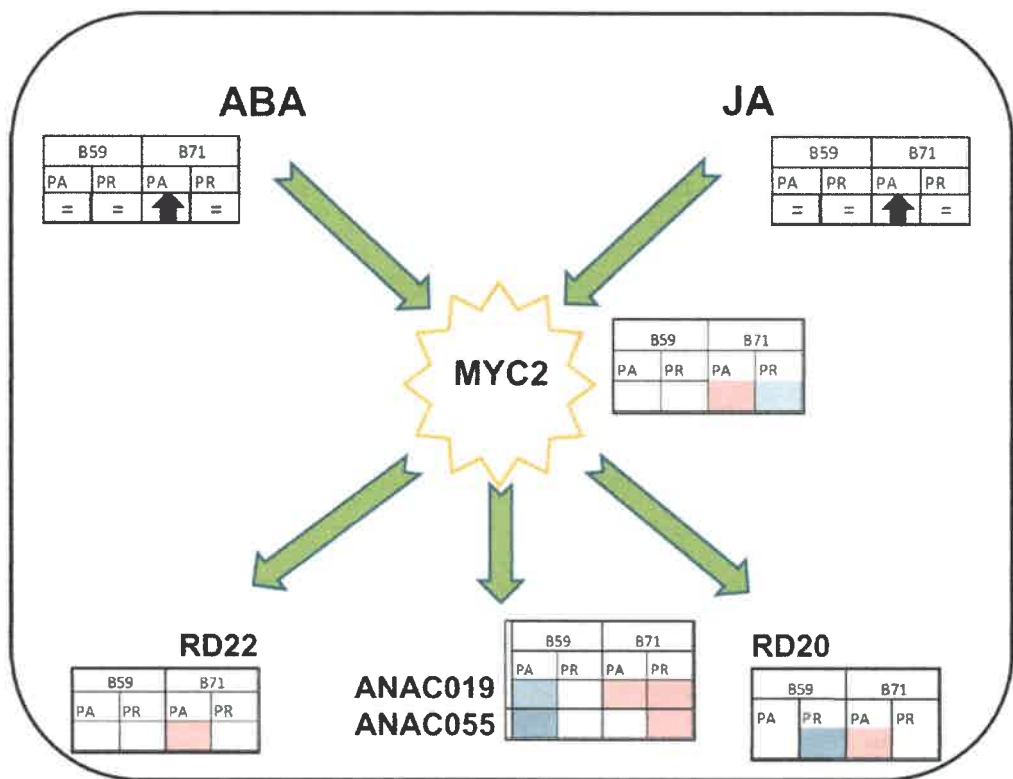


Fig.23. Diagrama que muestra la **relevancia de FT** en la respuesta diferencial a estrés hídrico de B71 (línea tolerante) respecto a B59 (línea sensible). Para conc. de ABA y JA, (=) sin diferencia entre la condición de estrés y control, ↑ Mayor conc. en condición de estrés. Respecto a nivel de expresión, escala de colores; Rojo: aumento de expresión, Blanco: sin cambio en la expresión, Azul: disminución de la expresión en condiciones de estrés hídrico

CAPITULO 5: CONCLUSIONES

Las líneas parentales (B71 y B59) evaluadas a través de marcadores moleculares neutros y funcionales, presentaron un nivel de polimorfismo del 23 % sobre un total de 350 marcadores evaluados, habiéndose identificado 81 marcadores polimórficos útiles para análisis de mapeo génico.

La evaluación fenotípica de familias segregantes ($F_{2,3}$) obtenida del cruzamiento de las líneas endocriadas B71 x B59, mostró que la variable poder germinativo relativo al control (PGR), resulto apropiada para discriminar entre germoplasma sensible y tolerante al estrés hídrico en germinación y crecimiento temprano. Los datos de PGR de las familias evaluadas mostraron una segregación típica de una herencia cuantitativa del carácter tolerancia al estrés hídrico en el estadio fenológico de plántula. A partir de ello, este parámetro validaría la metodología para detectar segregación en este carácter en condiciones de estrés hídrico para una población $F_{2,3}$.

El análisis de *Bulked Segregant Analysis (BSA)* realizado en grupos abiertos, no permitió detectar, para las familias analizadas, asociaciones positivas entre el carácter tolerancia al estrés hídrico, registrado a través del PGR y QTL asociados al carácter en cuestión.

En las líneas parentales los mayores cambios en los niveles hormonales de la parte aérea se observaron en el contenido endógeno de SA el cual fue incrementado en ambas líneas expuestas a estrés hídrico.

Los niveles de ABA y JA solo se incrementaron en la parte aérea de la línea tolerante (B71) expuesta a estrés hídrico.

En familias $F_{2,3}$ se observaron cambios en las concentraciones endógenas de hormonas vegetales cuando los grupos extremos de tales familias fueron sometidas a estrés hídrico. La mayor variabilidad de las familias fue explicada por el contenido de JA, y luego seguido por ABA y SA.

La condición de estrés hídrico generó un aumento de la actividad de la vía de síntesis de ABA respecto a la condición control en parte aérea, evidenciada por un

aumento en la expresión de ZEP y SDR. Además, en la parte aérea de ambas líneas (B59 y B71) se observó una disminución de la principal vía catabólica de ABA, catalizada por ABA-8OH.

Un aumento en la expresión de los genes que codificarían para las enzimas HPL1 y de distintos miembros de la familia LOX y OPR (vía biosintética de JA) fueron observadas en ambas líneas cuando fueron colocadas en condición de estrés hídrico.

La biosíntesis de SA fue activada vía fenilalanina, presentando un aumento en la expresión de los genes PAL y CM en parte aérea de plántulas de girasol de ambas líneas expuestas a estrés hídrico.

En parte aérea de ambas líneas se observó un aumento de expresión de la vía AREB/ABF (ABF3 y ABF4) implicada en la señalización de ABA, en respuesta a las condiciones de estrés hídrico impuesto. Además se observó activación de factores de transcripción WRKY70, tanto en parte aérea de la B59 como en planta entera de B71 y de RD26 en parte radical de ambas líneas, siendo mayor en la línea tolerante. Por otra parte, el mayor nivel de expresión de MYC2 RD22 y RD20 en parte aérea de línea tolerante indicando una respuesta diferencial de este germoplasma frente a un estrés hídrico moderado.

Es interesante destacar en el perfil de expresión diferencial de la línea B71 sometida a condiciones de estrés hídrico, el rol de MYC2 como "*master switch*" de otros factores de transcripción como ANAC019/ANAC055 y genes de respuesta a estrés (RD20, RD22) participando de esta manera en el "cross talk" ABA y JA.

