



*Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados*



**ANÁLISIS DE VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA
PARA MECANISMOS DE TOLERANCIA A LA
SALINIDAD Y LA RESPUESTA DE LA EXPANSIÓN
FOLIAR ANTE ESTE ESTRÉS EN GIRASOL
(*Helianthus annuus* L.)**

Ingeniero Agrónomo Gabriel Céccoli

Tesis

Para optar al Grado Académico de
Doctor en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 2013

**ANÁLISIS DE VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA
PARA MECANISMOS DE TOLERANCIA A LA
SALINIDAD Y LA RESPUESTA DE LA EXPANSIÓN
FOLIAR ANTE ESTE ESTRÉS EN GIRASOL
(*Helianthus annuus* L.)**

Ingeniero Agrónomo Gabriel Céccoli

Comisión Asesora de Tesis

Directora: Dra. Edith Liliana Taleisnik

Co-Director: Dr. Abelardo Carlos Vegetti

Asesor: Ing. Agr. (M. Sc.) Marcelo Cantarero

Tribunal Examinador de Tesis Propuesto

Dr. Fabricio Darío Cassan

Dra. Celina Luna

Dr. Abelardo Carlos Vegetti

Presentación formal académica

Lunes 25 de Marzo de 2013

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

Dedicatoria

A **Mimí**, mi madre, que con su voluntad, sufrimiento y fuerzas, hace que nuestras penas sean alegrías de cada día. Por estar siempre, desde su lugarcito que le tocó en este mundo, prestando consejos y apoyo materno.

A **Belisario**, mi padre, por ser padre, amigo, colega, y por llevar su vida adelante al lado del amor de su vida.

A **Abelardo**, por engrandecer nuestra facultad, por haberme buscado desde el 2001 y ayudarme a encontrar mi vocación, por adoptarnos como hijos a todos y cada uno de los becarios, pasantes y demás personal y por estar siempre en las buenas y en las malas apoyando y empujando en positivo como locomotora.

Agradecimientos

A Dios, por permitirme recorrer el camino de la vida.

Al Estado Nacional Argentino por permitirme tener una educación y formación de excelencia.

A Edith y todo su grupo por apoyarme y guiarme en esta tesis, especialmente a Leo, Loli, Euge, Alicia, Paolita y a la Gabi P.

Al grupo de Morfología Vegetal: Elisa amiga y compañera; Mariel y Julio, que me iniciaron en el camino de la Investigación; Andrea y Juanín por ser pacientes y comprensibles y a Alicia por brindarme ayuda técnica y personal también. Especialmente a mis pasantes en investigación: Andres Binaghi, Federico Pernuzzi y Maricel Pozzo.

A Matías Camisassa por ser un pasante con toda la fuerza del trabajo y por ayudarme en todos los experimentos y leer concienzudamente los papers que le daba para que pudiera escribir su tesina.

A mis amigos de la vida, especialmente Andrés C. I., que siempre está cuando necesito un consejo y apoyo. Martín A., Martín G., Tokio, la Juli, el Seba. Tampoco quiero olvidarme de Joaquín M.C. que en este último recorrido de mi doctorado me ha dado fuerzas para seguir adelante y ayudarme con las pruebas a las cuales la vida nos somete diariamente.

A mi querida hija, Sofia, cuyo nombre debe a mi asombro por la sabiduría y el saber en general.

A Beti, por ayudarnos siempre en casa.

A la Vale , la Romi, Juan y Martin Allasia por la amistad y el compañerismo que tuvimos cuando fuimos a España de intercambio. Las perdidas con los trenes “cercanías” valieron la pena.

A mis sobrinos, que los adoro.

Al resto de mi familia, que con sus errores y aciertos me permitieron saber cuál es el camino correcto a seguir, a enseñarme a que las palabras perdón, gracias y permiso son sagradas.

Al personal de la facultad de ciencias Agrarias por darme un lugar en esta casas de altos estudios.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología e Innovación Productiva de la Nación (MINCYT), al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), al Consejo nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, a la Universidad Nacional del Litoral, al Gobierno de la Provincia de Santa Fe, al Ministerio de Educación de la Nación, a la Secretaria de Estado Ciencia e Innovación Productiva por proporcionarme la ayuda económica y en equipamiento. En síntesis, a todos los Órdenes del Estado Argentino (Nacional, provincial y municipal) que, gracias a que cada día está más presente, permite un futuro promisorio para nuestra Nación.

Al grupo del INTA Balcarce: Luis Aguirrezábal, Gustavo, Achi y Luisisto.

Al Nacho Alberdi por ser amigos y permitirme en Balcarce tres meses de ensayo que fueron motivo de mucho trabajo, intercambio de ideas y apoyo mutuo.

Resumen

La salinidad del suelo es una causa importante de restricción para el uso agronómico de las tierras, debido a que reduce la productividad en la mayoría de los cultivos. Debido a que el girasol ha sido desplazado hacia suelos marginales y dado el hecho que existe una elevada correlación entre expansión foliar y rendimiento en grano en este cultivo, los objetivos del presente trabajo fueron: 1) determinar variabilidad en mecanismos de tolerancia a salinidad y 2) correlacionar cambios en la dinámica de la expansión foliar y la inclusión de Na^+ . Las plantas fueron cultivadas bajo condiciones controladas y regadas con solución nutritiva salinizada (-0,65 MPa). La tolerancia al estrés osmótico se determinó midiendo las tasas iniciales de elongación de plantas. Las respuestas a largo plazo fueron evaluadas midiendo variables de crecimiento. Un ranking de tolerancia a salinidad indicó el siguiente orden para las líneas: HAR2>HAR1>HA64>HAR5; y para los híbridos SMR779CL>TRTIÓN MAX>ACA885>SMR769. Los genotipos presentaron diferentes grados de acumulación de Na^+ , pero la tolerancia relativa a la salinidad no estuvo asociada a este atributo. La tolerancia tisular al Na^+ fue mayor en HAR1 que en el resto de los genotipos. Estos resultados indican la existencia de variabilidad para los mecanismos de tolerancia a la salinidad en girasol. Esta variabilidad podría ser utilizada para incrementar la tolerancia a la salinidad en este cultivo. Por otro lado se investigó si la inclusión foliar de Na^+ podría influir en los mecanismos celulares subyacentes de la expansión foliar, seleccionándose dos líneas contrastantes en inclusión foliar de Na^+ : HAR2 y HAR1. Se hipotetizó que las respuestas a la salinidad en los estadios tempranos de la ontogenia de la hoja podrían estar dominados por las respuestas al componente osmótico de la salinidad, y que la inclusión foliar de Na^+ podría alterar esta coincidencia en respuestas a largo plazo. Los efectos de la salinidad sobre las tasas de expansión foliar y de división celular fueron estudiadas en la hoja 8. Los efectos negativos del estrés fueron más notorios antes de la emergencia de la hoja. Las tasas relativas de expansión celular se afectaron en igual magnitud en ambas líneas, mientras que las tasas relativas de división celular se afectaron más en HAR1. La disminución del índice estomático en HAR2 podría conferirle ventajas frente en salinidad.

Palabras claves: salinidad, tolerancia del girasol a la salinidad, expansión foliar, inclusión foliar de Na^+ .

Abstract

Soil salinity is a major cause of restriction in the productive use of the land as it reduces productivity in most crops and it imposes water limitations and ionic imbalances. Because sunflower is being displaced to marginal areas, including salinized soils, and as there is a high correlation between leaf expansion and grain yield, the objectives of this thesis were to: 1) determine variability in salt tolerance mechanisms in sunflower and 2) to correlate the changes in the dynamics of leaf expansion and leaf Na^+ inclusion of Na^+ . Plants were grown under controlled conditions and irrigated with salinized (NaCl , -0.65 MPa) nutrient solution. Osmotic tolerance was assessed from the initial effects of the salt treatment on plant elongation. Long-term salinity responses were evaluated by assessing whole plant growth. A relative tolerance ranking indicated tolerance in lines was HAR2>HAR1>HA64>HAR5 and in hybrids SMR779CL>TRITÓN MAX>ACA885>SMR769. The lines and hybrids showed different degrees of Na^+ accumulation but relative salt tolerance was not associated to this trait. Tissue Na^+ tolerance was higher in HAR1 than in the rest. These results indicate that variability for salt tolerance mechanisms exists in sunflower. Such variability may be exploited for increasing salt tolerance in this crop. It was then enquired whether leaf Na^+ inclusion would influence the cellular basis of leaf expansion. Cell division and expansion was studied in leaf 8 of two sunflower lines that differ in leaf Na^+ accumulation: HAR1 and HAR2. It was proposed that responses to salinity in the early stages of the salt treatment would be dominated by responses to the osmotic component of salinity, and that ion inclusion would disrupt this coincidence in long-term responses. Negative effects of salinity were greater before leaf emergence. However, while relative cell expansion rates were affected similarly both lines, relative cell division rates decreased more in HAR1, the line that includes Na^+ in leaves. In HAR2, a decrease in the stomatal index was observed, perhaps conferring advantages in the adaptation to salt stress.

