

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

Trabajo final presentado para optar al Grado de Ingeniero Agrónomo

Modalidad: Proyecto

**“NIVELES HORMONALES ENDÓGENOS EN PLÁNTULAS DE GIRASOL
(*Helianthus annuus* L.)” EN RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO.**

Nombre del Alumno: Compagnucci Marcelo Gonzalo

DNI: 33233154

Director: Dra. Vigliocco Ana

Co-Director: Dra. Andrade Andrea

Río Cuarto – Córdoba

Abril 2017

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

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final:
**“NIVELES HORMONALES ENDÓGENOS EN PLÁNTULAS
DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.)” EN RESPUESTA A
ESTRÉS HÍDRICO”**

Autor: Marcelo Gonzalo Compagnucci
DNI: 33.233.154

Director: Dra. Vigliocco Ana
Co-Director: Dra. Andrade Andrea

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

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

Tiempos de brillos, sensaciones de grandeza en el corazón, vivir en primer lugar que sobrevivir, anhelos de bienaventuranzas, alegría y esperanza en cada despertar por la mañana, emociones con raíces en el amor al ser, confianza en el poder hacer, quietud frente a adversidades, inteligencia emocional ante la incertidumbre que nos impresiona en lo cotidiano, comprender la oportunidad que nos otorga estar vivo en este bello mundo donde la gratitud forma parte del todo.

Por estas cogniciones y por otras tantas más, agradezco con infinito amor a cada una de las personas que compartieron, comparten y compartirán cada paso de este camino al andar lleno de oportunidades y posibilidades.

Gracias, gracias por existir y que la felicidad los inunde siempre.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	VII
SUMMARY	VIII
INTRODUCCIÓN	1
- Origen, importancia y distribución del cultivo de girasol.....	1
- Descripción del material vegetal.....	2
- El estrés hídrico y sus efectos en girasol.....	3
- Hormonas involucradas en la regulación de la respuesta a estrés hídrico.....	4
- Jasmonatos (JAs): biosíntesis y catabolismo.....	4
- Rol fisiológico de JAs en procesos normales del desarrollo y durante condiciones de estrés de las plantas.....	6
- JAs y procesos del desarrollo.....	6
- JAs y condiciones de estrés abiótico.....	7
- Giberelinas (GAs): biosíntesis y catabolismo.....	8
- Rol fisiológico de GAs en procesos normales del desarrollo y durante condiciones de estrés de las plantas.....	9
- GAs y procesos del desarrollo.....	9
- GAs y condiciones de estrés abiótico.....	10
- Hipótesis.....	11
- Objetivo general.....	11
- Objetivos específicos.....	11
	12
MATERIALES Y MÉTODOS	
- Material vegetal.....	12
- Ensayo de germinación.....	12
- Ensayo de crecimiento temprano y tratamiento de estrés hídrico.....	12
- Ensayo de rehidratación.....	13
- Determinación de longitud de parte aérea y conductancia estomática.....	13
- Determinación de niveles hormonales endógenos.....	13
- Reproducibilidad de las determinaciones.....	14
- Análisis estadístico.....	14
RESULTADOS	15
- Evaluación morfológica.....	15

- Evaluación fisiológica.....	16
- Conductancia estomática.....	16
- Contenido hormonal endógeno.....	17
- Ácido jasmónico en plantas estresadas y rehidratadas.....	17
- Giberelinas en plantas estresadas y rehidratadas.....	19
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	26
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCION	Pág.
Fig. 1. Área de producción de girasol en Argentina.....	1
Fig. 2. Plántula de girasol.....	2
Fig. 3. Estructura química del ácido jasmónico.....	4
Fig. 4. Biosíntesis y catabolismo de JA.....	6
Fig. 5. Estructura química de GAs.....	8
Fig. 6. Biosíntesis de GAs.....	9
 RESULTADOS	
Fig. 7. Longitud de parte aérea (LPA) de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=5 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.....	15
Fig. 8A. Conductancia estomática en hojas de plántulas de la línea B71, controles y tratadas con manitol ($n=5 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.	16
Fig. 8B. Conductancia estomática en hojas de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=5 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.....	17
Fig. 9A. Niveles endógenos de JA en parte aérea de plántulas B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=5 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.....	18
Fig. 9B. Niveles endógenos de JA en parte radical de plántulas B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=5 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.....	18
Fig. 10A. Niveles endógenos de GA_1 en parte aérea de plántulas B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=5 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.....	19
Fig. 10B. Niveles endógenos de GA_1 en parte radical de plántulas B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=5 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican	20

diferencias estadísticamente significativas.....

Fig. 11A. Niveles endógenos de GA₄ en parte aérea de plántulas B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días (n=5 ± SE); P < 0.05. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas..... 20

Fig. 11B. Niveles endógenos de GA₄ en parte radical de plántulas B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días (n=5 ± SE); P < 0.05. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas..... 21

RESUMEN

El estrés hídrico condiciona el crecimiento y productividad de los cultivos de interés agrícola, entre ellos, el girasol. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la respuesta a estrés hídrico de plántulas de girasol de la línea B71 (tolerante a dicho estrés). A tal fin se determinó la longitud de parte aérea, conductancia estomática y contenido endógeno de ácido jasmónico (JA) y giberelinas (GA₁ y GA₄) en plántulas sometidas a estrés hídrico moderado generado por manitol 400 mM y luego de diferentes tiempos de rehidratación post-estrés (3, 5 y 8 días). Las hormonas fueron extraídas por una doble partición líquido-líquido, y se identificaron y cuantificaron por Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas en Tándem (LC-ESI/MS-MS). El estrés hídrico ocasionó una importante reducción en la longitud de la parte aérea y conductancia estomática de plántulas de 10 y 18 días de edad. Durante el período de rehidratación se evidenció un aumento gradual en la longitud de la parte aérea. Por otra parte, la conductancia estomática registró una leve y gradual recuperación post-estrés, aunque no alcanzó durante el período de rehidratación el valor detectado en plántulas controles. Respecto a los niveles hormonales endógenos, el contenido de JA no registró modificaciones en parte aérea de plántulas estresadas; mientras que incrementó significativamente en parte radical. En relación a GAs, los resultados mostraron un aumento significativo de 3 veces en el contenido de GA₁ y de 2 veces en GA₃ en parte aérea de plántulas estresadas. Contrariamente, una disminución de ambas GAs fue detectada en parte radical. La rehidratación modificó diferencialmente el contenido endógeno de JA y GAs en parte aérea y radical. Los resultados demuestran que JA y GAs podrían interactuar en la regulación de la respuesta a estrés hídrico moderado en plántulas de girasol.

Palabras claves: Ácido jasmónico, *Helianthus annuus* L., estrés hídrico, giberelinas, rehidratación.

SUMMARY

Water stress limits the growth and productivity of agricultural crops including sunflower. The aim of this study was to characterize the response to water stress of B71 sunflower seedlings (tolerant to water stress). The aerial part length, stomatal conductance and endogenous content of jasmonic acid (JA) and gibberellins (GA₁ and GA₄) were determined in seedlings subjected to moderate water stress generated by 400 mM mannitol and after a rehydration period (3, 5 and 8 days). The hormones were extracted by a double liquid-liquid partition and they were identified and quantified by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI/MS-MS). Moderate water stress caused a significant reduction of aerial part length and stomatal conductance on 10 and 18 day-old seedlings. During the rehydration period the seedlings showed a gradual increase in the aerial part length. A slight and gradual recovery of the stomatal conductance was registered, but this value did not reach the level detected in control seedlings. Regarding the endogenous hormone levels, the JA content did not show changes in aerial part of stressed seedlings; while it increased significantly in root. In relation to GAs, a significant increase was registered in aerial part of stressed seedlings (GA₁: 3-fold, GA₃: 2-fold). Contrary, a decrease in endogenous content of both GAs was detected in roots. The rehydration period differentially modified JA and GAs endogenous content in aerial and radical part. The results demonstrate that JA and GAs could be interacting in regulation of the response to water stress of sunflower seedlings.

Key words: Gibberellins, *Helianthus annuus* L., Jasmonic acid, rehydration, water stress.

INTRODUCCIÓN

Origen, importancia y distribución del cultivo de girasol

El origen del girasol (*Helianthus annuus* L.) se remonta a 3.000 años a. C. en el norte de México y Oeste de Estados Unidos, cultivado por las tribus indígenas de Nuevo México y Arizona. Fue introducido en España por los colonizadores y después se extendió al resto de Europa.

El girasol es una de las oleaginosas más ampliamente cultivadas en el mundo, representando Argentina y el este europeo los principales centros de producción. En nuestro país se cultiva desde el sudeste de la Región Pampeana (39°S) hasta la Región Chaqueña (26°S) (Fig. 1). Su cultivo en ambientes tan dispares y con rendimientos importantes resulta, en parte, a su plasticidad como así también al éxito de los fitomejoradores en seleccionar materiales adaptados a las diferentes zonas de producción.

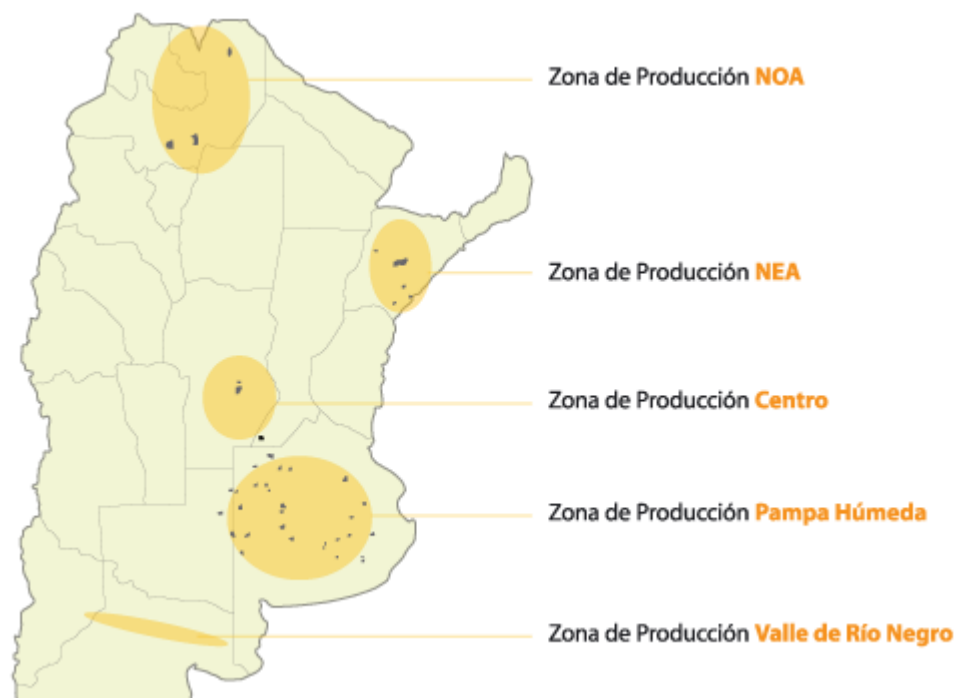


Fig. 1. Áreas de producción de girasol en Argentina

La utilidad de esta especie radica principalmente en la producción de aceite comestible y en menor medida para confitería, alimentación de aves y ornamentación (Díaz-Zorita *et al.*, 2003). Las nuevas tendencias en salud humana hacia un mayor consumo de alimentos ricos en ácidos grasos insaturados convierte al aceite de girasol en uno de los más beneficiosos por su alto contenido de grasas poliinsaturadas (ácidos grasos oleico, linoleico y linolénico).