Bibliografía

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63-78.
- Adie B, Perez-Perez J, Perez-Perez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz, EA, Solano R. 2007. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 1665-1681.
- Agarwal P, Reddy MP, Chikara J. 2011. WRKY: its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants. *Mol Biol Rep* 38: 3883-3896.
- Agele SO. 2003. Sunflower responses to weather variations in rainy and dry cropping seasons in a tropical rain forest zone. *Int J Biotronics* 32: 17-33.
- Agricultura. Estadística. Sistema Integrado de Información Agropecuaria. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. 2012. <http://www.minagri.gob.ar/site/index.php>
- Aguirrezábal L, Orioli G, Hernández L, Pereyra V, Mirave J. 2001. Girasol. Aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento. Balcarce (AR). ISBN: 950-9853 71-2.111.
- Ahmad S, Ahmad R, Ashraf M, Waraich A, Waraich E. 2009. Sunflower (*Helianthus annuus L.*) response to drought stress at germination and seedling growth stages. *Pak J Bot* 41: 647-654.
- Albuquerque F, De Carvalho N. 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. 2005. Identification of QTLs for germination and seedling development in sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Plant Sci* 169: 221-227.
- Allison DB, Fernandez JR, Moonseong H, Shankuan Z, Etzel C. 2002. Bias in estimates of quantitative-trait-locus effect in genome scans: demonstration of the phenomenon and a method-of-moments procedure for reducing bias. *Am J Hum Genet* 70: 575-585.
- Alonso-Ramírez A, Rodríguez D, Reyes D, Jiménez J, Nicolás G, López-Climent M, Gómez-Cadenas A, Nicolás C. 2009. Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in Arabidopsis seeds. *Plant Physiol* 150: 1335-1344.
- 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 A, Setter T. 2004. Abscisic acid accumulation and osmotic adjustment in cassava under water deficit. *Env Exp Bot* 51: 259-271.
- Andrade A, Vigliocco A, Alemanno S, Alvarez D, Abdala G. 2009. Differential accumulation of abscisic acid and its catabolites in drought-sensitive and drought-tolerant sunflower seeds. *Seed Sci Res* 19: 201-211.
- Andrade A, Vigliocco A, Alemanno S, Llanes A, Abdala G. 2013. Comparative morpho-biochemical responses of sunflower lines sensitive and tolerant to water stress. *Am J Plant Sci* 4: 156-167.
- Andreani P. 2004. Mercado de Girasol En: El cultivo de Girasol en Siembra Directa. Ed. Gustavo Duarte, Bs. Aires, pp. 16-26.
- Andreou A, Brodhun F, Feussner I. 2009. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog in Lipid Res* 48: 148-170.
- Antoni R, Rodriguez L, Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Rodriguez P. 2011. News on ABA transport, protein degradation, and ABFs/WRKYs in ABA signaling. *Curr Opin Plant Biol* 14: 547-553.
- 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.

- Arumuganathan K, Earle ED. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9: 208-218.
- Ashraf M, Mehmood S. 1990. Response of four *Brassica* species to drought stress. *Environ Expt Bot* 30: 93-100.
- Asins MJ. 2002. Review: Present and of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding* 121: 281-291.
- Assmann SM. 2003. OPEN STOMATA1 opens the door to ABA signalling in *Arabidopsis* guard cells. *Trends Plant Sci* 5: 151-153.
- Aubert Y, Vile D, Pervent M, Aldon D, Ranty B, Simonneau T, Vavasseur A, Galaud J. 2010. RD20, a stress-inducible caleosin, participates in stomatal control, transpiration and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 51(12):1975-1987.
- Bandurska H, Stroinski A. 2005. The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. *Acta Physiol Plant* 27: 379-386.
- Banerjee A, Roychoudhury A. 2015. WRKY Proteins : Signaling and Regulation of Expression during Abiotic Stress Responses. *Scientific World J.* <http://dx.doi.org/10.1155/2015/807560>
- Bannenber 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.
- Bano A, Ullah F, Nosheen A. 2012. Role of abscisic acid and drought stress on the activities of antioxidant enzymes in wheat. *Plant Soil Environ* 58(4): 181-185.
- Barakat M, Al-Doss A, Elshafei A, Moustafa K. 2011. Identification of new microsatellite marker linked to the grain filling rate as indicator for heat tolerance genes in F2 wheat population. *Australian J Crops Sci* 5: 104-110.
- Behnam B, Kikuchi A, Celebi-Toprak F, Yamanaka S, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Watanabe K. 2006. The *Arabidopsis* DREB1A gene driven by the stress-inducible rd29A promoter increases salt-stress tolerance in proportion to its copy number in tetrasomic tetraploid potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Biotech* 23: 169-177.
- Berry T, Bewley JD. 1992. A role for the surrounding fruit tissues in preventing germination of (*Lycopersicon esculentum*) seeds: a consideration of osmotic environment and abscisic acid. *Plant Physiol* 100: 951-957.
- 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.
- Bigo V. 2006. Caracterización de germoplasma de girasol (*Helianthus annuus* L.), en condiciones de estrés hídrico. Tesina para optar al título de Licenciatura en Ciencias Biológicas pp 1-19.
- Boominathan P, Shukla R, Kumar A, Manna D, Negi D, Verma PK, Debasis C. 2004. Long term transcript accumulation during the development of dehydration adaptation in *Cicer arietinum*. *Plant Physiol* 135: 1608-1620.
- Brownstein MJ, Carpten JD, Smith JR. 1996. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotech* 20: 1004-1010.
- Bu Q, Jiang H, Li CB, Zhai Q, Zhang J, Wu X, Sun J, Xie Q, Li C. 2008. Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Res* 18: 756-767.
- Burr B, Burr F. 1991. Recombinant inbred lines for molecular mapping in maize. *Theor Appl Genet* 7: 55-60.
- Capiati D, Muñoz García M. 2011. Utilización de factores de transcripción como herramienta biotecnológica para incrementar la tolerancia a la sequía en plantas. *QuímicaViva* 3: 187-198.

- 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.
- Chakrabortee S, Boschetti C, Walton LJ, Sarkar S, Rubinsztein DC, Tunnacliffe A. 2007. Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. Proc Natl Acad Sci USA 104: 18073-18078.
- Chen C, Chu C, Zentella R, Pan S, Ho T. 2002. AtHVA22 gene family in Arabidopsis: phylogenetic relationship, ABA and stress regulation, and tissue-specific expression. Plant Mol Biol 49: 633-644.
- Chen L, Song Y, Li S, Zhang L, Zou C, Yu D. 2012. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. Biochim Biophys Acta 1819: 120-128.
- Chen Z, Zheng Z, Huang J, Lai Z, Fan B. 2009. Biosynthesis of salicylic acid in plants. Plant Sig Behaviour 4: 493-496.
- Christmann A, Weiler E, Steudle E, Grill E. 2007. A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. Plant J 52: 167-174.
- 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*. Plant J 38: 432-447.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. Euphytica 142: 169-196.
- Cutler A, Krochko J. 1999. Formation and breakdown of ABA. Trends Plants Sci. 4: 472-478.
- Dalma D, Weiszhausz D, Warrington J, Tanimoto E, Miyada CG. 2006. The Affymetrix GenChip Platform: An Overview. In: Kimmel A, Oliver B, eds. Methods Enzymology 410: 3-28.
- Dar T, Uddin M, Masroor M, Khan M, Hakeem K, Jaleel H. 2015. Jasmonates counter plant stress: A Review Environ Exp Bot 115: 49-57.
- De Domenico S, Bonsegna S, Horres R, Pastor V, Taurino M, Poltronieri P, Imtiaz M, Kahl G, Flors V, Winter P, Santino A. 2012. Transcriptomic analysis of oxylipin biosynthesis genes and chemical profiling reveal an early induction of jasmonates in chickpea roots under drought stress. Plant Physiol Bioch 61: 115-122.
- De Ollas C, Hernando B, Arbona V, Gómez-Cadenas A. 2012. Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. Physiol Plant 147: 296-306.
- Dempsey DA, Vloth AC, Wildermuth MC, Klessig DF. 2011. Salicylic acid biosynthesis and metabolism. Am Soc of Plant Biol. The Arabidopsis book. DOI: 10.1199/tab.0156.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- 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.
- Dombrowski JE. 2003. Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants. Plant Physiol 132: 2098-2107.
- Dong T, Xu ZY, Park Y, Kim DH, Lee Y, Hwang I. 2014. Abscisic acid uridine diphosphate glucosyltransferases play a crucial role in abscisic acid homeostasis in Arabidopsis. Plant Physiol 165: 277-289.
- 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-Cádenas A. 2005. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid

- chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 53: 8437-8442.
- El-Kadi D, Afiah S, Aly M, Badran A. 2006. Bulk segregant analysis to develop molecular markers for salt tolerance in Egyptian cotton. *Arab J Biotechnol* 9: 129-142.
- El-Tayeb MA. 2005. Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regul* 45: 215-224.
- Erb M, Glasuser G, Robert C. 2012. Induced immunity against belowground insect herbivores-activation of defences in the absence of a jasmonate burst. *J Chem Ecol* 38: 629-640.
- Fernández C, Alemano S, Vigliocco A, Andrade A, Abdala G. 2012a. Stress hormone levels associated with drought tolerance vs. sensitivity in sunflower (*Helianthus annuus* L.). En: *Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Heidelberg, Berlin (Eds.) Khan N.A. et al. Springerlink. pp 249-276.
- Fernandez P, Di Rienzo JA, Moschen S, Dosio GAA, Aguirrezabal LAN, Hopp HE, Paniego N, Heinz RA. 2011. Comparison of predictive methods and biological validation for qPCR reference genes in sunflower leaf senescence transcript analysis. *Plant Cell Report* 30: 63-74.
- Fernandez P, Soria M, Blesa D, Di Rienzo JA, Moschen S, Peluffo L, Rivarola M, González S, Clavijo B, Principi D. 2012b. Development, characterization and experimental validation of a cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) gene expression oligo microarray. *PlosONE*, 7: 1-11.
- Ferreira A, da Silva M, da Costa e Silva L, Cruz C. 2006. Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genet Mol Biol* 29(1): 187-192.
- fgStatistics. 2009. In: Di Rienzo JA, ed. *Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*.
- Filippi C, Aguirre N, Rivas J, Zubrzycki J, Puebla A, Cordes D, Moreno M, Fusari C, Alvarez D, Heinz R, Hopp E, Paniego N, Lia V. 2015. Population structure and genetic diversity characterization of a sunflower association mapping population using SSR and SNP markers. *BMC Plant Biol* 1-12.
- Fujii H, Verslues P, Zhu J. 2011. Arabidopsis decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108: 1717-1722.
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Tran LS, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2004. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J* 39: 863-876.
- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez M., Seki M, Yamaguchi-Shinozaki K. 2005. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 3470-3488.
- Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, Katagiri T, Kidokoro S, Kanamori N, 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.
- Fujita Y, Yoshida T, Yamaguchi-Shinozaki K. 2013 Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiol Plant* 147: 15-27.
- Gidda S, Miersch O, Levitin A, Schmidt J, Wasternack C, Varin L. 2003. Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 278: 17895-17900.
- Gleco, J. Basigalup, D. Mamani, E. 2011. *Biotecnología aplicada ao melhoramento da alfafa*. En: *Melhoramento genético da alfafa*. Embrapa Pecuária Sudeste. São Paulo-Brasil, cap 10, pp. 261-299.
- Gilmour S, Fowler S, Thomashow M. 2004. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Mol Biol* 54: 767-781.
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defence against biotrophic and necrotrophic

- pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43: 205-227.
- Guan L. y Scandalios J. 1995. Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. *Proc. of the Nat Academy of Sci. USA* 92: 5930-5934.
- Hartung W, Scharaut D, Jiang F. 2005. Physiology of abscisic acid (ABA) in roots under stress – a review of the relationship between root ABA and radial water and ABA flows. *Aust. J. Agric. Res.* 56: 1253-1259.
- Hayat S, Hasan SA, Fariduddin Q, Ahmad A. 2008. Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress. *J Plant Int* 3: 297-304.
- Hirayama T, Shinozaki K. 2007. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci* 12: 343-351.
- Hirayama T, Shinozaki K. 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J* 61: 1041-1052.
- Hoisington D, Khairallah M, González De León D. 1994. *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. 2.ed Mexico, D. F. CIMMYT 51.
- Horváth E, Szalai G, Janda T. 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *J Plant Growth Regul* 26: 290-300.
- 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* 11: 2991-3007.
- Hussain M, Malik M, Farooq M, Ashraf M, Cheema M. 2008. Improving Drought Tolerance by Exogenous Application of Glycinebetaine and Salicylic Acid in Sunflower. *J Agron Crop Sci* 194: 193-199.
- International Rules for Seed Testing (2006). *Handbook For Seedling Evaluation* 3ro Edition, International Seed Testings Association. Switzerland.
- Ishiguro S, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I, Okada K. 2001 The defective in anther dehiscence 1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 191-209.
- Jakab G, Ton J, Flors V, Zimmerli L, Métraux JP, Mauch-Mani B. 2005 Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiol* 139: 267-274.
- Jensen M. K., Lindemose S., de Masi F., Reimer J. J., Nielsen M., Perera V., Workman C, Turk F, Grant M, Mundy J, Petersen M, Skriver K. 2013. ATAF1 transcription factor directly regulates abscisic acid biosynthetic gene NCED3 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Open Bio* 3: 321-327.
- Jensen MK, Kjaersgaard T, Nielsen MM, Galberg P, Petersen K, O'Shea C, Skriver K. 2010. The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochem J* 426: 183-196.
- Ji X, Dong B, Shiran B, Talbot MJ, Edlington JE, Hughes T, White RG, Gubler F, Dolferus R. 2011. Control of Abscisic Acid Catabolism and Abscisic Acid Homeostasis Is Important for Reproductive Stage Stress Tolerance in Cereals. *Plant Physiol* 156: 647-662.
- 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.
- Jiang H; Li H; Bu Q; Li C. 2009. The RHA2a-interacting proteins ANAC019 and ANAC055 may play a dual role in regulating ABA response and jasmonate response. *Plant Signal. Behav.* 4: 464-466.
- Journot-Catalino, N., Somssich, I.E., Roby, D. and Kroj, T. 2006. The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18: 3289-3302.
- Jung C, Seo J S., Han S, Koo Y, Kim C, Song S, Nahm B, Choi Y, Cheong J. 2008. Overexpression of *AtMYB44* enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in

- transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 146: 623-635.
- Jung H, Tschaplinski T, Wang L, Glazebrook J, Greenberg J. 2009. Priming in systemic plant immunity. *Sci* 324: 89-91.
- Kagaya Y, Hobo T, Murata M, Ban A, Hattori T. 2002. Abscisic acid- induced transcription is mediated by phosphorylation of an abscisic acid response element binding factor, TRAB1. *Plant Cell* 14: 3177-3189.
- 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.
- Kang J, Choi H, Im M, Kim S. 2002. *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* 14: 343-357.
- Kawaguchi R, Girke T, Bray EA, Bailey-Serres JN. 2004. Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 38: 823-839.
- Kazzan K. 2015. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in Plant Sci* 1-11.
- Kim S, Kang J, Cho D, Park J, Kim S. 2004. ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant J* 40: 75-87.
- Klamt HD. 1962. Conversion in plants of benzoic acid to salicylic acid and its b-D-glucoside. *Nature* 196: 491.
- Klingler J, Batelli G, Zhu J. 2010. ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *J Exp Bot* 61: 3199-3210.
- Knopf RR, Feder A, Mayer K. 2012. Rhomboid proteins in the chloroplast envelope affect the level of allene oxide synthase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 72: 559-571.
- Kombrink E. 2012. Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. *Planta* 236: 1351-1366.
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H. 2002. Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 33-36.
- Kramell R, Miersch O, Atzorn R, Parthier B, Wasternack C. 2000. Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiol.* 123: 177-187.
- Krugman T, Peleg Z, Quansah L, Chagué V, Korol AB, Nevo E, Saranga Y, Fait A, Chalhoub B, Fahima T. 2011. Alteration in expression of hormone-related genes in wild emmer wheat roots associated with drought adaptation mechanisms. *Funct Integr Genomics* 11: 565-583.
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kimatura S, Asami T, Hirai N, Koshihara 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.
- 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.
- Le D, Nishiyama R, Watanabe Y, Tanaka M, Seki M. 2012. Differential gene expression in soybean leaf tissues at late developmental stages under drought stress revealed by genome-wide transcriptome analysis. *PLoS ONE* 7(11): e49522.
- Le Guen V, Garcia D, Mattos C, Fouet O, Doaré F, Condina V, Seguin M. 2013. A newly identified locus controls complete resistance to *Microcyclus ulei* in the Fx2784 rubber clone *Tree Genet Genomes* 9: 805.
- Lee HI, Leon J, Raskin I. 1995. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4076-4079.