Keywords: Salinity, sunflower salt tolerance, leaf expansion, leaf Na^+ inclusion.

Tabla de contenidos

CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LAS ASTERÁCEAS Y EL GIRASOL.....	1
Hallazgo en la Patagonia.....	2
ORIGEN DEL GIRASOL EN ARGENTINA.....	4
IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL GIRASOL A NIVEL MUNDIAL Y NACIONAL.....	7
Producción y mercado mundial.....	7
Producción y mercado nacional.....	9
SALINIDAD Y GIRASOL. IMPORTANCIA DE SU ESTUDIO FRENTE AL ACTUAL PANORAMA AGRONÓMICO.....	13
IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA SALINIDAD EN LOS CULTIVOS.....	14
EFFECTOS FISIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA SALINIDAD EN LAS PLANTAS.....	18
SALINIDAD, ACUMULACIÓN Y PARTICIÓN DE MATERIA SECA.....	22
MECANISMOS DE TOLERANCIA A LA SALINIDAD.....	24
PAPEL DE LOS CAMBIOS EN EL BALANCE IÓNICO DURANTE LA ADAPTACIÓN A LA SALINIDAD.....	26
EXPANSIÓN FOLIAR EN GIRASOL Y MECANISMOS CELULARES INVOLUCRADOS.....	27
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	29
OBJETIVOS.....	29
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	31

CAPÍTULO II - VARIABILIDAD EN TOLERANCIA A LA SALINIDAD EN LÍNEAS ENDOCRIADAS Y GENOTIPOS HÍBRIDOS DE GIRASOL.....	37
INTRODUCCIÓN.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
1. Experimentos.....	41
2. Material Vegetal.....	44
3. Condiciones de cultivos en los distintos experimentos.....	47
4. Parámetros y variables medidas, calculadas y/o estimadas.....	49
Crecimiento.....	49
Determinación de tolerancia a la salinidad.....	51
Concentración de Na ⁺ y K ⁺	53
Determinaciones de daño fisiológico: Concentración de clorofila, malondialdeído (MDA) y daño de membranas.....	54
Relaciones hídricas.....	57
Análisis estadístico.....	59
RESULTADOS.....	60
Tolerancia a la salinidad en líneas endocriadas.....	60
Acumulación de Na ⁺ y K ⁺	60
Respuestas tempranas del crecimiento a la salinidad.....	65
Alteraciones en parámetros hídricos por salinidad.....	67
Respuestas a exposiciones prolongadas a la salinidad.....	68
Tolerancia tisular al Na ⁺	72
Generación de un ranking de tolerancia a salinidad a partir de las variables morfológicas estudiadas.....	74
Tolerancia a la salinidad en híbridos comerciales de girasol.....	76
Acumulación de Na ⁺ y K ⁺	76
Índice de daño de membranas.....	80
Respuestas tempranas del crecimiento a la salinidad.....	83
Alteraciones en parámetros hídricos por salinidad.....	85

Respuestas a exposiciones prolongadas a la salinidad.....	87
Generación de un ranking de tolerancia a salinidad a partir de las variables morfológicas estudiadas.....	89
DISCUSIÓN.....	91
Variabilidad en tolerancia a salinidad en líneas endocriadas e híbridos de girasol.....	91
Respuestas iniciales al estrés salino en genotipos de girasol: estrés osmótico inducido por salinidad.....	91
Cambios en la acumulación de materia seca y su distribución en respuesta a exposiciones prolongadas a la salinidad.....	96
Efectos de la salinidad sobre la estabilidad de membranas.....	97
Muerte de hojas y acumulación foliar de Na ⁺	99
CONCLUSIONES.....	107
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	109
CAPÍTULO III - CAMBIOS EN LA DINÁMICA DE LA EXPANSIÓN FOLIAR EN GIRASOL POR SALINIDAD Y MECANISMOS CELULARES INVOLUCRADOS.....	115
INTRODUCCIÓN.....	115
MATERIALES Y MÉTODOS.....	119
Materiales utilizados.....	120
Parámetros y variables medidas, calculadas y/o estimadas.....	121
Relaciones alométricas-Área foliar específica.....	121
Área foliar final real por hoja y total por planta.....	121
Análisis de la dinámica de la expansión foliar.....	121
Determinación de tamaño y número de células epidérmicas por hoja e índice estomático.....	124
Análisis estadístico.....	127
RESULTADOS.....	128

Dinámica de la expansión foliar.....	128
Experimentos en cámara de crecimiento.....	128
Efecto de la salinidad sobre el área foliar y la materia seca de hojas sucesivas.....	128
Dinámica de la expansión foliar en hojas iniciadas antes, durante y después del comienzo de la salinización.....	130
Efectos de la tasa de expansión foliar y efectos de la duración de la misma sobre el área foliar final.....	136
Experimentos en invernadero.....	138
Efecto de la salinidad sobre las tasas división y expansión celular y su influencia en las mermas en área foliar.....	141
Modificaciones en las densidades de células epidérmicas y estomáticas y en el índice estomático por salinidad.....	147
DISCUSIÓN.....	149
Efectos de la salinidad sobre el área foliar por hoja, la materia seca por hoja y el área foliar específica.....	149
Cambios en la dinámica de la expansión foliar en girasol por salinidad.....	150
División y expansión celular en salinidad.....	155
Cambios en el índice estomático.....	158
Cambios en las variables anatómicas y fisiológicas de la expansión foliar que ocurren durante la ontogenia de la hoja.....	160
CONCLUSIONES.....	163
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	166
CAPÍTULO IV – CONCLUSIONES GENERALES.....	170
ACUMULACIÓN FOLIAR DE Na^+ Y MECANISMOS DE TOLERANCIA A SALINIDAD.....	170

EXPANSIÓN FOLIAR EN GIRASOL BAJO SALINIDAD. MECANISMOS CELULARES DETERMINANTES DE LOS CAMBIOS EN LA EXPANSIÓN FOLIAR POR SALINIDAD.....	174
CONCLUSIONES FINALES RESPECTO A LAS HIPÓTESIS Y OBJETIVOS PLANTEADOS.....	178
PERSPECTIVAS Y CONSIDERACIONES PARTICULARES RELACIONADAS CON EL ÁMBITO DE LAS CIENCIAS AGROPECUARIAS.....	180
CAPÍTULO V – BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	182
ANEXO- FIGURAS Y TABLAS DE PARÁMETROS DE CRECIMIENTO, DINÁMICA DE LA EXPANSIÓN FOLIAR, BIPLOTS Y RELACIONES K+/NA+.....	196

Lista de Tablas

Tabla 2.1. Localización de los experimentos realizados para el logro de esta tesis, materiales vegetales (híbridos o líneas) utilizados en cada experimento y condiciones de crecimiento empleadas en cada uno de ellos (I: invernadero; CC: cámara de crecimiento; Cb: Córdoba; E: Esperanza; B: Balcarce). Las letras a-f indican los distintos experimentos realizados.

Tabla 2.2. Genotipos utilizados en los distintos experimentos en cámara de crecimiento y en invernadero. Los asteriscos indican las líneas ya caracterizadas por su respuesta en expansión foliar bajo estrés hídrico. I: invernadero; CC: cámara de crecimiento Cb: Córdoba; B: Balcarce; E: Esperanza. Detalles de experimentos a-f, ver tabla 2.1.

Tabla 2.3. Líneas contrastantes en inclusión foliar de Na^+ utilizadas para realizar posteriores estudios que se detallan más adelante.

Tabla 2.4. Genotipos híbridos utilizados en el experimento f contrastantes en inclusión foliar de Na^+ y contrastantes a su vez, dentro de cada grupo, en el nivel de daño de membranas.

Tabla 2.5. Tasa relativa de elongación de plantas (TREP, en $^{\circ}\text{Cd}^{-1} \times 10^{-3}$) en 11 líneas de girasol, determinadas a partir de cuatro mediciones de altura de planta consecutivas, a los 363, 484, 603 y 736 $^{\circ}\text{Cd}$ registrados a partir del inicio del experimento. Los porcentajes de los controles fueron calculados como el cociente de cada planta salinizada sobre el valor promedio de todas las plantas control. Los $^{\circ}\text{Cd}$ en los cuales ocurre las primeras diferencias en altura indican el momento más temprano (medido en $^{\circ}\text{Cd}$) cuando las diferencias significativas en altura se detectaron entre plantas control y salinizadas (130 mM de NaCl en la solución de riego). Las tasas corresponden a los primeros 15 días de exposición a la salinidad.