Descripción del material vegetal

El girasol pertenece a la familia *Asteraceae*, y su nombre científico es *Helianthus annuus* L. Es una planta herbácea de gran porte, que puede alcanzar los dos metros de altura con un ciclo de vida anual primavera-estival (Fig. 2). En esta especie existen numerosos tipos o subespecies cultivadas como plantas ornamentales, oleaginosas y forrajeras. Se caracteriza por tener raíz pivotante y un sistema de raíces secundarias y terciarias que exploran el suelo en sentido horizontal y vertical. El tallo de consistencia semi-leñosa y maciza tiene un diámetro variable entre 2 y 6 cm. Las hojas son alternas, de color verde oscuro a verde amarillento, pecioladas, dentadas y de áspera velloso tanto en el haz como en el envés. El número de hojas está genéticamente determinado, variando entre 12 y 40 de acuerdo a su ciclo de crecimiento. La inflorescencia, botánicamente un capítulo, posee dos tipos de flores: exteriores (pétalos amarillos), estériles y dispuestas radialmente, tiene por función atraer a insectos polinizadores. Mientras que las interiores son fértiles y están formadas por una corola en forma de tubo. El fruto seco es una cipsela de aproximadamente 3 a 20 mm de largo y 2 a 13 mm de ancho, con un pericarpio fibroso y duro. Las semillas contienen una gran cantidad de ácidos grasos insaturados tales como: linoleico, oleico, palmítico y esteárico (Trápani *et al.*, 2003).



Fig. 2. Plántula de girasol

El estrés hídrico y sus efectos en girasol

El estrés hídrico es uno de los factores más acuciantes que afecta el crecimiento y productividad de las plantas, definiendo la distribución de los cultivos agrícolas según la tolerancia de las diferentes especies y genotipos cultivados. La escasa humedad edáfica tiene un impacto negativo sobre el rendimiento del girasol, lo cual depende del estadio ontogénico de la planta durante el cual ocurra el déficit hídrico. Así, las mayores reducciones en el rendimiento se observan cuando el período de sequía se produce entre floración y maduración de las semillas, aunque ello ocurre sólo cuando la implantación del cultivo ha sido adecuada (Trápani *et al.*, 2003).

En el área central-oeste del país, la superficie sembrada de girasol si bien se ha reducido en los últimos años debido a una disminución en la rentabilidad del cultivo y a una serie de ciclos húmedos “niño”, ha alcanzado en la última campaña agrícola (2015/2016) aproximadamente unas 250.000 ha. Actualmente debido al avance de la soja, el cultivo de girasol ha sumado áreas marginales al sistema agrícola argentino (Adreani, 2008), entre ellas las constituidas por el sur y sur-oeste de Córdoba, este de San Luis y norte de La Pampa. Estas zonas se caracterizan por un régimen hídrico con ciertas particularidades tales como deficiencia hídrica durante el ciclo del cultivo, irregularidad en la distribución de las precipitaciones ocurridas en un determinado año y escasa capacidad de almacenamiento de agua de los suelos por ser principalmente Ustortentes y Haplustoles énticos. Asimismo, el uso generalizado de fertilizantes químicos produjo cambios físico-químicos en suelos y napas, potenciando los efectos de la sequía. A nivel regional (región pampeana subhúmeda-semiárida), la reubicación del girasol en zonas con mayor riesgo agroecológico y tierras de menor calidad afecta directamente su producción, y por ende, a los productores girasoleros, los cuales se estiman varían entre 3 a 5 mil (según campaña agrícola) distribuidos desde el Chaco hasta el sur de la región pampeana.

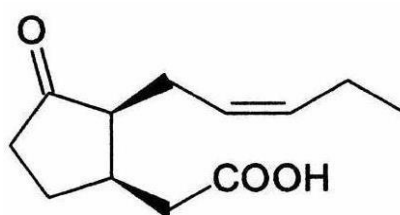
No obstante, el girasol es relativamente tolerante a la sequía debido a la capacidad de su sistema radical para absorber agua de horizontes profundos del suelo, sin limitación de penetración de las raíces, razón por la cual tiene potencial para convertirse en un cultivo importante en ambientes subhúmedos-semiáridos. Además desarrolla algunos mecanismos de adaptación al déficit hídrico comunes a todas las plantas. Como consecuencia del estrés hídrico, durante el desarrollo vegetativo del girasol se observan modificaciones morfológicas tales como reducción de altura y diámetro del tallo principal, número de hojas y área foliar (Agele, 2003; Turhan and Baser, 2004), mientras que se produce un aumento de la longitud radical a expensas de la materia seca. La reducción de la biomasa vegetal resulta en menor superficie foliar, lo cual influye en la eficiencia del uso de la radiación y por ende en la actividad fotosintética (Germ *et al.*, 2005). En la etapa de floración, el estrés hídrico reduce la superficie transpiratoria mediante inducción de la senescencia foliar (Aguirrezábal *et al.*, 2001). Asimismo, se ha comprobado que

la cantidad y distribución de agua tiene un impacto significativo sobre el akenio y el rendimiento en aceite (Iqbal *et al.*, 2005); por el contrario, la calidad del aceite no es una característica significativamente afectada por la sequía (Petcu *et al.*, 2001). Diversas investigaciones han revelado que las señales ambientales impactan directamente sobre los niveles hormonales endógenos influyendo en su homeostasis, lo cual permite a las plantas adaptarse rápidamente a cambios adversos de su ambiente. En respuesta al estrés por sequía se produce incremento en la síntesis de varias fitohormonas tales como Jasmonatos (JAs), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA) y etileno (ET) y disminución en la biosíntesis de otras, tales como giberelinas (GAs) (Van Ha *et al.*, 2014).

Hormonas involucradas en la regulación de la respuesta a estrés hídrico

Jasmonatos (JAs): biosíntesis y catabolismo

Los JAs conforman un grupo de numerosos compuestos precursores o derivados del ácido jasmónico (JA) (Fig. 3) que ocurren naturalmente en el Reino Plantae, y por ser derivados de ácidos grasos poliinsaturados forman parte del grupo de las oxilipinas.



(3R, 7S)- ácido jasmónico
(+)-7-*iso*- JA

Fig. 3. Estructura química del Ácido jasmónico

JA se origina a partir del ácido graso poliinsaturado α -ácido linolénico (α -LA), 18:3 (Fig. 4). En plantas, especialmente las membranas cloroplásticas, constituyen una fuente muy rica de LA esterificado en glicerolípidos y fosfolípidos. Actualmente se postula que la fosfolipasa A (PLA) participa en la reacción inicial para la generación de metabolitos de la vía lipoxigenasa (LOX) produciendo la liberación de LA. En *Arabidopsis thaliana*, la fuente de ácidos grasos para la biosíntesis de JAs proviene de dos vías: una hexadecanoica (16:3) a partir del galactolípidos monogalactosildiacilglicerol (MGDG) (Stelmach *et al.*, 2001), y otra octadecanoica (18:3) a partir del fosfolípido fosfatidilcolina (Ishiguro *et al.*, 2001).

El α -LA es sustrato de la enzima lipoxigenasa (LOX), la cual cataliza la inserción de oxígeno en el átomo de C-9 (9-LOX) ó C-13 (13-LOX), resultando en la formación de hidroperóxidos de ácidos grasos. JA es sintetizado a través de la rama AOS de la vía 13-LOX. La oxigenación en el C-13 del LA por la 13-LOX conduce a la formación de 13-hidroperóxido de ácido linolénico (13-HPOT), el cual es convertido por la acción de una óxido de aleno sintasa (AOS) a un óxido de aleno altamente inestable (ácido 12, 13-epoxioctadecatrieno), el cual en presencia de una óxido de aleno ciclasa (AOC) origina el ácido 12-oxo-fitodienoico (12-OPDA). 12-OPDA, primer compuesto cíclico producido, es reducido por OPDA reductasas 3 (OPR3) al ácido 3-oxo-pentenilo-ciclopentano-octanoico (OPC-8:0), el cual luego de tres ciclos de beta-oxidación origina (+)-7-iso-ácido jasmónico. La beta-oxidación es catalizada por tres enzimas: acil-CoA oxidasa (ACX), la enzima multifuncional (MFP) y la L-3-ketoacil-CoA tiolasa (KAT). (+)-7-iso-ácido jasmónico es convertido rápidamente a su estereoisómero más estable, (-) JA, posteriormente metabolizado a diferentes miembros de la familia de los jasmonatos. Entre ellos podemos mencionar: JA conjugado con aminoácidos a través de una adenilación en el ácido carboxílico de la cadena lateral, catabolizado por JA-amino sintetasa (JAR1), metilación de JA por una metil transferasa específica, hidroxilación en el C-11 o C-12 de la cadena pentenil y la subsiguiente O-glicosilación o sulfonación, descarboxilación de JA a cis-jasmone. En adición, a partir de JA se puede originar ácido cucúrbico por reducción del grupo cetona del anillo ciclopentanona, así como jasmonoil-1- β -glucosa, jasmonoil-1- β -gentiobiosa y hidroxijasmonil-1- β -glucosa. Asimismo, JA se puede conjugar con el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor de etileno (Staswick y Tiryaki, 2004). Recientemente se ha confirmado que el ácido 12-OPDA puede conjugarse con glutatión (GSH) y de este modo ser transportado a vacuola regulando así la disponibilidad de JAs en los tejidos vegetales. En cuanto a la localización celular de la biosíntesis y metabolismo de JA se ha establecido que la misma ocurre en cloroplasto, donde OPDA es sintetizado, en peroxisoma, donde tiene lugar la reducción de OPDA por la OPR3, y los pasos de beta-oxidación, y en citoplasma, donde ocurren las diferentes modificaciones de JA (Wasternack y Kombrink, 2010; Wasternack y Hause, 2013) (Fig. 4).

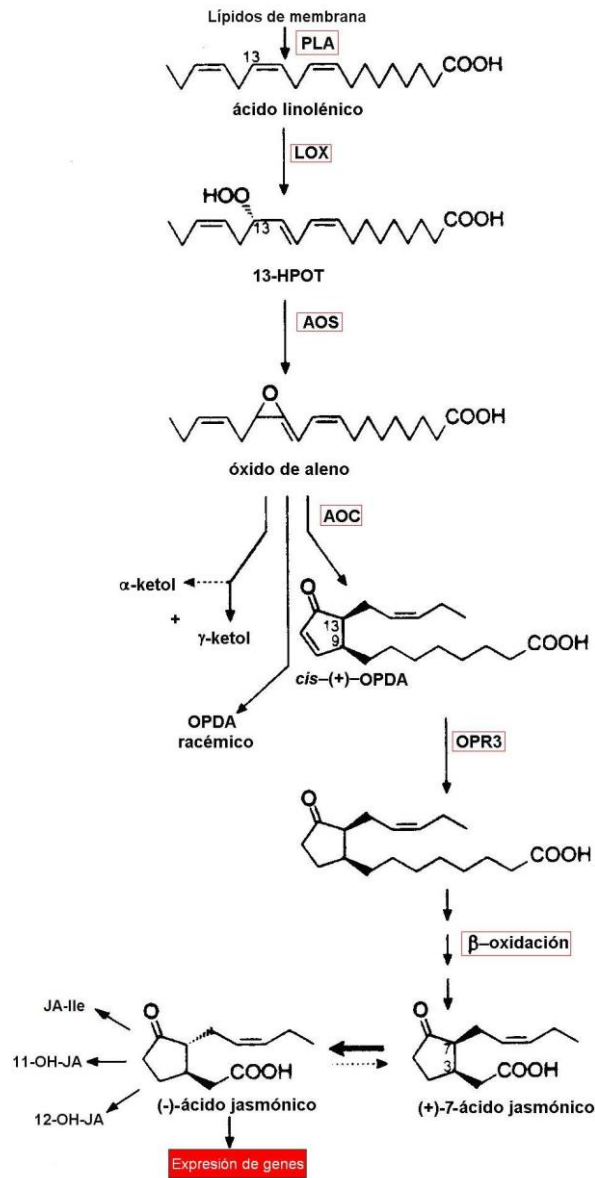


Fig. 4. Biosíntesis y catabolismo de JA (Adaptado de Stenzel *et al.*, 2003)

Rol fisiológico de JAs en procesos normales del desarrollo y durante condiciones de estrés de las plantas

JAs y procesos del desarrollo

En cuanto a las funciones de los JAs, en la década del '80 se comenzaron a describir numerosos efectos fisiológicos implicados en procesos normales del desarrollo de la planta, tales como crecimiento y desarrollo de la raíz, promoción de la senescencia, dehiscencia de la antera y

desarrollo del polen, inhibición de germinación de semillas, maduración de frutos, abscisión y senescencia de hojas, enrollamiento de zarcillos, desarrollo de tricomas glandulares (Wasternack y Hause, 2013).