- 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.
- Levchenko V, Konrad K, Dietrich P, Roelfsema R, Hedrich R. 2005. Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca²⁺ signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 4203-4208.
- Li J, Besseau S, Toronen P, Sipari N, Kollist H, Holm L, Tapio Palva E. 2013. Defense-related transcription factors WRKY70 and WRKY54 modulate osmotic stress tolerance by regulating stomatal aperture in Arabidopsis. *New Phytol.* 200: 457-472.
- Li J, Brader G, Palva E. 2004. The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16: 319-331.
- Liao Y, Zou H, Wang H, Zhang W, Ma B, Zhang J. 2008. Soybean GmMYB76, GmMYB92, and GmMYB177 genes confer stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants. *Cell Res.* 18: 1047-1060.
- Liu P, von Dahl C, Park S, Klessig D. 2011. Interconnection between methyl salicylate and lipid-based long-distance signaling during the development of systemic acquired resistance in Arabidopsis and tobacco. *Plant Physiol.* 155: 1762-1768.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 1391-1406.
- Lorenzo O, Chico J, Sánchez-Serrano J, Solano R. 2004. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 1938-1950.
- Lu P, Chen N, An R, Su Z, Qi B, Ren F, Chen J, Wang X. 2007. A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 63: 289-305.
- Ma S, Gong Q, Bohnert H. 2006. Dissecting salt stress pathways. *J Exp. Bot.* 57: 1097-1107.
- Maraghni M, Gorai M, Neffati M. 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.
- Marion-Poll A, Leung J. 2006. Abscisic acid synthesis, metabolism and signal transduction. En: Hedden P, Thomas S.G. (Eds.), *Annual Plant Reviews: plant hormone signaling*. Oxford, UK, pp. 1-35.
- Matsui A, Ishida J, Morosawa T, Mochizuki Y, Kaminuma E. 2008. Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant Cell Physiol.* 49: 1135-1149.
- Meksem K, Kahl G. 2005. *The handbook of plant genome mapping. Genetic and physical mapping*. Alemania: WILEY-VCH Verlag Weinheim p.403.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 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 Phytol.* 177: 114-127.
- Minagri 2016. Perfil del mercado mundial de aceite de girasol. Dirección de Mercados agrícolas. <http://www.minagri.gob.ar/dimeagro/newsletters/nro83/nl-acqir.php>.
- Miura K, Okamoto H, Okuma E, Shiba H, Kamada H, Hasegawa P, Murata Y. 2013. SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling

- salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in *Arabidopsis*. *Plant J* 49: 79-90.
- Munne-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.
- Mwale SS, Hamusimbi C, Mwansa K. 2003. Germination, emergence and growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to osmotic seed priming. *Seed Sci Technol* 31: 199-206.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2014. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Front Plant Sci* 5: 170.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2013. ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Rep* 32: 959-970.
- Nambara E, Marion-Poll A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Ann Review Plant Physiol Plant Mol Biol* 56: 165-185.
- Németh 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.
- Nilsson L, Müller R, Nielsen T. 2010. Dissecting the plant transcriptome and the regulatory responses to phosphate deprivation. *Physiol Plant* 139: 129-143.
- Orellana S, Yañez M, Espinoza A, Verdugo I, González E, Ruiz-Lara S, Casaretto J. 2010. The transcription factor SlAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. *Plant Cell Environ* 33: 2191-2208.
- 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, Hopp HE. 2007. Sunflower. En: *Genome mapping and molecular breeding in plants, Volume 2. Oilseeds*. C. Kole (Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 153-177.
- Park S, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig D. 2007. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Sci* 318: 113-116.
- Parry ML, Rosenzweig C, Iglesias Ac, Livermore M, Fischer G. 2004. Effects of climate change on global food production under SRES emissions and socio-economic scenarios. *Glob Environ Chang* 14: 53-67.
- Pedranzani H, Racagni G, Alemanno 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 Balcarse, pp. 28-29.
- Penninckx I, Eggermont K, Terras FRG, Thomma BPHJ, De Samblanx GW, Buchala A, Métraux JP, Manners JM, Broekaert WF. 1996. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8: 2309-2323.
- Perales L, Arbona B, Gómez-Cadenas A, Comejo MJ, Sanz A. 2005. A relationship between tolerance to dehydration of rice lines and ability for ABA synthesis under stress. *Plant Physiol Biochem* 43: 786-792.
- Peretti A. 1994. Manual para análisis de semillas. INTA y Ed. Hemisferio Sur S.A. Arg. 281p.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team. 2012. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3 1-104.
- 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 Sci.* 172: 773-787.
- Priano J, Pilatti M. 1989. Tolerancia a la salinidad de forrajeras cultivadas. *Ciencia del suelo* 7: 1-2.
- 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.
- R Development Core Team, 2007. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0, URL/http://www.R-project.org
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Ayub Khan M, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol.* 133: 1755-1767.
- Raghavendra A, Gonugunta V, Christmann A, Grill E. 2010. ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* 15: 395-401.
- 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.
- Ribnicky DM, Shulaev V, Raskin I. 1998. Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 118: 565-572.
- Riemann M, Dhakarey R, Hazman M, Miro B, Kohli A, Nick P. 2015. Exploring Jasmonates in the hormonal network of drought and salinity responses. *Front Plant Sci* 6: 1077.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones J. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol* 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].
- Ruijter J, Ramakers C, Hoogaars W, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff M, Moorman A. 2009. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37: e45.
- Rushton D, Tripathi P, Rabara R, Lin J, Ringler P, Boken A, Langum T, Smidt L, Boomsma D, Emme N, Chen X, Finer J, Shen Q, Rushton P. 2012. WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. *Plant Biotechnol J* 10: 2-11.
- Rushton P, Somssich I, Ringler P, Shen Q. 2010. WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci* ; 15: 247-58.
- Saibo N, Lourenco T, Oliveira M. 2009. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Ann Bot* 103: 609-623.
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought responsive gene expression. *Plant Cell* 18: 1292-1309.
- Salunkhe ASR, Poornima K, Silvas Jebakumar Prince P, Kanagaraj J, Annie Sheeba K, Amudha KK, Suji A, Senthil R, Chandra B. 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 M. 2008. Abscisic acid and drought response of Canarian laurel forest tree species growing under controlled conditions. *Environ Exp Bot* 64: 155-161.

- Santino A, Bonsegna S, De Domenico S, Poltronieri P. 2010. Plant oxylipins and their contribution to plant defence. *Curr Top Plant Biol* 11: 103-111.
- Santino A, Taurino M, De Domenico S, Bonsegna S, Poltronieri P, Pastor V, Flors V. 2013. Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plant Cell* 32: 1085-1098.
- Sauter A, Dietz KJ, Hartung W. 2002. A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant Cell Environ* 25: 223-228.
- Savchenko T, Kolla V, Wang C, Nasafi Z, Hicks D, Phadungchob B, Chehab W, Brandizzi F, Froehlich J, Dehesh, K. 2014. Functional convergence of oxylipin and abscisic acid pathways controls stomatal closure in response to drought. *Plant Physiol* 164: 1151-1160.
- Schachtman D, Goodger J. 2008. Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends Plant Sci* 13: 281-287.
- Schaller A, Stintzi A. 2009. Enzymes in jasmonate biosynthesis – Structure, function, regulation. *Phytoch.* 70: 1532-1538.
- Schaller F, Schaller A, Stintzi A. 2005. Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J Plant Growth Regul* 23: 179-199.
- Scherer G, Ryu S, Wang X, Matos A, Heitz T. 2010. Patatin-related phospholipase A: nomenclature, subfamilies and functions in plants. *Trends in Plant Sci.* 15: 693-700.
- Schön CC, Utz HF, Groh S, Truberg B, Openshaw S, Melchinger AE. 2004. Quantitative trait locus mapping based on resampling in a vast maize testcross experiment and its relevance to quantitative genetics for complex traits. *Genetics* 167: 485-498.
- Schuster I, Cruz C. 2004. *Estatística genômica aplicadas a populações derivadas de cruzamentos controlados*. 1º Ed. UFV, Viçosa, Brasil, p.586
- 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. *J Exp Bot* 62: 2615-2632.
- Seiler JG, Rieseberg LH. 1997. Systematics, origin, resources of the wild and domesticated sunflower. En: *Sunflower technology and production*. Madison. Wisconsin (USA), (Ed) Agronomy series Agronomy. pp. 21-65.
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K. 2001. Microarray monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA. *Plant Cell* 13: 61-72.
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K. 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold, and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* 31: 279-292.
- Seltmann M, Stingl N, Lautenschlaeger J, Krischke M, Mueller M, Berger S. 2010. Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol* 152: 1940-1950.
- 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.
- Sengupta D, Kannan M, Reddy AR. 2011. A root proteomics-based insight reveals dynamic regulation of root proteins under progressive drought stress and recovery in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Planta* 233: 1111-1127.
- Shen Q, Chen C, Brands A, Pan S, Ho T. 2001. The stress- and abscisic acid-induced barley gene HVA22: developmental regulation and homologues in diverse organisms. *Plant Mol Biol* 45: 327-340.
- Shen Q, Uknes S, Ho T. 1993. Hormone response complex in a novel abscisic acid and cycloheximide-inducible barley gene. *J Biol Chem* 268: 23652-23660.