Tabla 2.6. Efecto de la salinidad (130 mM NaCl, condiciones de cámara de crecimiento) sobre el potencial hídrico (Ψ) y el contenido relativo de agua (CRA).

Tabla 2.7. Efecto de la salinidad (130 mM NaCl, condiciones de cámara de crecimiento) sobre el filocrono (FC), área foliar total (AFT), materia seca foliar (MSF) y materia seca de hojas muertas (MSHM) como porcentaje del total de materia seca foliar en cuatro genotipos de girasol. C: media de plantas control para cada parámetro. S: media de plantas tratadas con 130 mM para cada parámetro.

Tabla 2.8. Ranking de tolerancia a la salinidad en cuatro genotipos de girasol irrigados con 130 mM de NaCl (cámara de crecimiento), basado en variables medidas a corto y largo plazo a partir de la exposición inicial a la salinidad.

Tabla 2.9. Efecto de la salinidad (130 mM, condiciones de cámara de crecimiento) sobre las tasas relativas de elongación de plantas (TREP, en $^{\circ}\text{CD} \times 10^{-3}$) en cuatro híbridos de girasol con respuesta contrastante en acumulación foliar de Na^+ y en daño de membranas. Se realizó el test de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD por sus siglas en inglés) y se utilizó un nivel de significancia del 5%. Los asteriscos para cada momento, indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 2.10. Efecto de la salinidad (130 mM, condiciones de cámara de crecimiento) sobre el contenido relativo de agua (CRA) y sobre el potencial osmótico (PO, en MPa) en cuatro híbridos de girasol que contrastan en inclusión foliar de Na^+ y en el nivel de daño de membranas. Letras distintas en una fila indican diferencias estadísticamente significativas (ANAVA, test LSD de Fisher. $P < 0,05$). $n=5$. Las muestras se hicieron durante la mañana para evitar acumulación de solutos orgánicos por efecto de la fotosíntesis.

Tabla 2.11. Ranking de tolerancia a la salinidad en cuatro híbridos de girasol irrigados con 130 mM de NaCl (en cámara de crecimiento), basado en variables medidas a corto y largo plazo a partir de la exposición inicial a la salinidad.

Tabla 3.1. Localización, condiciones de cultivo, genotipos utilizados y variables medidas en los ensayos a-f detallados en este capítulo para variables respuestas de la dinámica de la expansión foliar. I: invernadero. CC: cámara de crecimiento.

Tabla 3.2. Efecto de la salinidad (130 mM, condiciones en cámara de crecimiento) sobre el área celular, el número final de células por hoja y el área foliar en dos genotipos contrastantes en inclusión foliar de Na^+ . ($n=5$).

Tabla 3.3. Efecto de la salinidad (130 mM, condiciones de cámara de crecimiento) sobre la densidad estomática (estomas/ mm^2), el número de células epidérmicas (células/ mm^2) y el índice estomático. Se realizó un ANOVA utilizando el test de diferencias mínimas significativas (LSD de Fisher por sus siglas en inglés). Letras diferentes para cada variable indica diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$. C: valores promedio para plantas control, S: valores para plantas salinizadas. ($n=5$).

Lista de Figuras

Fig. 1.1. Fósil de Asterácea. A: Capítulo visto a través de luz blanca transmitida. B: Flores. C-D: granos de polen en vista ecuatorial bajo luz blanca transmitida. E: sección óptica del grano de polen bajo luz fluorescente visto con microscopia confocal. Adaptado de Barreda *et al.* (2010).

Fig. 1.2. Origen y movimiento del girasol a nivel mundial.

Fig. 1.3. Etapas en la evolución del girasol en argentina. Adaptado de Asagir.com

Fig. 1.4. Principales zonas girasoleras en Argentina.

Fig. 2.1. A. Acumulación de Na^+ en distintas partes de la planta en once genotipos/líneas de girasol e. Los asteriscos simples indican diferencias estadísticamente significativas entre plantas salinizadas de los distintos genotipos ($p < 0,05$). Los dobles asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,01$). B. Acumulación foliar de Na^+ en las mismas líneas que A. C. Acumulación foliar de K^+ . Barras blancas indican promedio de plantas controles y barras grises el promedio de plantas salinizadas. El tratamiento salino se realizó con el agregado de 130 mM de NaCl a la solución de riego (condiciones de invernadero). Se realizó un ANAVA y se utilizó el test LSD de Fisher para detectar diferencias estadísticamente significativas entre medias ($p < 0,05$), se indican las diferencias no significativas (ns). (n=3-8).

Fig. 2.2. Efecto de la salinidad (130mM, condiciones de cámara de crecimiento) sobre el daño de la hoja 8 en HAR2, HAR1 y HA64. La columna de la izquierda corresponde a plantas control y la derecha a las plantas salinizadas.

Fig. 2.3. Efecto de la salinidad sobre la acumulación de materia seca y su partición en cuatro genotipos de girasol contrastantes en inclusión foliar de Na^+ . El ensayo se llevó a cabo durante 978,17 °Cd en cámara de crecimiento con condiciones ambientales controladas. A. valores absolutos de materia seca en plantas control y tratadas (130 mM de NaCl). B. Valores porcentuales de materia seca para cada órgano respecto al total de la materia seca por planta para ambos tratamientos. C: plantas control. S: plantas salinizadas. (n = 5-9).

Fig. 2.4. Efecto de la salinidad (130 Mm NaCl, condiciones de cámara de crecimiento) sobre el porcentaje de hoja muerta (%HM) en función de la concentración foliar de Na^+ para cuatro genotipos de girasol. Cada símbolo indica una planta individual salinizada. (n=5-9).

Fig. 2.5. A: Concentración foliar de Na^+ en 18 híbridos de girasol cultivados durante grados día sin salinidad o con el agregado de 130 mM de NaCl en la solución nutritiva y B: concentración foliar de K^+ en los mismos híbridos bajo las condiciones mencionadas. El ensayo se condujo durante 1141,95 °Cd en cámara de crecimiento con condiciones

controladas de radiación y temperatura. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de significancia del 5 % (Test LSD de Fisher, ANAVA). (n=4).

Fig. 2.6. Relación K^+ / Na^+ en 18 híbridos irrigados con el agregado de 130 mM de NaCl en la solución nutritiva. El ensayo se condujo durante 1141,95 °Cd en cámara de crecimiento con condiciones controladas de radiación y temperatura. Las diferencias estadísticamente significativas entre plantas control y salinizadas para cada híbrido, se indican con asteriscos (test de LSD de Fisher, ANAVA). (n = 4).

Fig. 2.7. A: índice de daño de membranas (utilizando la metodología descrita por Flint) en condiciones salinizadas (130 mM de NaCl agregado a la solución de riego). B: índice de daño de membranas en función de la concentración de Na^+ foliar. Los círculos verdes indican los genotipos excluyentes con alto y bajo daño de membranas y los círculos rojos indican los genotipos incluyentes con alto y bajo daño de membranas. El daño de membranas por salinidad se cuantificó según el método de Flint *et al.* (1967). Se estudiaron 18 híbridos cultivados durante 1141,95 °Cd en cámara de crecimiento con condiciones controladas de radiación y temperatura. Las barras verdes y rojas en A indican los genotipos excluyentes e incluyentes, respectivamente. Los círculos verdes en B indican lo mismo que las barras verdes en A, es decir, los híbridos con bajas concentraciones de Na^+ y bajo y alto daño de membranas, seleccionados para estudios posteriores mientras que los círculos rojos en B indican los genotipos con mayores concentraciones foliares de Na^+ (n=4).

Fig. 2.8. Efecto de la salinidad (130 mM) sobre el contenido relativo de agua (CRA) en función del potencial osmótico (PO) para los cuatro híbridos estudiados. Símbolos diferentes indican diferentes híbridos. Colores diferente para un mismo símbolo indican los tratamientos control y con estrés salino (130 mM de NaCl, condiciones de cámara de crecimiento). Cada símbolo indica una planta individual. (n=5). S: plantas salinizadas.

Fig. 2.9. Efecto de la salinidad (130mM) sobre la materia seca y su partición en cuatro híbridos de girasol. El ensayo se llevó a cabo durante 44 días (938,74 °Cd) en cámara de crecimiento con condiciones ambientales controladas. A. valores absolutos de materia seca en plantas control y tratadas. B. Valores porcentuales de materia seca para cada órgano respecto al total de la materia seca por planta para ambos tratamientos. C: plantas control. S: plantas salinizadas. (n= 5).