Maciejewska y Kopcewicz (2003) demostraron la contribución de JAs en el control del crecimiento y el alargamiento de brotes y raíces, y en la formación de yemas florales en *Pharbitis nil*. En *Arabidopsis thaliana*, JA es esencial para el desarrollo del gametofito masculino. En flores de tomate, OPDA, JA y conjugados con aminoácidos y ésteres metílicos se acumulan en elevados niveles, inclusive excediendo el detectado en hojas, encontrándose en proporciones características en los diferentes órganos de la flor (Abdala y Cenzano, 2006).

La participación de JAs en eventos morfogénicos ha sido bien documentada. Además de promover la expansión celular, estas fitohormonas pueden controlar la división celular y la dirección de crecimiento, interviniendo en la formación de tejidos y órganos (Avanci *et al.*, 2010). Xue y Zhang (2007) demostraron que un aumento en los niveles endógenos de MeJA provocaron alteraciones visibles en la morfogénesis de soja.

JAs y condiciones de estrés abiótico

Asimismo, los JAs fueron propuestos como moléculas señal que participan en las respuestas de las plantas a una gran variedad de factores abióticos (Wasternack y Hause, 2002). Particularmente, ha sido demostrado que los niveles endógenos de JAs incrementan frente a sequía (Kang *et al.*, 2005). No obstante, en ciertos casos la acumulación de JAs durante este estrés no es estable; por ejemplo, un incremento transitorio en el contenido endógeno de JA se observó en plántulas de soja sometidas a estrés hídrico, y una subsiguiente disminución a las 4 h (Creelman y Mullet, 1995). En diversas especies vegetales una extensa bibliografía soporta la participación de JAs en la respuesta a estrés hídrico. En este sentido, el tratamiento con sorbitol o manitol produjo un considerable incremento en los niveles de JAs (JA y su precursor OPDA) en plantas de cebada, tomate y *Arabidopsis thaliana* (Kramell *et al.*, 2000; Abdala *et al.*, 2003; Seltmann *et al.*, 2010). Similarmente, un incremento de JA fue reportado en hojas de *Asparagus officinalis*, en plántulas de *Carica papaya* y en plantas de *Pinus pinaster* Ait expuestas a estrés hídrico (Pedranzani *et al.*, 2007). En raíces de plantas de citrúmelo, una rápida y transitoria acumulación de JA fue observada a pocas horas del estrés hídrico severo, y este incremento permaneció levemente más alto comparado con el control hasta el final del experimento (de Ollas *et al.*, 2013). Recientemente, altos niveles de JA, OPDA y JA-Ile fueron detectados en raíces estresadas de una variedad tolerante de garbanzo (*Cicer arietinum*), lo cual sugiere un rol de JAs en eventos de señalización temprana de la respuesta a estrés hídrico en esta especie, así como su participación

en mecanismos que le confieren tolerancia a este tipo de estrés (de Doménico *et al.*, 2012). Asimismo, Grebner *et al.* (2013) demostraron en raíces de plantas de *Arabidopsis* silvestres una acumulación de OPDA y JA, mientras que el derivado JA-Ile mantuvo sus niveles al límite de detección. De modo similar, en plantas mutantes *lox2*, *lox3* y *lox4* se registró la misma tendencia para OPDA y JA; en mutantes *lox6* dichos compuestos fueron basales.

Por otra parte, es bien conocido que además los niveles endógenos de JAs incrementan en respuesta a otros tipos de estreses abióticos tales como estrés osmótico (Kramell *et al.*, 2000), salino (Reginato *et al.*, 2012) y frío (Garbero *et al.*, 2010).

Giberelinas (GAs): biosíntesis y catabolismo

Las GAs son compuestos naturales de las plantas superiores que actúan como importantes reguladores de un amplio espectro de procesos del crecimiento y desarrollo. Respecto a su estructura química, las GAs son diterpenos tetracíclicos ácidos con un esqueleto básico formado por un anillo de *ent*-giberelano (Fig. 5). Existen más de 121 GAs, la mayoría de las cuales fueron aisladas de vegetales superiores; sin embargo, sólo un grupo reducido presenta actividad biológica: GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇.

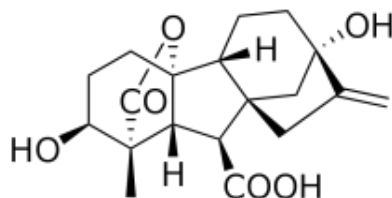


Fig. 5. Estructura química de GAs

Las GAs son sintetizadas a partir del geranylgeranyl difosfato (GGDP), precursor común de los diterpenos de 20C. El primer paso específico en la vía de síntesis de GAs es la ciclización de GGDP a *ent*-copalil difosfato (CPP). Este compuesto se convierte seguidamente en *ent*-kaureno, el cual por oxidaciones secuenciales produce *ent*-kaurenol, *ent*-kaurenal y ácido *ent*-kaurenoico. Posteriormente el ácido kaurenoico se hidroxila y luego, por contracción del anillo β, se origina GA₁₂-aldehído, subsecuentemente éste se oxida para formar GA₁₂. Este compuesto puede incorporar un grupo hidroxilo en el C-13 y convertirse en GA₅₃, primer miembro de la vía de síntesis 13-hidroxilativa. GA₁₂ y GA₅₃ pueden convertirse a varias GAs intermediarias y

bioactivas, incluyendo GA₁ y GA₄, a través de dos vías paralelas que incluyen una serie de pasos de oxidación, catalizados por GA 20-oxidasas (GA20ox) y 3-oxidasas (GA3ox) (Sun, 2008) (Fig. 6).

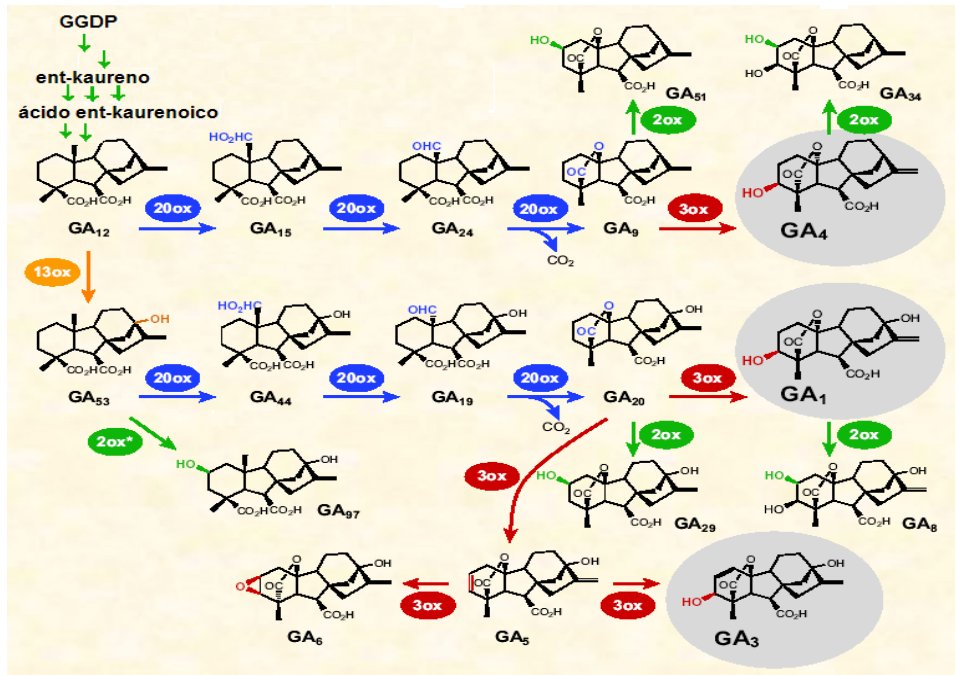


Fig. 6. Biosíntesis de GAs (Adaptado de Sun, 2008).

Rol fisiológico de GAs en procesos normales del desarrollo y durante condiciones de estrés de las plantas

GAs y procesos del desarrollo

Estas fitohormonas modulan una amplia diversidad de respuestas del crecimiento vegetativo y reproductivo de las plantas. Los efectos más evidentes se observan en la germinación de las semillas, ya que sustituyen los requerimientos de luz o frío que algunas especies necesitan para germinar (Seo *et al.*, 2009). En cereales regulan la hidrólisis de las sustancias de reserva presentes en el endosperma, a partir de la síntesis y liberación de enzimas hidrolíticas (como la α -amilasa) (Ogawa *et al.*, 2003). Además, regulan el desarrollo del polen y la inducción de la floración, el cuajado de los frutos, la promoción de la elongación del hipocótilo y del tallo (Yamaguchi, 2008), entre otros. Las GAs, de forma similar a las restantes fitohormonas, producen efectos pleiotrópicos durante el desarrollo y crecimiento. Estas respuestas además influyen a nivel celular. En tal sentido, GAs activan la división celular al acortar la interfase del ciclo celular e inducir a las células en subfase G₁ a sintetizar ADN. También modifican la extensibilidad de la

pared celular, inducen la deposición transversal de los microtúbulos y participan en la regulación del transporte de calcio.

GAs y condiciones de estrés abiótico

Las giberelinas constituyen otro importante grupo de fitohormonas involucradas en las respuestas a distintos estreses abióticos (Colebrook *et al.*, 2014), los cuales influyen directamente sobre los niveles endógenos de GAs bioactivas. Particularmente, diversos estudios demostraron que GAs marcadamente disminuyen ante situaciones de estrés hídrico debido a que se inhibe su biosíntesis y/o se induce su degradación (Abdalla and El-Khoshiban, 2007). La reducción del crecimiento en respuesta a estrés hídrico puede ser debida, al menos parcialmente, a una baja producción endógena de GAs o bien a la sensibilidad de la planta para responder a dicha hormona. Los primeros reportes demostraron que el estrés hídrico redujo la acumulación de GAs en lechuga (Aharoni *et al.*, 1977), álamo (Rood *et al.*, 2000) y durante el llenado del grano en arroz (Yang *et al.*, 2001). Asimismo, en hojas de plántulas de maíz sometidas a estrés hídrico (ocasionado por PEG) los niveles de GAs disminuyeron considerablemente. De este modo, durante los primeros tres días de tratamiento el nivel de GA₃ decreció un 76% respecto al control. En lo sucesivo, el nivel hormonal declinó más rápidamente y alcanzó 48.86% y 29.26% luego de 3 y 7 días de tratamiento, respectivamente (Wang *et al.*, 2008).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

- 1- El estrés hídrico afecta el crecimiento temprano de plántulas de girasol produciendo cambios morfológicos y fisiológicos.
- 2- Durante el estrés hídrico se producen modificaciones en los niveles endógenos de fitohormonas relacionadas con la respuesta a estrés hídrico y con el crecimiento vegetal tales como Jasmonatos y GAs.
- 3- Al restablecerse las condiciones hídricas favorables -período de recuperación- los parámetros morfológicos y fisiológicos alcanzan valores similares a aquellos registrados para plántulas crecidas bajo condiciones óptimas de humedad.