- Shen Q, Zhang P, Ho T. 1996. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell* 8: 1107-1119.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* 58: 221-227.
- Siegel R, Xue S, Murata Y, Yang Y, Nishimura N, Wang A, Schroeder J. 2009. Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K channels in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J* 59: 207-220.
- Singh BD. 2000. *Plant breeding-principles and methods*. (In): Kalyani Publishers. Ludhiana. New Delhi, India, pp. 1- 896.
- Smolik M. 2013. 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. *Electr J Biotechnol* 16: 1.
- Smyth GK. 2005. Limma: linear models for microarray data. In: 'Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor'. (Eds.) Gentle Manitol R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W. Springer, New York, pp. 397-420.
- Sobrado MA, Turner NC. 1986. Photosynthesis, dry matter accumulation and distribution in the wild sunflower *Helianthus petiolaris* and the cultivated sunflower *Helianthus annuus* as influenced by water deficits. *Acta Oecol* 69: 181-187.
- Song J, Koo Y, Park J, Seo Y, Cho Y, Seo H, Choi Y. 2009. The expression patterns of AtBSMT1 and AtSAGT1 encoding a salicylic acid (SA) methyltransferase and a SA glucosyltransferase, respectively, in *Arabidopsis* plants with altered defense responses. *Mol. Cells* 28: 105-109.
- Sorrells ME, Diab A, Nachit MM. 2000. Comparative genetics of drought tolerance. En: *Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region, New Challenges: Proceedings of the Seminar: Zaragoza, Spain; 12-14 Apr.* (Eds.) Royo C, Nachit M, Di Fonzo N, Araus JL. Option Méditerranéennes. Série A: Séminaires Méditerranéens. pp: 191-201.
- Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kramell R, Kurz T, Maucher H, Weichert H, Ziegler J, Feussner I, Wasternack C. 2003. Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 51: 895-911.
- 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. *J Exp Bot* 63: 6125-6138.
- 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.
- Takahashi S, Katagiri T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2000. An *Arabidopsis* gene encoding a Ca²⁺-binding protein is induced by abscisic acid during dehydration. *Plant Cell Physiol* 41: 898-903.
- Tang SJ-K, Yu M, Slabaugh D, Knapp Shintani SJ. 2002. Simple secuencía de repetición mapa del genoma del girasol. *Theor App Genet* 105: 1124-1136.
- Thameur A, Ferchichi A, López-Carbonell M. 2011. 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.
- Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Kruger P, Selbig J, Muller LA, Rhee SY, Stitt M. 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* 37: 914-939.
- Thines B, Katsir L, Melotto M. 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCFC811 complex during jasmonate signalling. *Nature* 448: 661-665.

- Thompson A, Mulholland B, Jackson A, Mckee J, Hilton H, Symonds R, Sonneveld T, Burbidge A, Stevenson P, Taylor I. 2007. Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. *Plant Cell Environ* 30: 67-78.
- Tong X, Qi J, Zhu X, Mao B, Zeng L, Wang B, Li Q, Zhou G, Xu X, Lou Y, He Z. 2012. The rice hydroperoxide lyase OsHPL3 functions in defense responses by modulating the oxylipin pathway. *Plant J* 71: 763-775.
- Tran L S, Nakashima K, Sakuma Y, Osakabe Y, Qin F, Simpson S, Maruyama K, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in *Arabidopsis*. *Plant J*. 49: 46-63.
- Tran L-SP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* 16: 2481-2498.
- Tripathi P, Rabara R, Rushton P. 2013. A systems biology perspective on the role of WRKY transcription factors in drought responses in plants. *Planta* 255-266.
- Turhan H, Baser I. 2004. Callus induction from mature embryo of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Asian J Plant Sci* 3: 17-19.
- Umezawa T, Okamoto M, Kushiro T, Nambara E, Oono Y, Seki M, Kobayashi M, Koshiba T, Kamiya Y, Shinozaki K. 2006. CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 46: 171-182.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Nat Acad Sci USA* 97: 11632-11637.
- 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 Interac* 20: 955-965.
- Vales MI, Schön CC, Capettini F, Chen XM, Corey AE, Mather DE, Mundt CC, Richardson KL, Sandoval-Islas JS, Utz HF, Hayes PM. 2005. Effect of population size on the estimation of QTL: a test using resistance to barley stripe rust. *Theor Appl Genet* 111: 1260-1270.
- Venuprasad R, Bool M, Quiatchon L, Sta Cruz M, Amante M, Atlin G. 2011. A large-effect QTL for rice grain yield under upland drought stress on chromosome 1. *Mol Breeding* 30: 535-547.
- Venuprasad R, Dalid CO, Del Valle M, Zhao D, Espiritu M, Sta Cruz MT, Amante M, Kumar A, Atlin G. 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.
- Verhage A, van Wees S, Pieterse C. 2010. Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say? *Plant Physiol* 154: 536-540.
- Verhoeven K, Jannink J, McIntyre L. 2006. Using mating designs to uncover QTL and the genetic architecture of complex traits. *Heredity* 96: 139-149.
- Veselov DS, Sharipova GV, Veselov SU, Kudoyarova GR. 2008. The effects of NaCl treatment on water relations, growth and ABA content in barley cultivars differing in drought tolerance. *J Plant Growth Regul* 27: 380-386.
- 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 Sci Res* 17: 91-98.
- 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.
- Viot AC, Dempsey DMA, Klessig DF. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 47: 177-206.
- Wang D, Guo A, Li D, Tian J, Huang F, Sun G. 2007. Cytological and molecular characterization of a novel monogenic dominant GMS in *Brassica napus* L. *Plant Cell Rep* 26: 571-579.
- 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.
- 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, Hause B. 2002. Jasmonates and octadecanoids - Signals in plant stress responses and development. *Progr Nucleic Acid Res Mol Biol* 72: 165-221.
- Wasternack C, Hause B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot* 111:1021-1038.
- Wasternack C, Kombrinck E. 2010. Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chem Biol* 5: 63-77.
- Wasternack C. 2005. Jasmonates. Introductory remarks on biosynthesis and diversity in actions. *J Plant Growth Regul* 23: 167-169.
- Wildermuth M, Dewdney J, Wu G, Ausubel F. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-565.
- Wilkinson S, Davies WJ. 2002. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* 25: 195-210.
- 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. *Biotechnol Lett* 33: 1351-1359.
- Wu, Y., Deng, Z., Lai, J., Zhang, Y., Yang, C., Yin, B, Zhao Q, Zhang L, Li Y, Yang C, Xie Q. 2009. Dual function of Arabidopsis ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. *Cell Res* 19: 1279-1290.
- Würschum T. 2012. Mapping QTL for agronomic traits in breeding populations. *Theor Appl Genet* 125: 201-210.
- Xiong L, Lee H, Ishitani M, Zhu JK. 2002. Regulation of osmotic stress responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in Arabidopsis. *J Biol Chem* 277: 8588-8596.
- 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.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1994. A novel cis-acting-element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature or high salt stress. *Plant Cell* 6: 251-264.
- Yan Y, Christensen S, Isakeit T, Engelberth J, Meeley R, Hayward A, Neil Emery R, Kolomiets M. 2012. Disruption of OPR7 and OPR8 reveals the versatile functions of jasmonic acid in maize development and defense. *The Plant Cell* 24: 1420-1436.
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2010. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J* 61: 672-685.
- Younis RAA, Ahmed MF, EL-Menshawi M. 2007. Molecular genetic markers associated with salt tolerance in grain sorghum. *Arab J Biotech* 10: 249-258.