Fig. 3.1. Efecto de la salinidad (130mM) sobre el perfil de área foliar de toda la planta (hoja 1 a 20, Figuras A, D, G y J), sobre la materia seca por hoja (Figuras B, E, H y K) y sobre el área foliar específica (Figuras C, F, I y L). Símbolos rellenos (●) indican plantas control. Símbolos vacíos (○) indican los valores para plantas salinizadas. Las líneas horizontales discontinuas indican la ultima hoja totalmente expandida en condiciones control y las punteadas, la última totalmente expandida en condiciones salinas. Líneas horizontales cruzando los símbolos indican el error estándar. El experimento se condujo en cámara de crecimiento durante 918 °Cd desde la emergencia de las plántulas. (n= 5-9).

Fig. 3.2. A: área foliar (mm^2); B: tasa absoluta de expansión foliar ($mm^2 \cdot ^\circ Cd^{-1}$) y C: tasas relativas de expansión foliar a través del tiempo en la hoja 8 del genotipo HAR 2 en condiciones control (líneas continuas) y sometidas a 130 mM de NaCl en condiciones controladas en cámara de crecimiento (líneas discontinuas). Las líneas verticales continuas y discontinuas en A indican el momento de finalización de la expansión foliar en plantas

control y salinas, respectivamente. El experimento se llevó a cabo durante 918 °Cd desde la emergencia de las plántulas. (n=5).

Fig. 3.3. Área foliar (mm^2), °Cd a emergencia foliar desde emergencia de plántulas, duración de la expansión foliar (°Cd), tasa máxima absoluta de expansión foliar ($\text{mm}^2 \cdot \text{°Cd}^{-1}$) y °Cd a máxima tasa absoluta de expansión foliar desde emergencia foliar en 4 líneas endocriadas de girasol sometidas a 130 mM de NaCl. Barras negras y grises indican valores para plantas control y tratadas, respectivamente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ANAVA, $p < 0,05$) No se muestran las letras que surgen del análisis estadístico para no recargar la figura. El experimento se llevó a cabo durante 918 °Cd desde la emergencia de plántulas en cámara de crecimiento. (n=5-9).

Fig. 3.4. Efecto de la tasa de expansión foliar (flechas descendentes a la izquierda de cada figura) y de la prolongación de la duración (flechas ascendentes a la derecha de cada figura) por efecto de la salinidad (130mM, condiciones de cámara de crecimiento) sobre la reducción del área foliar final (flecha descendente a la derecha y valores porcentuales subrayados) en líneas endocriadas contrastantes en inclusión foliar de Na^+ . HAR5 y HAR2 son los genotipos que menos Na^+ acumularon en sus láminas, mientras que HAR1 y HA64, los que presentaron las mayores concentraciones foliares de Na^+ . (n=5-9).

Fig. 3.5. Área foliar (mm^2), °Cd a emergencia foliar desde emergencia de plántulas, duración de la expansión foliar (°Cd), tasa máxima absoluta de expansión foliar ($\text{mm}^2 \cdot \text{°Cd}^{-1}$) y °Cd a máxima tasa absoluta de expansión foliar desde emergencia de foliar en 5 líneas endocriadas de girasol sometidas a 130 mM de NaCl (en invernadero en Balcarce, provincia de Buenos Aires). Barras negras y grises indican valores para plantas control y tratadas, respectivamente. Los asteriscos simples (*) y dobles (**) indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, con valores de $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente (ANAVA). (n=4).

Fig. 3.6. Efecto de la salinidad (130 mM, condiciones de cámara de crecimiento) sobre la expansión foliar en dos genotipos contrastantes en inclusión foliar de Na^+ . El experimento se llevó a cabo en cámaras de crecimiento durante 1141,13 °Cd en condiciones controladas de radiación y temperatura. Líneas continuas indican el ajuste sigmoideo para plantas control y líneas discontinuas, para plantas salinizadas. Las curvas se obtuvieron a partir de un ajuste sigmoideo para cada genotipo y tratamiento. Se dejaron 20 plantas en el experimento y se midió la expansión foliar desde emergencia de la hoja 8 hasta la finalización de la expansión, que coincidió con la finalización del experimento. (n=5).

Fig. 3.7. Efecto de la salinidad (130 mM) sobre el área celular (A y B), número de células por hoja (C y D), tasas relativas de expansión celular (E y F) y tasas relativas de división celular (G y H) en función de tiempo térmico desde el inicio de la hoja 8. El experimento se llevó a cabo en cámaras de crecimiento durante 1141,13 °Cd en condiciones controladas de radiación y temperatura. Los rombos indican los promedios para cada fecha de muestreo y para plantas control. Los cuadrados indican los promedios para cada fecha y cada genotipo en condiciones salinas. Se ilustra el genotipo HAR2 en verde y HAR1 en rojo para con mayor facilidad en la detección del genotipo poco incluyente foliar de Na^+ (HAR2, en verde) y el netamente incluyente foliar de Na^+ (HAR1, en rojo). (n=5).

Fig.3.8. Fotomicrografía electrónica confocal de células epidérmicas maduras correspondientes a secciones medias de hojas totalmente expandidas. Cada barra indica 100 μm . Las plantas S (salinizadas) fueron tratadas con 130 mM de NaCl en condiciones de cámara de crecimiento.

Fig. 3.9. Dinámica de eventos anatómicos, fisiológicos y de desarrollo que ocurren durante la ontogenia de la hoja. Estas curvas fueron realizadas para sintetizar los valores de un amplio rango de especies obtenidas de la literatura científica (Šesták, 1985; Kriedmann, 1986; Turgeon, 1989; Granier y Tardieu, 2009; Sack *et al.*, 2012). Adaptado de Pantin *et al.* (2012).

Lista de abreviaturas

A: área celular

AFE: área foliar específica.

AHL: gen de tolerancia a salinidad en *Arabidopsis thaliana*.

AO: ajuste osmótico.

at: es el parámetro “a” de la curva sigmoidea de las plantas controles.

b: indica el grado de curvatura de la curva sigmoidea.

C₂: C.E. media de los discos del tratamiento control a las 2 horas.

C₂₄: C.E. media del tratamiento control luego de congelarlas durante 24 horas.

CC: cámara de crecimiento.

CF: conductividad eléctrica final.

CP1: componente principal uno.

CRA: contenido relativo de agua.

DMS: diferencias mínimas significativas para el test estadístico de Fisher.

Fec: es el valor en °Cd en el cual finaliza la expansión foliar en las plantas controles.

AF: área foliar total por planta.

Ah: ancho de hoja.

ANAVA: análisis de la varianza estadística.

as: es el parámetro “a” de la curva sigmoidea de las plantas salinizadas.

B: localidad de Balcarce.

C: tratamiento control.

Cb: ciudad de Córdoba.

°Cd: grados día.

CE: conductividad eléctrica

CI: conductividad eléctrica inicial.

CP2: componente principal dos.

d: es el número de células por hoja.

DO: densidad óptica.

E: localidad de Esperanza.

EROS: Especies reactivas del Oxígeno.

HM: materia seca de hoja muerta.

HPLC: Cromatógrafo líquido de alta presión.

I_b: Índice de daño de membranas según Blum y Ebercom

K⁺: catión Potasio.

KCl: Cloruro de potasio.

LiCl: Cloruro de litio.

L_{2s}: es el valor de conductividad eléctrica de los discos de hoja de plantas salinizadas a las 2 horas de haber sumergido el tejido foliar en el agua.

L_{24s}: C.E. de los discos de hojas de plantas salinizadas luego de congelarlas durante 24 horas.

MSA: materia seca aérea.

MSA/MSR: cociente entre la materia seca aérea y la radical.

MSHV: materia seca de hoja verde.

MST: materia seca total por planta.

HAL: gen de tolerancia a salinidad en levadura.

HM/MSH: porcentaje de hoja muerta sobre el total de materia seca de hojas.

I: invernadero.

It: índice de daño de membrana de Flint.

K⁺/Na⁺: relación entre la cantidad de Potasio y la cantidad de Sodio.

L: largo de hoja.

L_{2cm}: C.E. media de los discos del tratamiento control a las 2 horas de la preparación de la muestra.

L_{24cm}: C.E. media del tratamiento control luego de congelarlas durante 24 horas.

MDA: malondialdehído.

MSFT: materia seca foliar total.

MSR: materia seca radical.

Na⁺: catión Sodio.

ns: diferencias no significativas.