Objetivo General

Caracterizar la respuesta a estrés hídrico moderado de plántulas de girasol de la línea B71 (tolerante a estrés hídrico) a través del análisis de parámetros morfológicos y fisiológicos.

Objetivos Específicos

- 1- Medir parámetros de crecimiento en plántulas crecidas en condiciones óptimas de humedad, sometidas a estrés hídrico moderado y rehidratación durante 3, 5 y 8 días (período de recuperación).
- 2- Cuantificar los niveles hormonales endógenos (ácido jasmónico, giberelina A₁ y giberelina A₄) en plántulas crecidas bajo las condiciones mencionadas en el objetivo específico 1.
- 3- Analizar la respuesta de las plántulas al restituirse las condiciones hídricas adecuadas luego del estrés. Correlacionar dicha respuesta con la sensibilidad de la línea en estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

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

1. Ensayo de germinación

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

2. Ensayo de crecimiento temprano y tratamiento de estrés hídrico

Las cincuenta semillas seleccionadas se transplantaron en bandejas conteniendo arena fina como sustrato. El contenido hídrico al momento de la siembra fue de 60% de capacidad de campo. Cada bandeja se colocó dentro de una bolsa de nylon abierta en la parte superior a fin de mantener cierta humedad ambiental (no saturación). Las mismas se mantuvieron durante 15 días en Cuartos Ambientales programados según condiciones antes descriptas. A los 4 días del trasplante (6 días de edad de las plántulas), y posteriormente cada tres días hasta la finalización del experimento, las plántulas fueron regadas mediante ascenso capilar de acuerdo a los siguientes tratamientos:

- 1- Hoagland 50% de fuerza iónica (control).
- 2- Manitol 400 mM (agente de estrés hídrico moderado).
- 3- Control Reh. (control del período de rehidratación)
- 4- Manitol 400 mM + 3 días Hoagland 50% de fuerza iónica (estrés hídrico y posterior rehidratación por 3 días: Reh-T1).
- 5- Manitol 400 mM + 5 días Hoagland 50% de fuerza iónica (estrés hídrico y posterior rehidratación por 5 días: Reh-T2).
- 6- Manitol 400 mM + 8 días Hoagland 50% de fuerza iónica (estrés hídrico y posterior rehidratación por 8 días: Reh-T3).

Se realizaron 5 ensayos independientes. Durante y al finalizar el experimento, se evaluó: conductancia estomática y longitud de parte aérea (LPA).

3. Ensayo de rehidratación

Luego de 5 días de tratamiento de estrés hídrico moderado (riego con manitol 400 mM) las plántulas estresadas se colocaron en condiciones óptimas de crecimiento (riego con Hoagland 50% de fuerza iónica durante 3, 5 y 8 días) con la finalidad de evaluar la recuperación post-estrés. Para cada tiempo de rehidratación (Rec-T1, T2 y T3), durante el transcurso y al momento de cosecha se midió: conductancia estomática y LPA.

4. Determinación de longitud de parte aérea y conductancia estomática

Al 4to. día de post-siembra en arena, se midió LPA (altura del tallo principal desde la base hasta el ápice) a la totalidad de plántulas emergidas para cada tratamiento, y a continuación se seleccionaron 15 entre aquellas que presentaron una longitud aérea comprendida dentro del rango ($\bar{X} \pm \delta$). Posteriormente, a los 10 y 18 días post-siembra se realizaron dos lecturas de LPA a las 15 plantas seleccionadas para cada tratamiento.

La lectura de la conductancia estomática se obtuvo a partir de hojas sanas y maduras con un porómetro LI-1600 (Li-Cor, Inc.). La medición se efectuó sobre la parte media de la hoja, considerándose siempre la misma. Se realizaron cinco lecturas independientes, las cuales fueron registradas a las 9:00 am.

5. Determinación de niveles hormonales endógenos

La extracción y purificación de JA, GA₁ y GA₄ se llevó a cabo según protocolo de Durgbanshi *et al.* (2005) con modificaciones. Para ello, 100 mg de peso seco de parte aérea y radical de plántulas (controles, estresadas y rehidratadas) se trituraron en mortero con N₂ líquido y 2 ml de agua deionizada (solvente de extracción). Los extractos se transvasaron a tubos Falcon de 50 ml y se le adicionaron los estándares internos correspondientes a cada una de las fitohormonas arriba mencionadas. Cada muestra se homogeneizó brevemente en ultraturax (20 seg.) y luego se centrifugaron a 7500 rpm durante 15 min. Se recogió el sobrenadante y se ajustó el pH a 2,8-3,2 con ácido acético 30%. Posteriormente se realizó una doble partición con 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 1,5 ml de metanol, filtraron a través de un filtro de jeringa (velocidad de flujo menor a 1 ml/min.) en cámara de vacío y se secaron a temperatura ambiente en SpeedVac. El análisis de los compuestos de interés se efectuó mediante Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas Tándem (LC-ESI/MS-MS), equipo que detecta compuestos con actividad hormonal a nivel de pmol. Para ello, los extractos secos se resuspendieron en 50 µl de metanol para la purificación mediante un cromatógrafo Alliance 2695

(Waters, Inc., California, USA) equipado con una bomba cuaternaria con auto inyector de muestra. Se empleó una columna Resteck C18 (Resteck USA, 2.1 x 100 mm, 5 μ m) a 25°C, con un volumen de inyección de 10 μ l. La elución se llevó a cabo en gradiente con un sistema de solvente binario: 0.2% HOAc en H₂O (solvente B)/ MeOH (solvente A) a una velocidad de flujo de 200 μ l min⁻¹, procediendo con las siguientes proporciones (v/v) de solvente A: (t (min), %A):(0, 40), (25, 80). La identificación y cuantificación se procedió mediante un espectrómetro de masa de doble cuadrupolo (Micromass Quatro Ultimatm PT, Manchester City, UK). Se utilizó una fuente de electrospray en modo de ionización negativo para todos los análisis. La cuantificación se llevó a cabo por inyección de las muestras en modo MRM (Monitoreo de Reacciones Múltiples). La adquisición de datos por MRM se efectuó por monitoreo de iones parentales y transiciones para JA, GA₁ y GA₄, y los estándares correspondientes a cada una.

Reproducibilidad de las determinaciones

Las experiencias se realizaron utilizando un diseño totalmente aleatorizado con 4 repeticiones por cada tratamiento: control, estrés hídrico moderado y rehidratación post-estrés.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante Análisis de la Varianza de una vía (ANNOVA) a fin de determinar diferencias significativas entre medias de las variables evaluadas. Se empleó a posteriori un test de Rangos Múltiples (LSD de Fisher; $p \leq 0.05$). El software utilizado fue InfoStat Proffesional.

RESULTADOS

A fin de abordar la caracterización morfo-fisiológica de plántulas de la línea tolerante B71, se determinó la longitud de parte aérea, conductancia estomática y contenido endógeno de fitohormonas (JA, GA₁ y GA₄) en respuesta a estrés hídrico moderado y rehidratación posterior durante 3, 5 y 8 días (Figs. 7, 8, 9, 10 y 11).

Evaluación morfológica

A los 4, 10 y 18 días se midió LPA (Fig. 7). Al inicio del tratamiento (4^{to} día) no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos ensayados. Por el contrario, a los 10 días post-siembra se registró mayor LPA en la condición control. Notablemente, no se observó modificación en este parámetro durante el transcurso del período de rehidratación. A los 18 días, las plántulas controles presentaron mayor crecimiento con respecto a los 10 días, lo cual se evidenció en un incremento significativo de 10 veces en LPA. Similarmente, las plántulas estresadas mostraron un leve crecimiento -aunque significativo- en comparación al registrado a los 10 días. Las plántulas evidenciaron un aumento gradual en LPA durante el tiempo de rehidratación, con diferencias estadísticamente significativas a los 8 días en relación a las plántulas estresadas (Fig. 7).

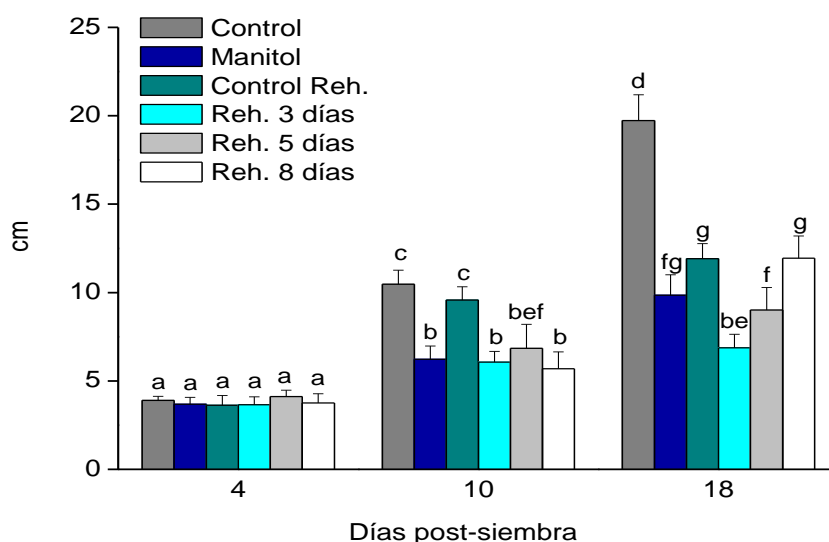


Fig. 7. Longitud de parte aérea (LPA) de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=5 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Evaluación fisiológica

Conductancia estomática

La conductancia estomática fue evaluada a 6 días del comienzo del riego con manitol (10 días de edad de las plántulas) a fin de verificar un efecto inicial rápido del estrés hídrico impuesto. Se observó que el estrés ocasionó un descenso significativo de 9 veces respecto a la condición control. Posteriormente, al finalizar el período de estrés (18 días de edad de las plántulas) se evidenció una reducción de 27 veces en relación a los valores obtenidos en la condición control (Fig. 8A).

La conductancia estomática es un parámetro fisiológico afectado no sólo por factores ambientales sino también por su propia fluctuación diaria (Collatz *et al.*, 1991) así como por la edad de la hoja (Vos and Oyarzún, 1987), entre otras variables. Por lo tanto, la diferencia observada entre valores control de plántulas de 10 y 18 días de edad sería consecuencia, al menos en parte, de la desigualdad en su crecimiento foliar.