- Zhang C, Huang Z. 2013. Effects of endogenous abscisic acid, jasmonic acid, polyamines, and polyamine oxidase activity in tomato seedlings under drought stress. *Sci Hortic* 159: 172–177.
- Zhang G, Chen L, Xiao G, Xiao Y, Chen X, Zhang S. 2009. Bulked segregant analysis to detect QTL related to heat tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using SSR markers. *Agric Sci China* 8: 482-487.
- Zhang J, Davies WJ. 1989. Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. *Plant Cell Environ* 12: 73-81.
- Zhang J, Davies WJ. 1990a. Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil water will account for changes in leaf conductance. *Plant Cell Environ* 13: 277-285.
- Zhang J, Davies WJ. 1990b. Does ABA in the xylem control the rate of leaf growth in soil-dried maize and sunflower plants. *J Exp Bot* 41: 1125-1132.
- Zhang J, Jia W, Yang J, Ismail AM. 2006. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stress. *Field Crop Res* 97: 111-119.
- Zhang J, Schurr U, Davies WJ. 1987. Control of stomatal behavior by abscisic acid which apparently originates in roots. *J Exp Bot* 38: 1174-1181.
- Zhang L, Gao M, Hu J, Zhang X, Wang K, Ashraf M. 2012. Modulation Role of Abscisic Acid (ABA) on Growth, Water Relations and Glycinebetaine Metabolism in Two Maize (*Zea mays* L.) cultivars under Drought Stress. *Int J Mol Sci* 13: 3189-3202.
- Zhu G, Ye N, Zhang J. 2009. Glucose-induced delay of seed germination in rice is mediated by the suppression of ABA catabolism rather than an enhancement of ABA biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 50: 644-651.
- Zhu JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 53: 247-273.

Anexos A

Serie	Locus	Iniciador Forward 5'-3'	Iniciador Reverse 5'-3'	Alelo B59 (pb)	Alelo B71 (pb)	Fluoróforo
HA	14	GAGCGTTCAACTGGGTCTGC	CTGTGTAGGGGGCTTTTCC	165	159	HEX
HA	293	GGGACATCTCCCGTCCACC	CCTCATCCATCTCCATCCAATC	121	119	HEX
HA	359	GTGGCGTCATCGGCCTCGTCCG	CACCCCCCTTCATCTTATG	206	192	FAM
HA	503	GTAGATCTTTCCCTGCACCC	GATGCGTTAGAGATAACCTG	113	115	FAM
HA	683	GGGACTAAAGTTGGTTAAGTG	GCATTAGGGATTTTGAAGAGG	147	152	HEX
HA	749	GGCTAACTGAAACATGGG	GGCTGCTGGAGTGAAGTCC	129	133	FAM
HA	765	GCAAACATCCACCATCTATC	GAACGGGGTAGTCGGTTATG	192	190	HEX
HA	911	CAAAGTTCACCTCGTTTTTC	AAGTGGGAAGGTCTACGAGT	178	169	FAM
HA	928	CCTTTGTAGTCCCTTACTGG	GGTCGATCATGTATGCGTGTTG	226	216	HEX
HA	969	CAGTTCCTCACTTGTGA	CATCAATAAGTGGAAAGACGGG	122	110	FAM
HA	1066	GCATCACTAGGTATTAGG	CGAGCGGGAAATGCAATATTGG	222	224	HEX
HA	1340	CCACCCCATCTCCAATCATTTC	GAGCATTGAGAACACATCTTG			FAM
HA	1500	GTGATCACTCAAGAA	GTGGATTGTGGGGA	204	197	FAM
HA	1582	CGGCTTGTGAGGTTGGATTG	GTGGTTGAGGCCATGGCAGC	141	177	HEX
HA	1667	GTTAACACGGATCCTACGAC	GACTGAGGTGTGCCACCTATC	160	193	HEX
HA	1738	CTTTTCATCTTCGTCCTCTC	GCGGTGATCGGGAGTTAAAACAC	109	104	HEX
HA	1848	CATCCCCTTCTGAATAGAAA	TAGGCTCGTTAAACTTACGG	244	230	HEX
HA	2063	CACCGCAGATGGCCAATTCAAC	GGTTCGCTAACCTGCAATGCG	170	180	FAM
HA	2077	GATAAGGTTTTCTCTCTCCC	GAGAAAAATGAGCTGATACCG	139	114	HEX
HA	2078	GATGGCAAGGTGTTGCAGAATTTG	CAACACACACTCTCAATACCC	159	155	FAM
HA	2147	CCCCATAAACATTTACACCC	CCTGAGAAATCGGTAGATAGTG	83	97	FAM
HA	2332	GAGATAACCTGAAATGACCC	GATTTAAGATCTTTCCCTGCAC	108	110	FAM
HA	2547	CAATCATCAGCATCAGCAACC	CTGCATACGTGTATATATGC	136	132	HEX
HA	2565	GTGGTCGTCTCTTCAACTGACGG	CAACCCACAACACCTCCTACC	203	207	HEX
HA	2579	CGGATTTATGATTTGATTCACCCG	GGATAACACTACCTTTGATGTTG	191	181	FAM
HA	2598	ATGTCTCCAAGGAATATGC	CAAAACAGGTGTTGCCTGAATC	235	239	HEX
HA	2619	GGGTGAATCAATGGCTTCCGTG	GTTTGACGGTGGATGAACGGTG	204	209	FAM
HA	2719	GGCGCCACAGCCATTTTCTG	GACCGAATTCTAGTGAGCCGC	228	239	HEX
HA	2870	AACCCTTCATTCTCAAC	CACCTTTGTATGTATGGAG	138	128	HEX
HA	2905	GCTCATATTCTCTAACACAC	CTTCCAAGAGCTCCTAGCTTC	168	166	HEX
HA	2920	AACGTGTTCAATCGGATGC	GAAGATTGGTATGATGGGGC	169	173	FAM
HA	2998	GTGGCTCCCCGTACATAATTTG	GATTGTAGAGGATGAAGGACC	116	118	FAM
HA	3001	GTATTAGGAGGAGC	CTGCCATCAGCAAGC	79	75	NED
HA	3112	GGAGTAGATGGATT	CATGTGAGAAGCAC	213	239	NED
HA	3239	CTTAATTCGACATAAGCAGG	CTTTTATTATTCACAACCCCC	137	134	NED
HA	3278	TAGCCAACCTTCTCTTTCCA	CTTTCCCTGCACCCATA	158	160	FAM
HA	3303	CATCGACTTCTCTATA	GGATGAGGTTGCTGC	85	95	NED