PAPS: fosfoadenosina fosfosulfato

PF: peso fresco.

PS: peso seco.

S: plantas salinizadas.

SAL1: gen de tolerancia a salinidad en *Arabidopsis thaliana*.

t: es el tiempo termal.

TBA: ácido tiobarbitúrico.

Tm: tiempo medio de estabilización del ADN.

TREC: tasa relativa de expansión celular.

Vmax: velocidad máxima de expansión foliar.

Zsal: área foliar de las plantas salinizadas al momento en el que las plantas controles finalizan su expansión foliar.

PAP: fosfoadenosina fosfato

Parámetro “a”: es el 95 % del área foliar final de una hoja.

PO: potencial osmótico.

Ψ: Psi. Potencial hídrico.

SLGCs: células meristemoides que generan las células oclusivas de los estomas.

T₂: C.E. media de los discos del tratamiento control a las 2 horas T₂₄: C.E. de los discos de hojas de plantas salinizadas luego de congelarlas durante 24 horas.

TCA: ácido tricloroacético.

TPDC: tasa promedio de división celular.

TREPs: tasas relativas de elongación de plantas.

x0: es el tiempo termal, es decir, el valor de x en el cual la hoja alcanza el 50% de su área foliar final.

Zt: valor de área foliar cuando finaliza la expansión en las plantas controles (95 % del parámetro a de la curva sigmoidea).

INTRODUCCIÓN GENERAL

ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LAS ASTERÁCEAS Y EL GIRASOL

Cuenta la leyenda que la bella ninfa Clitia se enamoró de Apolo, dios de la luz y el sol. Lo observaba todos los días, desde que salía de su palacio al alba hasta su llegada por el oeste al atardecer. Tal era su amor por Apolo que se olvidó de comer y beber hasta que su cuerpo empezó a echar raíces y se convirtió en un girasol. Una flor que, aún hoy, no olvida el objeto de su amor y sigue con su diadema dorada el recorrido del Sol (Prentice, 1986).

Dónde floreció Clitia para adorar a Apolo ha sido un misterio hasta la fecha. Sin embargo, el descubrimiento del fósil intacto de una flor en una roca de la Patagonia sugiere que las denominadas asteráceas, entre las que se encuentra el girasol, surgieron hace unos 50 millones de años (mucho antes de lo que se pensaba) en lo que hoy es América del Sur (Barreda *et al.*, 2010).

El girasol (*Helianthus annuus* L.) pertenece a la familia botánica de las *Asteraceae*, una de las más abundantes y diversas del mundo (Barreda *et al.*, 2010). También llamadas compuestas de forma coloquial, reúne más de 23.000 especies distribuidas por todo el planeta, excepto en la Antártida, entre las que encontramos crisantemos, margaritas, dalias,

cardos o alcaucil. Los miembros de esta familia cosmopolita se distribuyen desde las regiones polares hasta los trópicos, conquistando todos los hábitats disponibles (Barreda *et al.*, 2010).

Sin embargo, determinar dónde surgió y de qué manera se propagó por todo el mundo ha sido una incógnita hasta el momento, en parte porque los investigadores han encontrado relativamente pocos fósiles y la mayoría han sido sólo de granos de polen. Según un estudio previo realizado por la Sociedad Argentina de Botánica (Barreda *et al.*, 2012), los registros más antiguos de polen fósil de asteráceas son de la Patagonia. Ello, sumado a que la subfamilia *Barnadesioideae* (con gran representación en esta zona de la América del Sur) es considerada la más basal en el árbol evolutivo de las asteráceas, llevó a los investigadores a formular la hipótesis de que el origen de la familia se hallaba en el sur del continente sudamericano con una posterior expansión hacia África, dando así origen a la mayoría de las especies que conocemos hoy (Barreda *et al.*, 2010). En la Figura 1.1 se ilustran imágenes obtenidas por el grupo de Viviana Barreda, investigadora perteneciente al grupo del Museo de Ciencias Naturales “Florentino Ameghino”.

Hallazgo en la Patagonia

Gracias al buen estado de conservación del fósil encontrado, Viviana Barreda y los demás miembros del equipo científico han podido observar varias características de la familia de las Asteráceas, incluidas la estructura de las hojas que rodean las flores y el vilano o papus, un conjunto de pelos simples o plumosos distribuidos alrededor de las flores (como es el caso del diente de león).

El fósil fue encontrado en rocas de hace unos 47,5 millones años a lo largo del río Pichileufú, en las áridas estepas del noroeste de la Patagonia. Los autores proponen que

pudo haber surgido una reserva ancestral de asteráceas en el sur del supercontinente de Gondwana antes de que se dividiera en América del Sur, África, India, Australia y la Antártida.

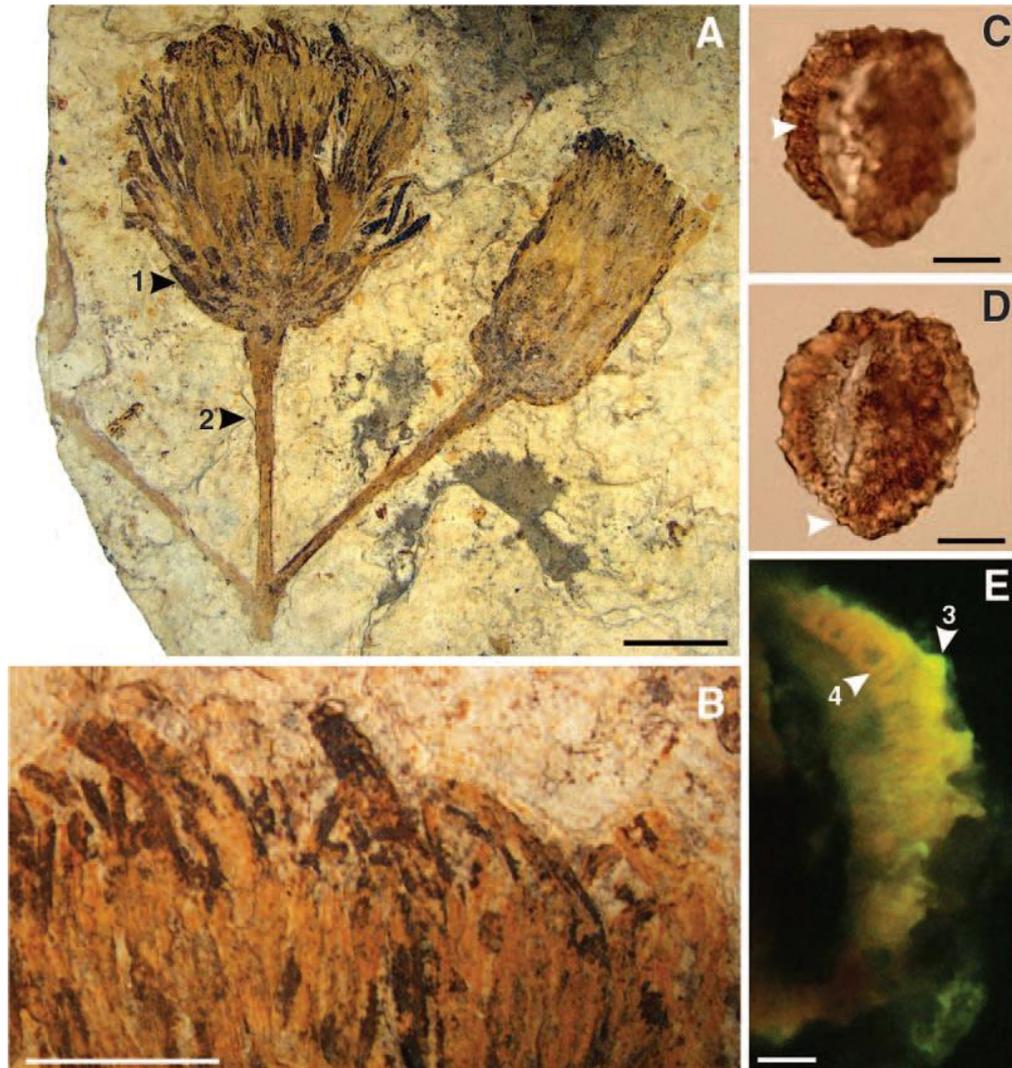


Fig. 1.1. Fósil de Asterácea. A: Capítulo visto a través de luz blanca transmitida. B: Flores. C-D: granos de polen en vista ecuatorial bajo luz blanca transmitida. E: sección óptica del grano de polen bajo luz fluorescente visto con microscopia confocal. Adaptado de Barreda *et al.* (2010).