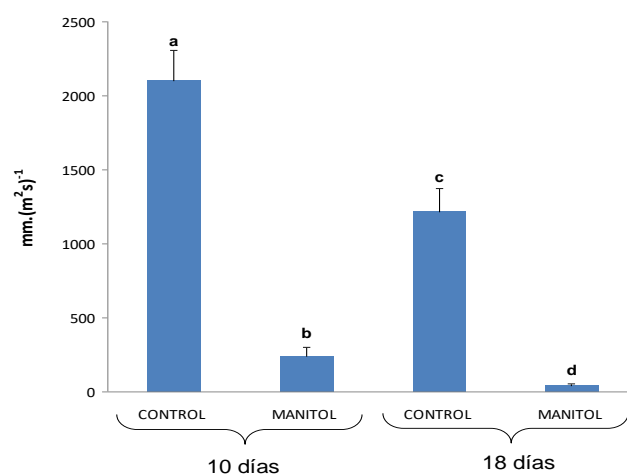


Fig. 8A. Conductancia estomática en hojas de plántulas de la línea B71, controles y tratadas con manitol ($n=5 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Al momento de cosecha, una caída abrupta y significativa (28 veces) en la conductancia estomática se detectó en respuesta al tratamiento de estrés hídrico (manitol 400 mM). Posteriormente, durante el transcurso de la rehidratación se registró una leve y gradual recuperación en la conductancia estomática, aunque no fue posible alcanzar el valor detectado para las plántulas controles a ningún tiempo considerado (Fig. 8B).

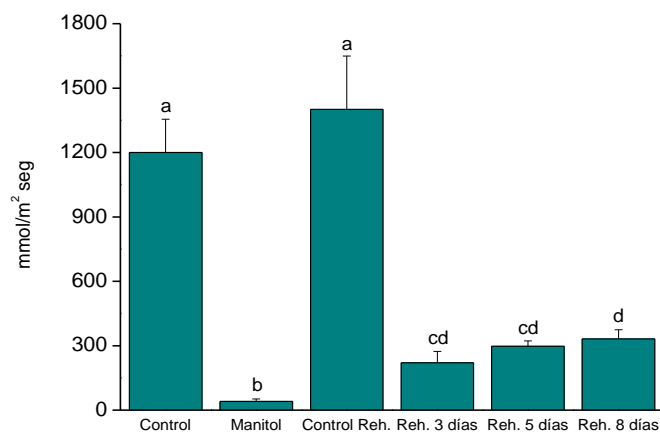


Fig. 8B. Conductancia estomática en hojas de plántulas de la línea B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=5 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Contenido hormonal endógeno

Ácido jasmónico en plántulas estresadas y rehidratadas

En las Fig. 9A y B se muestran los niveles endógenos de JA detectados en parte aérea y radical de plántulas de la línea B71.

En respuesta al tratamiento de estrés hídrico generado por la aplicación de manitol, no se observó aumento en el contenido endógeno de JA en parte aérea con respecto al contenido cuantificado en las plántulas controles (Fig. 9A). Por otra parte, a los 5 días de rehidratación se registraron niveles endógenos constantes de JA en parte aérea en relación a los niveles de las plántulas controles rehidratadas. A partir del 5^{to}. día de rehidratación, el contenido de JA se recuperó en relación al de las plántulas estresadas (Fig. 9A).

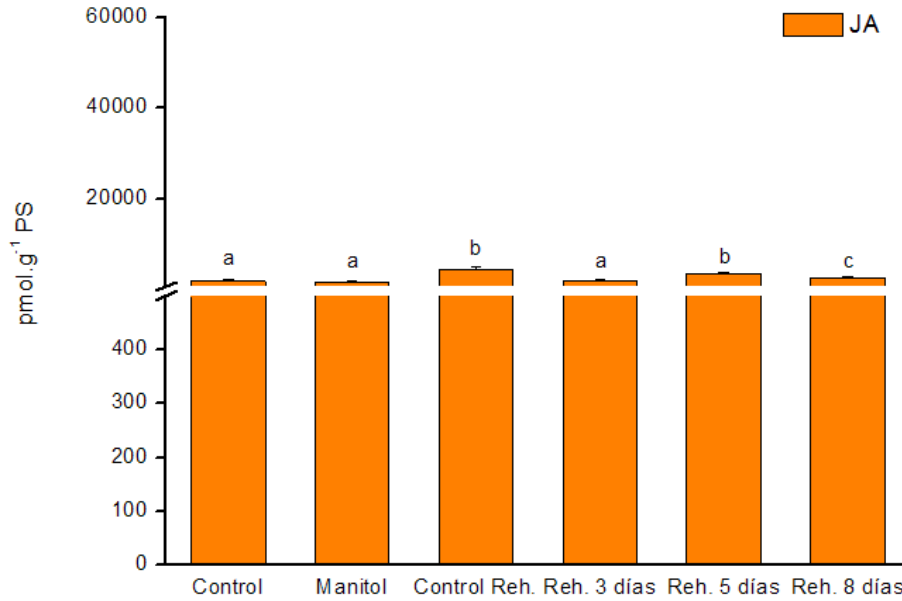


Fig. 9A. Niveles endógenos de JA en parte aérea de plántulas B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=5 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

En parte radical el contenido endógeno de JA incrementó significativamente en las plántulas estresadas (Fig. 9B). No obstante, a los 5 días de rehidratación esta fitohormona alcanzó mayores valores que los cuantificados en la condición Control Reh., observándose además una recuperación post-estrés. Notablemente, un descenso significativo en el nivel de JA se evidenció a los 8 días de rehidratación (Fig. 9B).

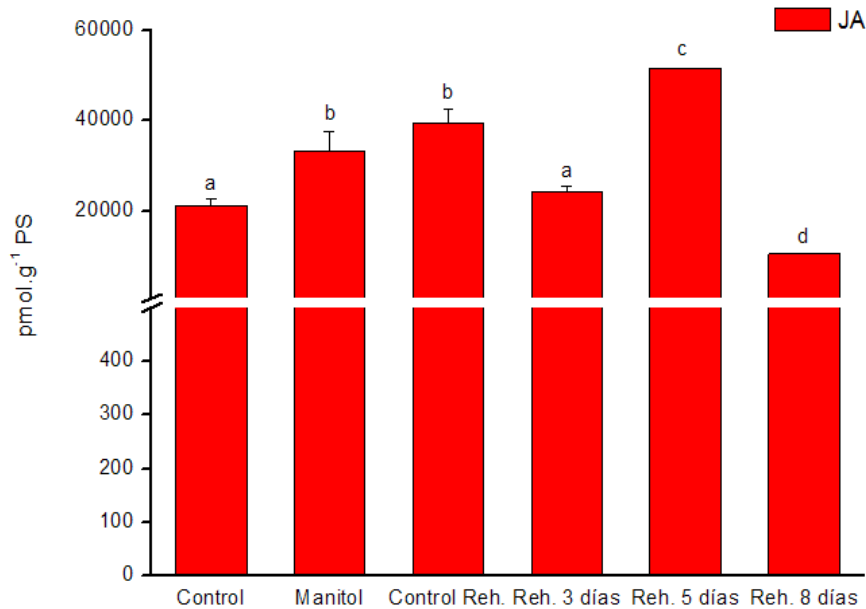


Fig. 9B. Niveles endógenos de JA en parte radical de plántulas B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días ($n=5 \pm SE$); $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Giberelinas en plántulas estresadas y rehidratadas

Entre las condiciones ensayadas, en parte aérea el estrés hídrico moderado generado por manitol 400 mM incrementó significativamente (3 veces) el nivel de GA₁ respecto al control (Fig. 10A). La rehidratación por 3 días gatilló un incremento sustancial de GA₁, el cual permaneció estable hasta el final del período de rehidratación (Reh. 8 días). Asimismo, a partir del 5^{to}. día, el contenido de GA₁ se recuperó, superando el valor registrado en plántulas del Control Reh. (Fig. 10A).

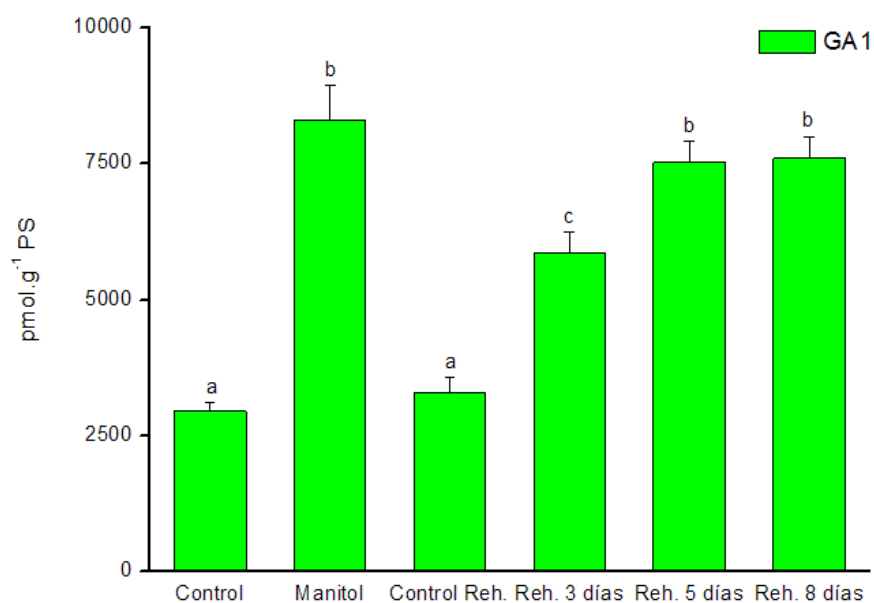


Fig. 10A. Niveles endógenos de GA₁ en parte aérea de plántulas B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días (n=5 ± SE); P < 0.05. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

En respuesta al estrés hídrico moderado, GA₁ disminuyó en forma leve -no significativa- en parte radical de las plántulas tolerantes (Fig. 10B). Luego, esta fitohormona presentó un aumento gradual y sostenido a partir del comienzo del período de rehidratación (Reh. 3 días), evidenciando diferencias estadísticamente significativas respecto a Control Reh. sólo a los 8 días. Asimismo, una recuperación post-estrés fue notoria únicamente a los 8 días (Fig. 10B).

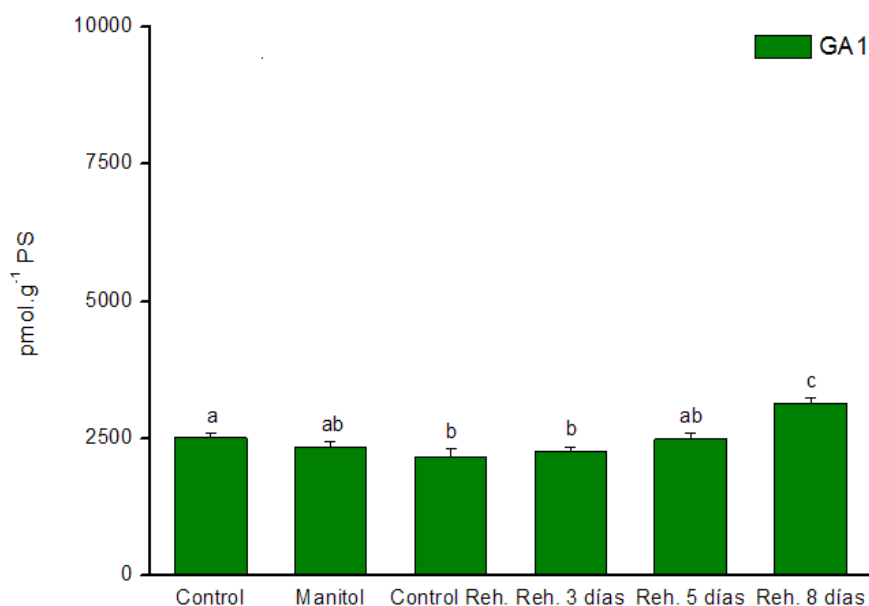


Fig. 10B. Niveles endógenos de GA₁ en parte radical de plántulas B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días (n=5 ± SE); P < 0.05. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Respecto al contenido de GA₄ en parte aérea, un incremento significativo de 2 veces se registró en respuesta a la condición de estrés hídrico moderado (Fig. 11A). A partir del tercer día de rehidratación, las plántulas evidenciaron una adecuada recuperación, ya que el valor obtenido para GA₄ superó al de las plántulas controles rehidratadas, y posteriormente se mantuvo constante hasta el final del período de rehidratación. Por otra parte, no se observaron cambios entre los tiempos de rehidratación considerados (Reh. 3, 5 y 8 días) (Fig. 11A).