HA	3312	TAACGTCAACAGACATGGAA	ATAACGATTGCACAACACAA	110	98	FAM
HA	3700	GAAAAGATTGGGAGAGACCT	TTCTTCTCCACCCACCTAT	176	178	FAM
HA	4103	TCACTTATCACCAATCTCATCCA	CTGTCTCAAATCGGGTGGTT	150	141	FAM
ORS	16	GAGGAAATAAATCTCCGATTCA	GCAAGGACTGCAATTTAGGG	125	128	FAM
ORS	297	GTGTCTGCACGAACGTGGT	TGCAAAGCTCACACTAACCTG	230	226	HEX
ORS	303	CGAGAGGACAAGAAATCTGTGA	AGAACGACGGATGAAGATCG	283	290	FAM
ORS	316	TGGCGTCTTCATAGCATCAG	GAGATTTGAGCTTCGTGTTGC	179	188	FAM
ORS	317	TTTGGCAGTTTGGTGGCTTA	GGTCGTATGCTTAATTCTTTCTCT	204	190	FAM
ORS	342	TGTTATCATCAGTTTGTCTCCA	CACCAGCATAGCCATTCAAA	339	346	HEX
ORS	420	TCATGGTGTGGTTTGTGTCT	TGCCAAATTCCTCTTCTTCT	134	136	HEX
ORS	457	TGCATACCCAATCTACCAGCTA	AAGACGAAGGTGCAACCACT	223	228	FAM
ORS	510	CATCGCGTCCCTCTCTCTAA	CCAACCATCACAGCAATCAG	249	258	HEX
ORS	533	TGGTGGAGGTCACATTTGGA	AGGAAAGAAGGAAGCCGAGA	170	160	FAM
ORS	534	TCCAAACTCTCTCCCCTCT	GCAGCGAAATAGGAAAAACG	251	254	FAM
ORS	607	CTAATACAAAGCAACCCGACAA	GCCTGCACATGAGAATGACA	274	276	FAM
ORS	613	GTAACCCCTAGGTCAATTTGCAG	ATCTCCGAAAAACATTCTCG	211	224	FAM
ORS	620	TCATGGCGGTTAGAGACGAT	CACTTCTTTCATCAACCCCTCT	245	249	FAM
ORS	623	CTCCGTGACATCCAGACAAC	GACCGCCACACCCTAAA	220	218	FAM
ORS	665	GCACATGAGGTATGGATCTCT	TGCAAATACAACTCGGGAAA	294	288	HEX
ORS	695	TCACCTCATTCTTCACTTTCCA	TTGGTGGTGGCAGCTATGTA	354	367	HEX
ORS	788	CTGGATAAAGATGGGATAAAGAGAG	GGACCACCAAGATTGTTTT	271	261	FAM
ORS	805	CATGGATTATAAGAACGGGTGTT	AATCCAGGGGTAATAATTGC	204	202	NED
ORS	837	TGAAGGGCAATGGGATAGAAATA	TGAGATTTAGGTAGCGTGCAGAC	440	436	FAM
ORS	878	TGCAAGGTATCCATATCCACAA	TATACGCACCGAAAGAAAGTC	215	192	FAM
ORS	894	TTTCTCATGATCCCGATTCTAT	TGCATTACCTAATTTCTAGTGGGTTT	249	252	NED
ORS	899	GCCACGTATAACTGACTATGACCA	CGAATACAGACTCGATAAACGACA	322	324	HEX
ORS	959	CCGCTAAGTATAAACCGCTATT	CGTCCTCTTCGCATCAATCTTAT	234	248	HEX
ORS	993	GTGTTACAATCCTTGCCTCGATA	CAAACCACAGGGACCAAAATG	317	331	FAM
ORS	1024	GGGAAGTGGGCTTGTCTATGTAT	AACACACCGAAATCACCTATGAA	224	228	FAM
ORS	1041	AAACAAACCTTAATGGGGTCGTA	ATATTGGCTGGTTGATGCTGAT	280	282	FAM
ORS	1085	GACCTCAAGGCATGCTAACACTC	ACTAAGTGTGTGGACGGGGAAA	277	281	HEX
ORS	1093	CATATATGTGGGTCGCATATAACC	CCTGTGGATCTTTCTAGCAACAA	385	383	HEX
ORS	1146	GGCTCATCACTTGCATCTATTGT	TGAAGACACCATCTCCAATGC	378	380	FAM
ORS	1222	GGCATTGTTGTCATTTCTCTCT	ATCATGTCGGAATAGCTTGTGGA	436	440	HEX
ORS	1240	TTGAAAGTTGGGAGTGATGTTGT	AGTGTGATTGGTTGAGATTGGAA	278	310	HEX
ORS	1242	GCAATCGTTTCACTCTTCCATTC	TGGTCGTAGAATTGTCGGTCAT	255	265	HEX
EST-HT	382	GGCTCATCACTTGCATCTATTGT	TGAAGACACCATCTCCAATGC	375	359	NED
EST-HT	426	GCAATCGTTTCACTCTTCCATTC	TGGTCGTAGAATTGTCGGTCAT	312	321	HEX
EST-HT	440	GTCTCGACTTGGGATCTGCTG	AGTGTGAGGGTGTGTAGGATTGA	243	239	FAM

EST-HT	519	CGAGAGGACAAGAAATCTGTGA	AGAACGACGGATGAAGATCG	254	267	FAM
EST-HT	591	GGCATTGTTGTCATTTTCATCTCT	ATCATGTCGGAATAGCTTGTGGA	320	317	HEX
EST-HT	734	GACCTCAAGGCATGCTAACACTC	ACTAAGTGTGTGGACGGGGAAA	294	298	NED
EST-HT	761	CATATATGTGGGTCGCATATAACC	CCTGTGGATCTTTCTAGCAACAA	128	126	HEX
EST-C	2070	TTGAAAGTTGGGAGTGATGTTGT	AGTGTGATTGGTTGAGATTGGAA	238	235	HEX

Tabla 1a: Descripción de loci microsatélites seleccionados

		B59	37	4	2	36	47	80	18	48	43	19	111	31	B71
MIX	MM	línea sens.	Familias sensibles						Familias tolerantes						línea tol.
Mix 1	ORS	322	324	322	-	324	322	322	322	-	322	322	-	-	324
	899	322	324	322	-	324	324	324	324	-	324	322	-	-	324
	ORS	230	226	226	-	226	226	226	226	230	226	226	226	226	226
	297	230	230	230	-	226	226	226	230	230	226	226	226	230	226
	ORS	179	179	188	-	179	188	179	188	188	179	179	179	179	188
	316	179	188	188	-	188	188	179	188	188	188	179	179	179	188
	ORS	224	224	224	-	224	224	224	224	224	224	224	224	224	227
	1024	224	227	227	-	224	227	224	224	224	227	227	224	227	227
Mix 2	HA	204	209	204	204	204	204	204	204	209	204	204	204	209	209
	2619	204	209	209	209	209	209	204	209	209	209	204	209	209	209
	HA	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	177	177
	1582	141	141	177	177	177	177	141	141	141	177	177	141	177	177
	HA	203	207	203	203	203	203	203	203	203	203	203	203	203	207
	2565	203	207	203	203	203	203	203	203	203	203	203	203	203	207
	ORS	278	278	278	278	278	281	281	281	281	281	278	278	281	281
	1085	278	281	278	281	278	281	281	281	281	281	278	281	281	281

Mix 3	HA	169	169	169	169	169	169	169	169	172	172	172	-	169	169	172
	2920	169	172	172	172	172	169	172	172	172	172	172	-	169	172	172
	ORS	245	-	250	250	250	250	-	250	250	250	250	-	250	-	250
	620	245	-	250	250	250	250	-	250	250	250	250	-	250	-	250
	HA	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	-	160	160	193
	1667	160	193	160	160	160	193	160	193	193	193	193	-	193	193	193
	ORS	235	235	235	235	235	235	235	235	235	235	235	-	247	235	247
	959	235	235	247	247	235	247	247	247	235	247	247	-	247	247	247
	ORS	436	436	436	436	436	436	440	440	436	440	440	-	436	436	440
	1222	436	440	440	440	436	436	440	440	436	440	440	-	436	440	440
	EST- HT734	294	298	298	298	298	298	298	298	298	298	298	-	298	298	298
		294	298	298	298	298	298	298	298	298	298	298	-	298	298	298
EST- HT382	375	359	359	375	359	359	375	359	359	359	359	-	359	359	359	
	375	375	375	375	375	359	375	359	359	375	-	375	375	359		
Mix 4	HA	109	109	109	109	111	109	109	109	109	111	109	111	111	111	
	2332	109	111	111	109	111	111	111	109	109	111	111	111	111	111	
	HA	150	141	141	141	150	141	141	141	141	150	141	150	141	141	
	4103	150	150	150	150	150	141	141	150	150	150	150	150	150	141	
	HA	191	191	181	191	191	181	191	191	181	191	191	191	181	181	
	2579	191	191	191	191	191	181	191	191	191	191	191	191	181	181	
	ORS	274	274	276	274	274	274	274	274	274	274	274	274	274	276	
	607	274	274	276	274	276	276	274	276	276	276	276	274	274	274	276
	ORS	134	134	134	134	134	136	134	134	134	134	134	136	134	134	136
	420	134	136	136	136	136	136	136	136	136	136	134	136	134	134	136
	HA	137	134	134	134	134	137	137	134	134	137	137	134	134	134	
	3239	137	134	137	137	137	137	137	137	137	137	137	137	137	134	