A pesar de arrojar luz sobre el origen de las asteráceas, Tribsch y Stuessy (2012) consideran que serán necesarias más investigaciones para determinar cómo esta gran familia botánica colonizó rápidamente todo el planeta y aumentó de forma espectacular su diversidad.

ORIGEN DEL GIRASOL EN ARGENTINA

Como ya se ha mencionado, el girasol, y la familia a la que pertenece, son de origen americano. Con la colonización del continente americano por los europeos, fue descubierta esta especie y llevada a Europa con fines ornamentales (www.asagir.com.ar). Luego se expandió por Europa del Este y Rusia hasta que a finales del siglo XIX retorna a nuestro continente y, especialmente a la Argentina, de la mano de los colonos europeos que venían en búsqueda de trabajo y una mejor calidad de vida. En la Figura 1.2 se ilustra lo antedicho.

Las primeras referencias sobre girasol en la República Argentina (RA) se remontan al siglo XIX, cuando los colonos de origen hebreo afincados en las provincias de Entre Ríos, Santa Fe y Buenos Aires realizan las primeras introducciones de semilla para su propio consumo. Su difusión, como cultivo, comienza en forma casi simultánea, en la Colonia Mauricio, partido de Carlos Casares, en el oeste de la Provincia de Buenos Aires y en Basabilbaso, Provincia de Entre Ríos a partir de 1900, por agricultores inmigrantes (www.asagir.com.ar).

Le cabe el alto honor a Carlos Casares de ser la cuna del cultivo del girasol, y por ello toda la zona de su influencia, ubicada en el Centro de la Provincia de Buenos Aires y región agrícola-ganadera por excelencia, donde se festeja en la última semana de abril de cada año, la fiesta nacional del girasol. Se rinde así todos los años un merecido homenaje a

los primeros colonos que se alinearon en sus tierras allá por 1890 y traían consigo la humilde semilla desde lejanos países (<http://www.casares.gov.ar/>).



Fig. 1.2. Origen y movimiento del girasol a nivel mundial.

Corre el año 1890 cuando el Dr. Wilhelm Loewenthal es enviado por el filántropo Mauricio Hirsch para concretar la adquisición de campos que le permita salvar de las persecuciones y matanzas a pobladores rusos de religión judía de Europa. Su objetivo fue darles un espacio físico en un país con tolerancia religiosa y brindarles apoyo moral y financiero en su iniciación como colonos. En 1891 Loewenthal adquiere a esos fines casi 25.000 ha. de un fracasado centro agrícola de la región pampeana; el que es en adelante conocido como “Colonia Mauricio”, ubicada en el actual partido de Carlos

Casares, y en lo que se forma la primera colonia judía organizada por la Jewish Colonization Association en la República Argentina. La colonia tuvo etapas de crecimiento y decrecimiento, pero su establecimiento significó el impulso más significativo que recibió nuestra región en su lento proceso de desarrollo posterior a la cruenta posesión de estas tierras por el elemento blanco. El proceso agrícola se inició con la inmigración y estos colonos en su mayoría no preparados para el laboreo de la tierra vivieron con felicidad esta sacrificada pero liberadora actividad. Se puede ver en las estadísticas agrarias como del monocultivo inicial de avena estos colonos van incorporando el maíz, la alfalfa y el trigo; hasta llegar a ser considerada la más próspera de las colonias de la Empresa. Para 1902 la Colonia Mauricio tiene una extensión de más de 43.000 has., y los colonos inician un proceso de mecanización y conforman su primera cooperativa agrícola (<http://www.casares.gov.ar/>).

Según la tradición oral, habría sido Mauricio Fuccsman quien trajo las primeras semillas de girasol a nuestra región; aunque otros le atribuyen a Abraham Pep esta primacía pero lo cierto es que las semillas de girasol ingresaron a nuestro país en las maletas de los inmigrantes y según recuerdan algunos, aún en sus bolsillos. No fueron traídos para lograr con su graneo un aprovechamiento económico sino un goce estético por la hermosura de su flor y posiblemente como necesidad de recordar a su país de origen.

Para 1910, se comienza ya a sembrar no con fines ornamentales sino para su consumo personal (previo tostado) y para alimento de aves de corral. Su siembra y cosecha eran un duro y artesanal trabajo: se cortaba la cabeza del girasol a cuchillo y se dejaba secar; luego se recogía y desgranaba en “catres” de alambre y posteriormente se lo pasaba al pisadero (hecho para caballos) y se ventilaba a mano. En 1915 el colono José Pisarevsky vende al Sr. Jacobo Perelman una bolsa de semillas para que éste vea la posibilidad de su uso industrial y lo ofrezca en venta en plaza. La perseverancia de este colono y el apoyo que brinda la Unión de Comercio lleva a que en 1941 tras arduas gestiones se logre que el Ministerio de Agricultura de la Nación reconozca al girasol como cereal y se le otorgue valor comercial. El desarrollo e importancia para el simple habitante de Casares sigue siendo por muchos años el apego a su consumo personal. En el ámbito familiar y de amistad, en las tertulias, las reuniones de café, el cine, las canchas de fútbol, el “vicio” del

girasol tostado es de común observación, llegándose a ser indispensable la colocación de carteles en algunos espacios públicos prohibiéndose su consumo allí.

Encaminando el reconocimiento de girasol para usos industriales, convergen intereses económicos y locales para incentivar su siembra, que representará una fuente inapreciable de recursos para el país y se convertirá en pilar de la industria aceitera nacional. Coadyuva a este objetivo la imposición en 1931 de barreras aduaneras impuestas al aceite importado. Casares desde la década del '20 ha ido incrementando su área sembrada. Según datos de la lamentablemente extinta Junta Nacional de Granos, Casares tiene en la cosecha 1934-35 una producción de 16.445 toneladas sobre un total nacional de 61.818 toneladas. Llegamos así al año 1961 en que se declara al 31 de marzo “día nacional del girasol” y se designa a Carlos Casares sede de los festejos (www.fiestanacdelgirasol.com.ar).

IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL GIRASOL A NIVEL MUNDIAL Y NACIONAL

Producción y mercado mundial

El principal producto de la molienda de girasol y el que contribuye, casi excluyentemente, a la formación de su precio es el aceite. El resto, principalmente harina de proteína vegetal, se vende como insumo forrajero para la producción de carnes y leche, principalmente (www.asagir.com.ar).

En el mercado mundial de aceites, el de girasol es el cuarto en orden de importancia. En las campañas que van de 2003/2004 a 2009/2010 (consideradas para el Hemisferio Norte), el aceite de girasol participó con 8/9% de la oferta mundial (entre 9,2 y

10,7 millones de toneladas ofrecidas). Así, este producto compite en el segmento de aceites de mejor calidad junto con el de canola. En las campañas mencionadas, la producción ha crecido 10% (de 9,2 a 10,1 millones de toneladas). Por su parte, el consumo ha crecido 14,9% y lo más significativo es el aumento del 30% en las exportaciones mundiales (de 2,7 a 3,5 millones de toneladas).

Estos indicadores contrastan con los relativos a la semilla en la que la producción por hectárea ha aumentado 3,8% (de 26,9 a 28 millones de toneladas) luego de una cosecha record de 30,2 millones de toneladas de girasol en 2006/07. De esta manera, se ha llegado a exportar menos semillas que antes (33,5% menos) y el consumo mundial ha crecido apenas el 7,6%. Para una comparación con los indicadores de harinas proteicas, la producción ha crecido un 6,8% (pasando de 10,2 a 10,9 millones de toneladas), las exportaciones han aumentado un 15% y el consumo un 6,7% (las tres cifras son inferiores a las variaciones en la oferta de aceite) (www.asagir.com.ar). En el período mencionado, se puede observar una menor relevancia del girasol en el mercado de harinas (ha perdido participación de un 5,4% a un 4,7%). La presencia creciente de la oferta proveniente de la molienda de soja (45% de proteína) ha mantenido en un nivel muy alto la tasa de crecimiento de la oferta global. Para todas las harinas pasó de 190 a 234 millones de toneladas (22,8% de suba), impulsada principalmente por la participación de la soja, representativa del 69% del mercado, que ha crecido un 25,7% en los cinco años, indicador que contrasta con apenas el 6,8% en la harina de girasol. También aquí es notable el aumento diferenciado en las exportaciones. Las de harina de girasol han pasado de 2,9 a 3,3 millones de toneladas (15% de suba) en un mercado global que creció 24% en cinco años (www.asagir.com.ar).