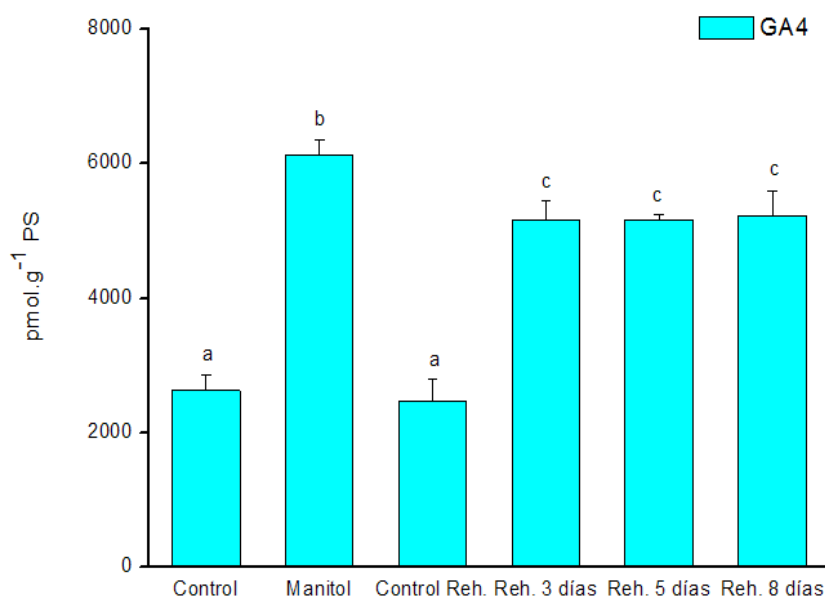


Fig. 11A. Niveles endógenos de GA₄ en parte aérea de plántulas B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días (n=5 ± SE); P < 0.05. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

En parte radical, el contenido endógeno de GA₄ se redujo significativamente en las plántulas estresadas (Fig. 11B). Similarmente a lo observado en parte aérea, a partir del tercer día de rehidratación la parte radical mostró un incremento (aunque no significativo) de GA₄ comparado con aquel cuantificado en las plántulas controles rehidratadas; como así también, no hubo variaciones en el contenido de esta fitohormona entre los distintos tiempos de rehidratación. Durante el período de rehidratación se observó una recuperación de GA₄, la cual fue suficiente para alcanzar y superar el nivel de hormona registrado en las plántulas estresadas (Fig. 11B).

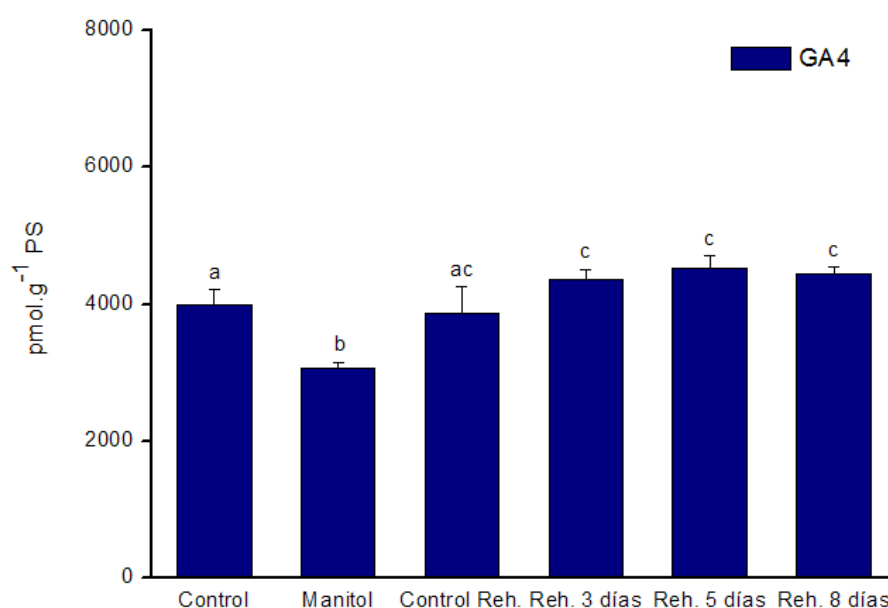


Fig. 11B. Niveles endógenos de GA₄ en parte radical de plántulas B71, controles, tratadas con manitol y rehidratadas por 3, 5 y 8 días (n=5 ± SE); P < 0.05. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

El déficit hídrico -problema que se agudiza en el marco del cambio climático global- ocasiona con frecuencia períodos de estrés hídrico que impactan negativamente sobre los cultivos. Así, este tipo de estrés abiótico es uno de los factores ambientales más acuciantes que afecta el crecimiento y productividad de las plantas (Roche *et al.*, 2009), definiendo la distribución de los cultivos agrícolas según la tolerancia de las diferentes especies y genotipos cultivados. Sus efectos adversos son de naturaleza heterogénea y pueden afectar a todas las etapas ontogénicas de la planta. Sin embargo, dependiendo de cada especie, etapas críticas como germinación, estadio de plántula y floración pueden ser las más sensibles frente a condiciones de estrés hídrico (Ahmad *et al.*, 2009).

Los efectos del estrés hídrico en las plantas han sido bien documentados en muchos informes. Sin embargo, las respuestas combinadas a sequía y rehidratación son relativamente escasas. La extensión del período de recuperación depende de la especie, intensidad y duración del período de estrés (Xu *et al.*, 2010).

Ha sido bien documentado que la fase inicial de crecimiento y establecimiento de una planta puede verse afectada por situaciones de estrés hídrico, el cual representa uno de los principales estreses abióticos que limita severamente el desarrollo y productividad de los cultivos (Shao *et al.*, 2008). Entre los cultivos de interés agrícola, el girasol es una especie de tolerancia moderada frente a estrés hídrico. En este estudio, plántulas de girasol de la línea endocriada B71 (tolerante a estrés hídrico) presentaron algunas alteraciones en parámetros morfológicos y fisiológicos luego de ser sometidas a un breve período de estrés hídrico moderado generado por la aplicación de manitol. De acuerdo a nuestros resultados, la reducción en la longitud de parte aérea en plántulas estresadas podría estar asociada con una limitación en la división y expansión celular debido a una disminución en la turgencia ocurrida en respuesta al estrés hídrico. Similarmente, un descenso en el valor de este parámetro también fue reportado en diversas especies tales como papa (Heuer y Nadler, 1995), soja (Specht *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004), *Vigna unguiculata* (Manivannan *et al.*, 2007), *Abelmoschus esculentus* (Sankar *et al.*, 2007; 2008) y *Petroselinum crispum* (Petropoulos *et al.*, 2008) sometidas a distintos niveles de estrés hídrico (Keyvan, 2010). En adición, la longitud de parte aérea de plántulas de citrus se redujo hasta un 25% en respuesta a estrés hídrico (Wu *et al.*, 2008).

Es bien conocido que el “status” hídrico de la hoja se relaciona directamente con la conductancia estomática y la tasa transpiratoria (Medrano *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que el riego con manitol 400 mM durante 14 días produjo un estrés hídrico moderado, lo cual generó una importante reducción de la conductancia estomática en plántulas de 10 días de edad. Este hallazgo concuerda con Boureima *et al.* (2011) y Ghobadi *et al.* (2013) quienes también reportaron un descenso en el valor de conductancia estomática en

plantas de sésamo y trigo sometidas a estrés hídrico generado por supresión del riego. Notablemente, la disminución en los valores de conductancia estomática entre plántulas de 10 y 18 días de edad podría atribuirse al avance del propio crecimiento vegetativo. En concordancia, en trigo se registró una reducción de la conductancia a medida que transcurrió la ontogenia de la planta (Xie and Lou, 2003). Cabe destacar que en nuestro sistema experimental la conductancia estomática no decayó a cero en ninguna de las condiciones ensayadas. Esto indicaría que el estrés hídrico impuesto ocasionó sólo el cierre parcial de los estomas, por lo tanto, las plántulas fueron capaces de mantener un valor umbral de conductancia estomática.

Las plantas por su característica de organismos sésiles no pueden escapar de los distintos eventos de estrés ambiental, por lo tanto deben ser capaces de percibir y responder apropiadamente a los mismos. Este mecanismo de respuesta al estrés es complejo y requiere de un sistema de control que se active de acuerdo a las tensiones externas. Entre los posibles mecanismos de regulación fisiológica uno de los más estudiados es el mediado por diversas fitohormonas. Entre algunas de las hormonas implicadas en la respuesta frente a las condiciones de estrés ambiental se encuentran los JAs y el ácido abscísico (ABA) (Sreenivasulu *et al.*, 2012; Wasternack, 2013; Llanes *et al.*, 2016). Las GAs si bien están involucradas en el crecimiento vegetal, actualmente se reconoce su rol en las respuestas al estrés (Llanes *et al.*, 2016).

Tradicionalmente, los JAs han sido asociados con las respuestas de defensa frente a estreses bióticos. No obstante, en general, una característica común de la mayoría de las plantas utilizadas como modelos experimentales es su capacidad para responder a situaciones de estrés biótico y abiótico a través de la inducción de la vía de síntesis de JA (Wasternack y Hause 2002). Particularmente, en respuesta a estrés abiótico generado por NaCl o manitol/sorbitol se han observado diferentes patrones de JAs (Kang *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2009). Algunas investigaciones recientes demostraron que la acumulación de JA no es una respuesta estable durante el estrés hídrico. Por ejemplo, se reportó que plantas de soja sometidas a estrés hídrico exhibieron un aumento transitorio de JA, seguido de una disminución por debajo de los niveles normales (Creelman and Mullet, 1995). Respecto a nuestros resultados, en parte aérea de plántulas sometidas a estrés hídrico moderado no se registró modificación en el contenido de JA, hecho que concuerda con lo informado por Aimar *et al.* (2014) en hojas estresadas de un cultivar de *P. virgatum*, en las cuales JA no fue afectado por el estrés hídrico aplicado mediante supresión del riego. A pesar de estas fluctuaciones, en la literatura existen numerosos antecedentes que demuestran un aumento endógeno de JA bajo estrés abiótico. Por ejemplo, JA aumentó en hojas de *Asparagus officinalis* (Gapper *et al.*, 2002), en plántulas de *Carica papaya* (Mahouachi *et al.*, 2007), en plantas de *Pinus pinaster* (Pedranzani *et al.*, 2007), en hojas y raíces de *Oryza sativa* (Du *et al.*, 2013) y en portainjertos de un cítrico comercial (de Ollas *et al.*, 2013) expuestos a condiciones de sequía. Otros jasmonatos tales como OPDA y JA-Ile, podrían estar actuando como moléculas señal para mediar la respuesta a estrés en la parte aérea.