Mix 5	ORS	170	170	170	170	170	-	170	170	170	170	170	170	170	160	
	533	170	170	170	170	170	-	170	170	170	170	170	170	170	160	
	ORS	223	228	223	223	223	-	223	223	228	228	223	223	223	228	
	457	223	228	223	223	228	-	223	223	228	228	223	228	228	228	
	ORS	278	278	278	310	278	-	278	278	278	310	278	278	310	310	
	1240	278	278	278	310	278	-	278	278	278	310	310	278	310	310	
	ORS	249	249	249	249	249	-	249	249	249	252	249	252	252	252	
	894	249	252	252	249	252	-	252	249	249	252	252	252	252	252	
Mix 6	ORS	125	128	125	125	125	125	137	125	125	125	125	125	125	128	
	16	125	128	125	125	125	125	137	125	125	125	128	137	128	128	
	ORS	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211	224	
	613	211	211	211	211	211	211	224	211	211	211	211	211	211	224	
	ORS	283	283	283	283	283	283	283	283	283	283	283	283	283	290	
	303	283	290	283	290	290	283	283	283	290	290	290	283	290	290	
	EST-ht426	312	321	321	321	321	321	321	321			321	321	321	321	321
		312	321	321	321	321	321	321	321			321	321	321	321	321
	HA	147	147	147	147	152	152	152	147	147	147	152	147	147	152	
	683	147	152	152	147	152	152	152	152	147	152	152	152	152	152	
	HA	192	190	190	190	190	190	192	190	190	190	190	192	190	190	
	765	192	192	190	192	190	192	192	192	190	190	190	192	192	190	
	HA	235	239	235	235	239	235	235	239	239	235	235	235	235	239	
		2598	235	239	239	239	239	235	239	239	239	235	239	239	239	
	ORS	339	346	339	339	339	339	339	339	339	339	339	339	339	346	
	342	339	346	339	339	339	346	339	346	346	346	339	339	339	346	
HA	159	155	155	155	159	155	155	155	155	159	155	159	155	155		
	2078	159	159	159	159	155	155	159	159	159	159	159	159	155		

Mix 7	HA	206	192	192	192	192	206	191	192	192	206	192	192	192	192	
	359	206	192	206	206	206	206	193	206	206	206	192	206	206	192	
	ORS	317	317	317	331	317	317	317	317	317	331	-	317	331	331	
	993	317	317	331	331	331	317	317	317	317	331	-	317	331	331	
	HA	121	119	119	119	119	119	119	119	119	119	121	121	119	119	
	293	121	121	121	119	121	121	121	121	121	121	121	121	121	119	
	ORS	255	255	265	255	255	265	255	255	255	255	255	255	255	255	265
	1242	255	265	265	255	265	265	265	265	255	255	255	255	265	265	265
	EST- HT761	128	126	126	126	126	126	128	126	126	128	128	126	126	126	
		128	126	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	126	
	EST- HT440	243	239	243	239	239	243	239	243	239	239	239	239	243	239	
		243	239	243	239	243	243	239	243	239	243	243	243	243	239	
Mix 8	HA	170	170	170	170	170	170	180	170	170	170	170	170	170	180	
	2063	170	180	180	170	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	
	ORS	220	218	218	218	218	218	218	218	218	218	218	218	218	218	
	623	220	220	220	220	218	220	220	220	220	220	220	218	218	218	
	HA	14	165	165	159	159	165	159	159	159	159	165	159	165	159	159
		14	165	165	165	165	165	159	159	165	165	165	165	165	159	
	HA	228	228	228	228	228	228	-	228	228	228	228	228	228	239	
	2719	228	239	239	239	228	228	-	239	228	239	239	228	239	239	
Mix 9	HA	83	83	83	83	83	83	97	83	83	97	83	83	97	97	
	2147	83	97	97	97	97	83	97	97	97	97	83	83	97	97	
	ORS	440	440	436	436	440	436	436	436	440	436	436	436	436	436	
	837	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	436	440	436	
	HA	226	216	216	216	226	216	226	226	216	216	226	226	216	216	
	928	226	216	216	226	226	216	226	226	216	216	226	226	216	216	

Mix 10	HA	113	113	113	113	115	113	113	113	113	115	113	115	115	115	
	503	113	115	115	113	115	115	115	113	113	115	115	115	115	115	
	ORS	294	288	288	288	288	294	288	288	288	288	288	294	288	288	
	665	294	294	294	294	294	294	294	288	288	288	294	294	294	288	
Mix 11	HA	129	133	129	129	129	129	129	129	129	133	129	129	133	133	
	749	129	133	133	133	133	133	133	133	133	133	129	133	133	133	
	HA	204	197	197	197	197	204	197	197	197	197	197	204	197	197	
	1500	204	204	197	197	197	204	197	197	197	197	197	204	204	197	
	ORS	251	254	251	251	251	251	251	251	251	254	251	251	254	254	
	534	251	254	254	254	254	254	254	254	254	254	251	254	254	254	
	HA	138	128	128	138	128	128	138	128	128	128	128	138	128	128	
	2870	138	138	128	138	128	138	138	138	128	128	138	138	138	128	
	HA	222	222	222	224	222	222	224	222	222	222	222	224	222	224	224
	1066	222	222	222	224	222	222	224	222	222	222	222	224	224	224	224
Mix 11	EST-HT519	254	254	254	254	267	254	254	254	254	254	254	267	267	267	
		254	267	267	254	267	267	267	254	254	267	267	267	267	267	
	HA	85	95	95	85	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	
3303	85	95	95	85	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95		
Mix 12	HA	121	110	121	121	121	110	110	110	110	110	110	110	110	110	
	969	121	121	121	121	121	121	110	121	121	121	121	121	121	110	
	HA	158	158	158	158	160	158	158	158	158	160	158	160	160	160	
	3278	158	160	160	158	160	160	160	158	158	160	160	160	160	160	
	ORS	271	271	261	261	261	261	261	271	271	261	261	271	261	261	
	788	271	271	271	261	271	271	271	271	271	261	271	271	261	261	
	HA	139	114	114	114	139	114	114	114	139	139	139	139	114	114	
	2077	139	139	114	139	139	139	139	139	139	139	139	139	139	114	

	HA	79	75	75	75	75	75	79	75	75	79	79	75	75	75	
	3001	79	75	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	75	
Mix 13	HA	176	176	176	176	176	176	176	176	176	176	176	176	176	178	
	3700	176	176	176	176	176	176	178	176	176	176	176	178	176	178	
	ORS	215	192	192	192	215	215	215	215	192	192	215	215	192	192	
	878	215	192	192	215	215	215	215	215	192	192	215	215	192	192	
	EST- C2070	238	235	235	235	235	235	235	235	235	235	235	235	235	235	
		238	235	238	238	238	235	238	235	238	235	238	235	238	238	235
	HA	109	109	-	104	-	104	104	104	104	104	-	104	104	-	104
	1738	109	109	-	104	-	104	104	104	104	104	-	104	104	-	104
	HA	136	132	132	132	132	132	132	132	132	132	136	136	132	132	132
	2547	136	136	132	136	136	132	136	136	136	136	136	136	136	136	132
	HA	168	166	166	166	166	168	168	166	168	168	168	168	166	166	166
	2905	168	168	168	168	168	168	168	168	168	168	168	168	168	168	166

Tabla 2a: Mix generados para realizar el genotipado en F₂