Como consecuencia de estos aumentos en la demanda de subproductos, la producción de semillas de oleaginosas ha crecido 16,3%, pasando de 336 a 391 millones de toneladas. En dicha oferta, el aporte de la producción de girasol ha sido de entre 25,4 y 30,2 millones de toneladas, según los años, con un crecimiento, en las cinco temporadas

analizadas, de apenas el 3,8%, un valor muy bajo comparado con el 17,7%, de suba en soja y el 20,9%, de crecimiento en canola.

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 el Hemisferio Sur es la Argentina, con 3,5/4,5 millones de toneladas. (www.asagir.com.ar)

Producción y mercado nacional

La evolución del cultivo de girasol en la Argentina puede dividirse en seis etapas o períodos bien definidos (www.asagir.com.ar):

- Cultivo pre-industrial, fines del siglo XIX y principios del XX.
- Gran expansión, entre 1930 y 1950.
- Crisis, en la década del 50.
- Recuperación, entre 1960 y 1975.
- Difusión de híbridos, a partir de 1975.
- Re-localización del cultivo, a partir de 2000.

En la figura 1.3 se resume lo anteriormente dicho.



Fig. 1.3. Etapas en la evolución del girasol en argentina. Adaptado de Asagir.com

En períodos de tiempo más recientes, si se estudian las campañas que van de la de 1998/1999 a la 2007/2008, pueden distinguirse dos etapas muy claras: **a)** hasta la campaña 1999/2000; y **b)** las ocho restantes. En la primera etapa, hubo un fuerte entusiasmo por el cultivo, que se reflejó en un record (1998/1999) de 4,24 millones de hectáreas y una producción de 7,1 millones de toneladas. Ése año, el rinde fue muy bueno en la comparación histórica (1762 kg/ha). En la campaña siguiente, se produjeron más de 6 millones de toneladas. Ambas ofertas fueron volcadas a un mercado mundial fuertemente debilitado en materia de precios, a raíz de la irrupción de la oferta del aceite de palma (cultivo perenne, muy significativo en Asia, cuya producción entró al mercado masivamente hacia fines de la década de los '90). Por esta razón, se vieron precios inusitadamente bajos para los aceites: valores en torno a 235 U\$\$/tn Rotterdam para la palma y apenas 413 U\$\$/t para girasol.

La etapa **b)** se inicia con una abrupta caída del área en nuestro país como consecuencia del quebranto económico inducido por los magros precios internacionales. La superficie cayó 45% en 2000-01 y la producción apenas llegó a 3,18 millones de toneladas. Desde entonces, ha habido una recuperación gradual en el área sembrada, que alcanzó las 2,7 millones de hectáreas en 2007/2008 (36,6% más que el valor piso). La

producción ha crecido 41,9%, hasta las 4,51 millones de toneladas y los rindes apenas aumentaron 2,5% (www.asagir.com.ar).

La traslación del cultivo hacia zonas con mayor riesgo agroecológico y tierras de menor calidad y aptitud ha hecho que los rendimientos, pese a importantes cambios tecnológicos incorporados, no hayan experimentado subas significativas. En la campaña 2007/2008 se obtuvieron 1710 kg/ha a nivel país y, en los últimos ocho años, el rango osciló entre 1502 Kg/ha y 1904 kg/ha. En la figura 1.4 se ilustran las principales zonas productoras de la República Argentina.

Habitualmente la Argentina es el primer exportador mundial de aceite y harina de girasol. En la campaña 2007/2008, nuestro país vendió 1,45 millones de toneladas (41,4% del total) de aceite. Junto a Ucrania, (el 33,4%), y la Federación Rusa, (el 12%) suman el 87% de la oferta. Algo similar ha ocurrido en las ventas de harina de girasol. Con 1,33 millones de toneladas, nuestro país ha aportado el 37,7% al mercado mundial. Ucrania, el 33,5% y la Federación Rusa, el 18 % (www.asagir.com.ar).

El mercado de exportación de la semilla (de 1,5 millones de toneladas) no está tan concentrado como el de los subproductos. La Argentina aporta menos de 200.000 toneladas, la mitad de las que ofrece el principal exportador: la Unión Europea (integrada hoy por 27 naciones).

La participación de las distintas provincias en el área sembrada indica que la reasignación de tierras ha sido por demás significativa. En la provincia de Buenos Aires, entre 2000/01 y 2006/07, el área ha aumentado un 23%. De representar el 48,6% del total del país ha pasado al 48,2%. La segunda provincia en importancia a comienzos del año 2000, Córdoba, ha visto reducida un 68% la superficie. La Pampa, tercera provincia

productora, la ha incrementado en un 30,5%. Chaco y Santa Fe fueron las que mayor aporte han hecho al crecimiento de la superficie. La primera ha pasado de 140.000 a 352.000 hectáreas (152% de aumento) y la segunda, de 117.000 a 193.000 (un 64% más) (www.asagir.com.ar).

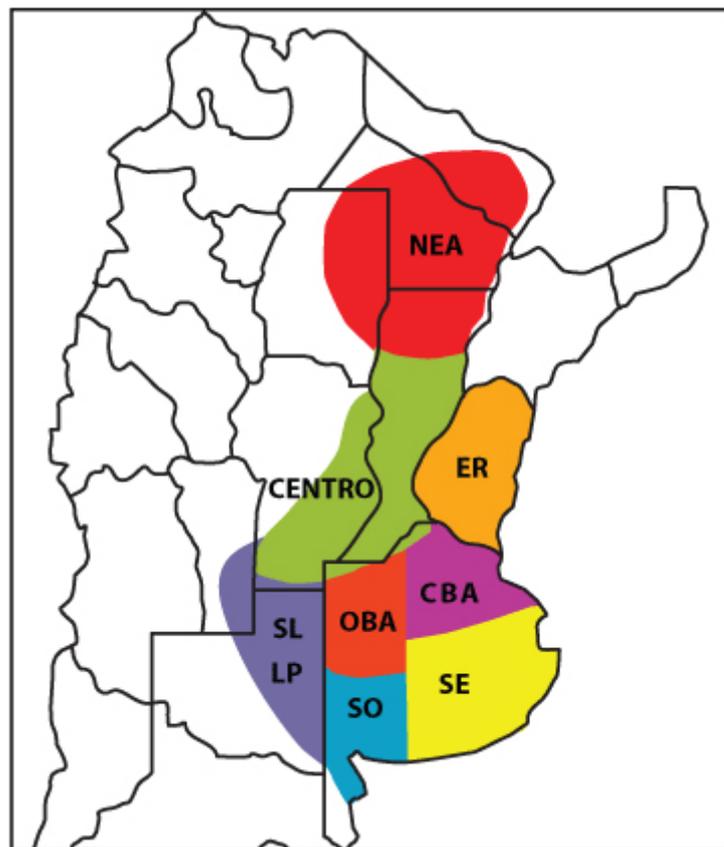


Fig. 1.4. Principales zonas girasoleras en Argentina.

El aporte de la cadena de girasol a la economía argentina se explica por la producción primaria y el valor agregado de la industrialización. La exportación de los productos derivados del girasol representa una de las mayores fuentes de divisas para la Argentina, cuya economía tiene una gran dependencia de la eficacia del complejo oleaginoso (www.asagir.com.ar).

Según la Bolsa de Cereales de Buenos Aires al 26 de Abril de 2012 se completo 100% la cosecha nacional del girasol 2011/12. El área apta fue de 1,79 de las 1,86 millones de hectáreas plantadas, reportándose como pérdidas 64.000 hectáreas. El rinde promedio nacional fue de 2.000 kg/ha y la producción final fue de 3,6 millones de toneladas. La campaña 2011/12 finalizó con una producción 5,9% mayor que la anterior. El incremento fue por la mayor superficie cultivada (1,86 contra 1,73 Mha del ciclo anterior) ya que el rendimiento promedio nacional fue menor, 20 qq/ha, contra 20,3 qq/ha, de 2010/11.

El informe WAP del USDA de Mayo-2012, proyectó la cosecha Argentina de girasol 2012/13 en 4 millones de toneladas (3,4 y 3,67 años anteriores). Esto en base a un área a cosechar de 2 millones de hectáreas (1,82 y 1,74 años anteriores) y un rinde proyectado de 2 t/ha (1,87 y 2,11 años anteriores) (www.aial.fullblog.com.ar/inta_perspectivas_agricolas_20122013).

SALINIDAD Y GIRASOL. IMPORTANCIA DE SU ESTUDIO FRENTE AL ACTUAL PANORAMA AGRONÓMICO

El efecto de ambientes menos favorables para la agricultura (como zonas con marcados déficits hídricos y bajos salinos) donde, desde hace unos años, se siembra gran parte del girasol argentino, se confunde frecuentemente con la evolución del mejoramiento genético de esa especie oleaginosa. El progreso logrado en los últimos 20 años de mejoramiento genético del girasol ha sido analizado en la región argentina central por de la Vega (2007).