La raíz constituye el primer órgano que rápidamente sensa la escasez hídrica del suelo, y debido a esto debe ser un punto central en la respuesta de la planta frente al estrés hídrico. Así, la longitud de la raíz principal y la producción de raíces laterales representan las principales características afectadas por el estrés hídrico. En este trabajo, una acumulación significativa de JA en parte radical posterior a la aplicación de manitol nos permite proponer que esta fitohormona podría desempeñar un rol específico en raíz mediante la inhibición de la elongación y división de sus células y, como consecuencia, de su longitud en respuesta a estrés hídrico moderado en plántulas de esta línea tolerante. Este resultado nos lleva a confirmar que las raíces constituyen un sitio *per se* de síntesis de JA, independientemente de la parte aérea. De este modo, JAs endógenos son capaces de modificar la arquitectura radical en plántulas de girasol, tal como fue reportado previamente por Corti-Monzón *et al.* (2012). En la línea tolerante bajo estudio (B71), ésta puede ser considerada una adaptación morfológica sustancial para la producción de un sistema radical adecuado y el establecimiento de la plántula. En concordancia con nuestros resultados, el contenido endógeno de JA aumentó en células radicales de maíz sometidas a estrés hídrico (Xin *et al.*, 1997). Similarmente, en raíces de arroz el tratamiento de estrés hídrico gatilló un incremento de JA así como la inducción de genes que codifican enzimas de la biosíntesis de JA (Tani *et al.*, 2008). Poltronieri *et al.* (2014) informaron un notorio incremento en el contenido endógeno de OPDA, JA y JA-Ile en raíces de una variedad de garbanzo tolerante a estrés hídrico, lo cual fue concomitante con la inducción de la expresión de genes de la biosíntesis de JA. Dichos resultados sugieren que estas oxilipinas podrían actuar coordinadamente para la total activación de la respuesta de las raíces a estrés hídrico. De acuerdo a lo antes expuesto, en ciertos estudios, se reportó que JA es capaz de mejorar la tolerancia de las especies cultivadas a la sequía; no obstante, en otros, esta fitohormona ocasionó una notable reducción en su crecimiento y rendimiento. Por consiguiente, el rol específico de JA en el estrés hídrico continúa siendo controvertido. Esto puede asociarse a que las respuestas observadas dependen de la especie vegetal y del tejido en cuestión así como también de las diferentes intensidades de déficit hídrico.

Es bien conocido que las GAs están implicadas en procesos del crecimiento de las plantas, aunque en los últimos años su rol estuvo asociado también con la tolerancia a estrés abiótico. Así, en respuesta a un tipo de estrés abiótico específico, el contenido endógeno de GAs podría ser responsable de la supresión o promoción del crecimiento (Colebrook *et al.*, 2014). Particularmente, existe escasa literatura referente a la influencia del déficit hídrico sobre el metabolismo de GAs, aunque el estrés osmótico -a menudo empleado como indicador de estrés hídrico- fue reportado por producir una disminución en el contenido endógeno de GAs en hojas de maíz (Wang *et al.*, 2008). En contraposición, nuestros resultados indican que el aumento en el contenido de GAs de parte aérea, gatillado por la aplicación de manitol (estrés hídrico moderado), estuvo asociado con la reducción en la longitud de la parte aérea registrada en las plántulas estresadas. Este hecho se debería al rol predominante que desempeñan las GAs en la inhibición

de la proliferación y expansión celular en situaciones de estrés abiótico. Estudios previos han demostrado la función de GAs en la restricción del crecimiento en respuesta a estrés abiótico. Por ejemplo, la exposición de plántulas de *Arabidopsis* a una baja concentración de manitol resultó en una reducción del 50% del tamaño foliar debido al efecto inhibitorio de GAs sobre el crecimiento celular (Skirycz *et al.*, 2011; Claeys *et al.*, 2012). Por otra parte, el conocimiento de la vía de síntesis de GAs y su regulación demostró que existe un control local de la producción de GAs activas a través de la planta, lo cual sugiere una regulación de su producción independiente entre la parte aérea y radical. En este estudio, la disminución en el contenido endógeno de GAs detectada en parte radical se debería probablemente a una inhibición de la vía de síntesis y/o una activación de su catabolismo en respuesta a estrés hídrico. De hecho, ha sido reportado que múltiples genes involucrados en la biosíntesis de GAs son regulados negativamente. Por otro lado, a menudo, diferentes procesos del crecimiento mediados por GA involucran complejas interacciones con otras fitohormonas (Gao *et al.*, 2011). En tal sentido, diversos estudios revelaron que alteraciones en el contenido endógeno de GA pueden influenciar la acumulación, transporte, señalización e incluso las funciones fisiológicas de otras hormonas. Así, la represión de la biosíntesis de GA podría estar mediada por la activación de la biosíntesis de ABA en raíces de líneas de arroz tolerantes a estrés hídrico (Moumeni *et al.*, 2011). Conjuntamente, estos resultados sugieren que el control hormonal del crecimiento vegetal implica una compleja red de regulación entre numerosas fitohormonas.

El “crosstalk” entre hormonas vegetales es un fenómeno común que puede atribuirse a la plasticidad en las respuestas de las plantas frente a estrés y a la regulación precisa de la expresión génica. En procesos normales del crecimiento vegetal y en respuestas de defensa existe un crosstalk entre GA y JA, el cual está mediado por las proteínas represoras DELLA y JAZ, quienes interactúan directamente unas con otras (Riemann *et al.*, 2015). En consecuencia, el crecimiento y la respuesta a estreses son fenómenos mantenidos por un balance entre las vías de señalización GA-JA (Wasternack and Hause 2013).

CONCLUSIONES

- El estrés hídrico moderado modificó parámetros morfológicos (longitud de la parte aérea) y fisiológicos (conductancia estomática y niveles hormonales endógenos) en plántulas de girasol de la línea B71 (tolerante a estrés hídrico).
- La acumulación de JA en raíces de plántulas estresadas modificaría la arquitectura radical permitiendo así una importante adaptación morfológica para la tolerancia al estrés hídrico.
- Bajo condiciones de estrés hídrico moderado, el incremento de GAs en parte aérea estaría asociado con la inhibición de la proliferación y expansión celular, lo que determinaría la reducción en la longitud de la parte aérea.
- Durante el período de rehidratación se modificaron los niveles endógenos de JA y GAs, aunque por lo general no se logró revertir el efecto del estrés hídrico durante los tiempos de recuperación estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdala, G. y A. Cenzano. 2006. Biosíntesis de jasmonatos y participación en procesos del desarrollo vegetal. En: Temas de Fisiología Vegetal. Sociedad de Fisiología Vegetal, ISBN: 950-665-403-4. Cap. XI: 56-87.
- Abdala, G., O. Miersch, R. Kramell, A. Vigliocco, E. Agostini, G. Forchetti y S. Alemano. 2003. Jasmonate and octadecanoid occurrence in tomato hairy roots. Endogenous level changes in response to NaCl. *Plant Growth Regul.* 40: 21-27.
- Abdalla, M.M. y N.H. El-Khoshiban. 2007. The influence of water stress on growth, relative water content, photosynthetic pigments, some metabolic and hormonal contents of two *Triticum aestivum* cultivars. *JASR.* 3: 2062-2074.
- Adreani, P. 2008. Mercado del complejo soja & Análisis de la competitividad de los países exportadores. Programa de inserción agrícola. ATN/ME-9565-RG BID-FOMIN.
- Agele, S.O. 2003. Sunflower responses to weather variations in rainy and dry, cropping seasons in a tropical rainforest zone. *Int. J. Biol.* 32: 17-33.
- Aguirrezábal, L.A.N., G.A. Orioli, L.F. Hernández, J.P. Miravé, V.R. Pereyra y F.J. Cardinali. 2001. Girasol: Aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento. Balcarce EEA-Facultad de Ciencias Agrarias-UNMdP Serie de Divulgación. Pp. 127.
- Aharoni, N., A. Blumenfeld y A.E Richmond. 1977. Hormonal Activity Detached Lettuce Leaves as affected by leaf Water Content. *Plant Physiol.* 59: 1169-1173.
- Ahmad, S., R. Ahmad, M.Y. Ashraf, M. Ashraf y E.A. Waraich. 2009. "Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Response to Drought Stress at Germination and Seedling Growth Stages". *Pak J Bot.* 41: 647-654.
- Aimar, D., M. Calafat, A.M Andrade, L. Carassay, F. Bouteau, G. Abdala. 2014. Drought effects on the early development stages of *Panicum virgatum* L: cultivar differences. *Biomass Bioenergy.* 66: 49-59.

Avanci, N.C., D.D. Luche, G.H. Goldman y M.H.S. Goldman. 2010. Jasmonates are phytormones with multiple functions, including plant defence and reproduction. *Genet Mol Res.* 9: 484-505.

Boureima, S., M. Eyletters, M. Diouf, T.A. Diop y P. Van Damme. 2011. Sensitivity of seed germination and seedling radicle growth to drought stress in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Res. J. Environ. Sci.* 5: 557–564.

Claeys, H., A. Skiryecz, K. Maleux, y D. Inzé. 2012. DELLA signaling mediates stress-induced cell differentiation in Arabidopsis leaves through modulation of anaphase-promoting complex/cyclosome activity. *Plant Physiol.* 159: 739-747.

Colebrook, E.H., G.T. Stephen, L.P. Andrew y H. Peter. 2014. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J. Exp. Biol.* 217: 67-75.

Collatz, G.J., J.T. Ball, C. Grivet y J.A. Berry. 1991. Physiological and environmental regulation of stomatal conductance, photosynthesis and transpiration: a model that includes a laminar boundary layer. *Agr. Forest Meteorol.* 4: 107–136.

Corti Monzón, G., M. Pinedo, L. Lamattina y L. de la Canal. 2012. Sunflower root growth regulation: the role of jasmonic acid and its relation with auxins. *Plant Growth Regul.* 66: 129–136.

Creelman, R.A. y J.E. Mullet 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 4114-4119.

De Domenico, S., S. Bonsegna, R. Horres, V. Pastor, M. Taurino, P. Poltronieri, M. Imtiaz, G. Kahl, V. Flors, P. Winter y A. Santino. 2012. Transcriptomic analysis of oxylipin biosynthesis genes and chemical profiling reveal an early induction of jasmonates in chickpea roots under drought stress. *Plant Physiol. Biochem.* 61: 115-122.

De Ollas, C., B. Hernando, V. Arbona y A. Gómez-Cadenas. 2013. Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Plant Physiol.* 147: 296-306.

Díaz-Zorita, M., G. Duarte y E. Díaz-Zorita. 2003. El cultivo de girasol. Cuadernillo informativo N° 7. Asociación Argentina de Girasol. Bs. As., Argentina. 10 p.

Du, H., H. Liu y L. Xiong. 2013. Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Front Plant Sci.* 2013 4:397.

Durgbanshi, A., V. Arbona, O. Pozo, O. Miersch, J.V. Sancho y A. Cádenas-Gómez. 2005. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8437-8442.

Gao, X.H., S.L. Xiao, Q.F. Yao, Y.J. Wang y X.D. Fu. 2011. An updated GA signaling 'relief of repression' regulatory model. *Mol Plant.* 4: 601–606.

Gapper, N.E., G.E. Norris, S.F. Clarke, R.E. Lill y P.E. Jameson. 2002. Novel jasmonate amino acid conjugates in *Asparagus officinalis* during harvest-induced and natural foliar senescence. *Physiol. Plant.* 114: 116–124.

Garbero, M., H. Pedranzani, F. Zirulnik, A. Molina, M.V. Pérez-Chaca, A. Vigliocco y G. Abdala. 2010. Antioxidant and jasmonate response under short-term cold stress in two cultivars of *Digitaria eriantha*. *Physiol. Plant.* 14: 635–644.

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

Ghobadia, M., S. Taherabadia, M.E. Ghobadia, G.R. Mohammadia y S. Jalali-Honarmanda. 2013. Antioxidant Capacity, Photosynthetic Characteristics and Water Relations of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Cultivars in Response to Drought Stress. *Ind Crops Prod.* 50: 29-38.

Grebner, W., Stingl, N.E., Oenel, A., Mueller, M.J., Berger, S., 2013. Lipoxygenase 6-dependent oxylipin synthesis in roots is required for abiotic and biotic stress resistance of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 161: 2159-2170.

Heuer, B. y A. Nadler. 1995. Growth and development of potatoes under salinity and water deficit. *Aust. J. Agric. Res.* 46: 1477-86

Huang, A.X., X.P. She, B. Cao, B. Zhang, J. Mu y S.J. Zhang. 2009. Nitric oxide, actin reorganization and vacuoles change are involved in PEG 6000-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Physiol. Plant.* 136: 45–56.

Iqbal, N., M. Ashraf, M.Y. Ashraf y F. Azam. 2005. Effect of exogenous application of glycinebetaine on capitulum size and achene number of sunflower under water stress. *Int. J. Biol. Biotech.* 2: 765-771.

Ishiguro, S., A. Kawai-Oda, J. Ueda, I. Nishida, K. Okada. 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*. *The Plant Cell.* 13: 191-209.

Kang, D.J., Y.J. Se., J.D. Lee, R. Ishii, K.U. Kim, D.H. Shin and I.J. Lee. 2005. Jasmonic Acid Differentially Affects Growth, Ion Uptake and Abscisic Acid Concentration in Salt-Tolerant and Salt-Sensitive Rice Cultivars. *J. Agron. Crop. Sci.* 191:273-282.

Keyvan, S. 2010. The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. *J. Anim. Plant Sci.* 8: 1051- 1060.

Kramell, R., O. Miersch, R. Atzorn, B. Parthier y C. Wasternack. 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.

Llanes, A., A. Andrade, S. Alemano y V. Luna. 2016. Alterations of endogenous hormonal levels in plants under drought and salinity. *Am. J. Plant Sci.* 7: 1357-1371.

Maciejewska, B. y J. Kopcewicz. 2003. Inhibitory effect of methyl jasmonate on flowering and elongation growth in *Pharbitis nil*. *J. Plant Growth Regul.* 21:216-223.

Mahouachi, J., V. Arbona y A.G. Gómez-Cadenas. 2007. Hormonal changes in papaya seedlings subjected to progressive water stress and re-watering. *Plant Growth Regul.* 53: 43-51.

Manivannan, P., C.A. Jaleel, B. Sankar, A. Kishorekumar, R. Somasundaram, G.M. Alagu Lakshmanan y R. Panneerselvam. 2007. Growth, biochemical modifications and proline

metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids Surf. B.* 59: 141-149.

Medrano, H., J.M. Escalona, J. Bota, J. Gulías y J. Flexas. 2002. Regulation of Photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Ann Bot.* 89: 895-905.

Moumeni, A., K. Satoh, H. Kondoh, T. Asano, A. Hosaka, R. Venuprasad, R. Serraj, A. Kumar, H. Leung y S. Kikuchi. 2011. Comparative analysis of root transcriptome profiles of two pairs of drought-tolerant and susceptible rice near-isogenic lines under different drought stress. *BMC Plant Biol.* 11: 174.

Ogawa, M., A. Hanada, Y. Yamauchi, A. Kuwahara, Y. Kamiya, y S. Yamaguchi. 2003. Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *Plant Cell.* 15:1591–1604.

Pedranzani, H., R. Sierra de Grado, A. Vigliocco, O. Miersch y G. Abdala. 2007. *Pinus pinaster* Ait.: abiotic stress and endogenous jasmonates. *Plant Growth Regul.* 52: 111-116.

Petcu, E., A. Arsintescu y D. Stanciu. 2001. The effect of drought stress on fatty acid composition in some Romanian sunflower hybrids. *Rom. Agric. Res.* 15: 39-42.

Petropoulos, S.A., D. Daferera, M.G. Polissiou y H.C. Passam. 2008. The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. *Sci. Hort.* 115: 393–397.

Poltronieri, P., M. Taurino, S. De Domenico, S. Bonsegna y A. Santino. 2014. Activation of the Jasmonate biosynthesis pathway in roots in drought stress. En: *Climate change and plant abiotic stress tolerance*, Edited by Narendra Tuteja and Sarvajeet S. Gill. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. pp. 325-342.

Reginato, M., G. Abdala, O. Miersch, O. Ruiz, E. Moschetti y V. Luna. 2012. Changes in the Levels of Jasmonates and Free Polyamines Induced by Na₂SO₄ and NaCl in Roots and Leaves of the Halophyte *Prosopis strombulifera*. *Biol.* 67:689-697.

- Riemann, M., R. Dhakarey, M. Hazman, B. Miro, A. Kohli y P. Nick. 2015. Exploring Jasmonates in the Hormonal Network of Drought and Salinity Responses. *Front. Plant Sci.* 6: 1077.
- Roche, J., T. Hewezi, A. Bouniols y L. Gentzbittel. 2009. “Real-Time PCR Monitoring of Signal Transduction Related Genes Involved in Water Stress Tolerance Mechanism of Sunflower,” *Plant Physiol. Biochem.* 47: 139-145.
- Rood, S.B., K. Zanewich, C. Stefura y J.M. Mahoney. 2000. Influence of Water Table Decline on Growth Allocation and Endogenous Gibberellins in Black Cottonwood. *Tree Physiol.* 20:831-836.
- Sankar, B., C.A. Jaleel, P. Manivannan, A. Kishorekumar, R. Somasundaram y R. Panneerselvam. 2007. Effect of paclobutrazol on water stress amelioration through antioxidants and free radical scavenging enzymes in *Arachis hypogaea* L. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 60: 229–235
- Sankar, B., C.A. Jaleel, P. Manivannan, A. Kishorekumar, R. Somasundaram y R. Panneerselvam. 2008. Relative efficacy of water use in five varieties of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. Under water-limited conditions. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 62: 125–129
- Seltmann, M.A., N.E. Stengl, J.K. Lautenschlaeger, M. Krischke, M.J. Mueller y S. Berger. (2010). Differential impact of lipoxygenase and jasmonates on natural and stress-induced senescence in *Arabidopsis* sp. *Plant Physiol.* 152: 1940–1950.
- Stenzel, I., B. Hause, O. Miersch, R. Kramell, T. Kurz, H. Maucher, H. Weichert, J. Ziegler, I. Feussner y C. Wasternack. 2003. Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 51: 895-911.
- Seo, M., E. Nambara, G. Choi y S. Yamaguchi. 2009. Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant. Mol. Biol.* 69:463–472.
- Shao, H.B., L.Y. Chu, M.A. Shao, C. Abdul Jaleel y M. Hong-Mei. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C. R. Biol.* 331: 433–441.

Skirycz, A., H. Claeys, S. De Bodt, A. Oikawa, S. Shinoda, M. Andriankaja, K. Maleux, N.B. Eloy, F. Coppens y S.D. Yoo. 2011. Pause-and-stop: the effects of osmotic stress on cell proliferation during early leaf development in *Arabidopsis* and a role for ethylene signaling in cell cycle arrest. *Plant Cell*. 23: 1876-1888.

Specht, J.E., K. Chase, M. Macrander, G.L. Graef, J. Chung, J.P. Markwell, M. Germann, J.H. Orf y K.G. Lark. 2001. Soybean response to water. A QTL analysis of drought tolerance. *Crop Sci*. 41: 493-509

Sreenivasulu, N., V.T. Harshvardhan, G. Govind, C. Seiler y A. Kohli. 2012. Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? *Gene*. 506: 265-273.

Staswick, P.E. y I. Tiryaki. 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis sp.* *Plant Cell*. 16: 2117-2127.

Stelmach, B.A., A. Müller, P. Hennig, S. Gebhardt, M. Schubert-Zsilavecz y E.W. Weiler. 2001. A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalctosyl diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem*. 276: 12832-12838.

Sun, T. 2008. Gibberellin Metabolism, Perception and Signaling Pathways in *Arabidopsis sp.* *Arabidopsis Book*. 2008; 6: 103.

Tani, T., H. Sobajima, K. Okada, T. Chujo, S. Arimura, N. Tsutsumi, M. Nishimura, H. Seto, H. Nojiri y H. Yamane. 2008. Identification of the OsOPR7 gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice. *Plant J*. 227:517-526.

Trápani, N., M. López Pereira, V.O. Sadras y A.J. Hall. 2003. Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en girasol. En: Satorre E.H., Benech Arnold R.L., Slafer G.A., de la Fuente E.B., Miralles D.J., Otegui M.E, Savin R., (Ed). Producción de Granos, bases funcionales para su manejo. Editorial Fac. de Agron. Univer. de Bs As. Pp: 203-241.

Turhan, H. y I. Baser. 2004. In vitro and in vivo water stress in sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Helia*.27: 227-236.

Van Ha C., M.A. Leyva-González, Y. Osakabe, U. Thi Tran, R. Nishiyama, Y. Watanabe, Vos, J. y P.J. Oyarzún. 1987. Photosynthesis and stomatal conductance of potato leaves-effects of leaf age, irradiance, and leaf water potential. *Photosyn. Res.* 11: 253-264.

Vos, J. y P. Oyarzún. 1987. Photosynthesis and stomatal conductance of potato leaves-effects of leaf age, irradiance, and leaf water potential. *Photosynth. Res.* 11: 253-264.

Wang, L., Z. Huang, C.C. Baskin, J.M. Baskin, y M. Dong .2008. Germination of Dimorphic Seeds of the Desert Annual Halophyte Suaeda aralocaspica (Chenopodiaceae), a C4 Plant without Kranz Anatomy. *Ann. Bot.* 102:757-769.

Wasternack, C. 2013. Action of jasmonates in plant stress responses and development: applied aspects. *Biotechnol. Adv.* 32: 31–39.

Wasternack, C. y B. Hause. 2002. Jasmonates and octadecanoids: Signals in plant stress response and development. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72: 165-221.

Wasternack, C. y E. Kombrink. 2010. Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chem. Biol.* 5: 63-77.

Wasternack, C. y B. Hause. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* 111: 1021–1058.

Wu, Q.S., R.X. Xia y Y.N. Zou. 2008. Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *Eur J Soil Biol.* 44: 122–128.

Xie, S. y X. Luo. 2003. Effect of leaf position and age on anatomical structure, photosynthesis, stomatal conductance and transpiration of Asian pear. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44: 297-303

Xin, Z.Y., X. Zhou y P.E. Pilet. 1997. Level changes of jasmonic, abscisic and indole-3yl acetic acids in maize under desiccation stress. *J. Plant Physiol.* 151:120–124.

Xu, Z., G. Zhou y H. Shimizu. 2010. Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signal Behav.* 5: 649–654.

Xue, R. y B. Zhang. 2007. Increased endogenous methyl jasmonate altered leaf and root development in transgenic soybean plants. *J Genet Genomics*. 34: 339-46.

Yamaguchi, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Plant Biol*. 59: 225–51.

Yang, J.C., J.H. Zhang, Z.Q. Wang, Q.S. Zhu y W. Wang. 2001 Hormonal Changes in the Grains of Rice Subjected to Water Stress during Grain Filling. *Plant Physiol*. 127: 315-323.

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