El girasol ha avanzado en los últimos años hacia zonas marginales, incluyendo áreas salinizadas (ej. sudoeste de la provincia de Buenos Aires, cuenca del Salado) y existe interés explícito en incrementar su tolerancia al estrés abiótico. Estudios fisiológicos y

genéticos han mostrado, por ejemplo, que la capacidad de ajuste osmótico es uno de los caracteres que contribuyen al mantenimiento de su rendimiento bajo estrés hídrico (Chimenti y Hall 1993; Chimenti y Hall, 1994; Chimenti *et al.*, 2002). Por otra parte, también se ha detectado variabilidad intraespecífica para tasa y duración de la expansión foliar en respuesta a tal condición (Pereyra-Irujo *et al.*, 2008). **En general, las respuestas a déficit hídrico han sido abordadas por muchos grupos de trabajo; por el contrario, es relativamente escasa la información acerca de mecanismos de tolerancia para estrés salino.**

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA SALINIDAD EN LOS CULTIVOS

Aunque las plantas vasculares, al igual que todos los seres vivos conocidos, surgieran del medio marino, el catión Na^+ no se encuentra entre sus iones fisiológicos (Tan y Dekker, 1993). Solo desde que comenzó la domesticación del suelo de forma masiva en el Neolítico (Olsson, 2001), las plantas glicófitas (sensibles a sal) cultivadas, y en general todas las plantas cercanas a los cultivos, comenzaron a estar en contacto con ésta y otras sales, debido a la desecación de los acuíferos y al riego con aguas duras.

La salinización de los suelos es una causa importante de restricción en el uso productivo de las tierras (Sanderson *et al.*, 1997) dado que reduce el crecimiento y la productividad en la mayoría de los cultivos (Flowers, 2004) imponiendo a las plantas limitaciones de dos tipos: hídricas (osmóticas) y desbalances iónicos (Greenway y Munns, 1980). La morfología y anatomía de las plantas, variables a distintos niveles del vástago (Vegetti, 1997; Vegetti y Pilatti, 1998; Ramos *et al.*, 2002; Vegetti, 2002; Perreta y Vegetti, 2004; Reinheimer *et al.*, 2005; Perreta y Vegetti, 2006), es modificada dentro de un rango determinado de plasticidad morfológica por condiciones limitantes del ambiente y por agentes patógenos (Ribichich *et al.*, 2000; Ribichich y Vegetti, 2001; Amsler *et al.*, 2004; Perreta y Vegetti, 2005; Céccoli *et al.*, 2011). Elevadas concentraciones de sales en el sustrato, especialmente cloruros y sulfatos de sodio, afectan el crecimiento de las plantas, modificando sus características morfológicas, anatómicas (Kalaji y Pietkiewicz,

1993; Huang y Redmann, 1995; Ramos *et al.*, 2004; Céccoli *et al.*, 2011), así como sus respuestas fisiológicas (Zhu, 2003).

Las respuestas de las plantas a los estreses salinos e hídricos tienen mucho en común. La salinidad reduce la habilidad de las plantas de tomar agua, y esto causa rápidamente una reducción en las tasas de crecimiento, con cambios metabólicos idénticos a aquellos causados por déficit hídrico. La reducción inicial en el crecimiento del vástago o en las tasas relativas de crecimiento de plantas (Rajendran *et al.*, 2009) son debidas probablemente a señales hormonales generadas por las raíces (Munns, 2002).

Por otro lado, existen efectos específicos de la salinidad, que tienen, más tarde, un impacto sobre el crecimiento. Si excesivas cantidades de sal entran a la planta, éstas pueden eventualmente alcanzar niveles tóxicos en las hojas transpirantes más viejas, causando senescencia prematura, y reduciendo el área foliar fotosintéticamente activa a niveles que no pueden soportar el crecimiento. Estos efectos toman tiempo en desarrollarse. Las plantas tolerantes a la salinidad difieren de las sensibles en que tienen una baja tasa de transporte de Na^+ y Cl^- hacia las hojas, y la habilidad de compartimentizar estos iones en vacuolas para prevenir su aumento en el citoplasma o en las paredes celulares y de esta forma, evitar la toxicidad causada por sal (Munns, 2002). **A partir de la existencia de mecanismos que evitan la entrada de Na^+ a los tejidos vegetales en diferentes especies, en el presente trabajo de tesis se propone evaluar la hipótesis de que se encontrará variabilidad intraespecífica para la acumulación foliar de Na^+ en diferentes genotipos de girasol, tanto en líneas endocriadas utilizadas para mejoramiento como en híbridos comerciales actualmente utilizados.**

La salinidad afecta el 7% de la superficie mundial de tierra, lo que equivale a 930 millones de hectáreas (Rhoades *et al.*, 1992; Szabolcs 1992). La salinización y el estrés salino pueden ser, hasta cierto punto, controlada y evitada cambiando las prácticas de manejo en las explotaciones. En agricultura bajo riego existen mejores prácticas de irrigación que pueden ser utilizadas, como el riego por goteo, para optimizar el uso del agua. En agricultura de secano, las prácticas como la rotación de cultivos anuales con especies perennes de raíces profundas pueden restaurar el balance entre la lluvia y el uso

del agua, previniendo de esta manera, el riesgo de que se produzca una salinización por el ascenso de agua hacia zonas superficiales y concentrando, de esta forma, las sales en la superficie.

Normalmente, se define la tolerancia a la salinidad, como la diferencia de porcentaje de biomasa perdida durante un tratamiento salino y a largo plazo (Munns, 2002), con respecto a un tratamiento no salino, es decir, cuanta más biomasa pierda una especie al ser tratada con sal, menos tolerante es. Como ejemplo nos serviría comparar un tratamiento con 200 mM de NaCl en remolacha, que reduciría un 20% el peso seco y es clasificada como tolerante a sal; en algodón, este tratamiento reduciría un 60% su biomasa y se clasificaría como moderadamente tolerante y, en soja, provocaría la muerte de la planta, clasificándose a ésta como sensible a sal (Greenway y Munns, 1980). Continuando con esta clasificación, aparecen las plantas tolerantes a sal o halófitas, que no sólo son capaces de tolerar elevadas concentraciones de ésta sin reducir su biomasa con respecto al control, sino que en muchos casos, la sal es un estimulante necesario del crecimiento (Flowers *et al.*, 1986). Aplicando el ejemplo anterior, la halófito *Suaeda maritima* (*Crassulaceae*) necesita de esos 200 mM de NaCl para su correcto desarrollo (Flowers *et al.* 1977, 1986). El trigo duro tiene la reputación de ser más sensible a la salinidad que el trigo pan, y por lo tanto su rendimiento es más afectado (Francois, 1996). Sin embargo, sobre cortos períodos de tiempo en salinidad, no se han observado diferencias entre cultivares de trigo duro y trigo pan e incluso entre cultivares de cebada y triticale (Munns *et al.*, 1995).

Es muy importante conocer los efectos de la salinidad, según el período de tiempo del cual se esté hablando o el tiempo de exposición de una especie vegetal a la sal. Cuando las plantas son expuestas a salinidad en experimentos de laboratorio, hay una rápida y temporal caída en las tasas de crecimiento seguida por una gradual recuperación a una nueva tasa reducida de crecimiento. Los efectos temporales son claramente debidos a los cambios rápidos y transitorios en las relaciones hídricas de la planta (Munns, 2002).

Si se toman períodos de tiempo que van de minutos a horas, en la hojas hay rápidos e instantáneos efectos en las tasas de crecimiento con un cambio repentino en la salinidad. Repentinas y transitorias reducciones en las tasas de expansión foliar han sido registradas

en maíz (Cramer y Bowman 1991; Neumann 1993); arroz (Yeo *et al.*, 1991), en trigo y cebada (Passioura y Munns 2000) en salinidad. Los mismos cambios ocurren cuando se aplica KCl, manitol o polietilenglicol (PEG) (Yeo *et al.*, 1991; Chazen *et al.*, 1995) mostrando que las respuestas no son sal específicas para la salinidad. Minutos después de la iniciación de la declinación del crecimiento foliar, se observa una gradual recuperación, que puede continuar o prolongarse por 30 minutos o más antes de alcanzar una nueva tasa constante de crecimiento (Munns, 2002). **Dado lo anterior, en la presente tesis se estudiaron las respuestas tempranas de genotipos de girasol sometidos a estrés salino, para poner a prueba la hipótesis de que los efectos tempranos de la salinidad sobre el crecimiento serán independientes de la posterior acumulación foliar de Na⁺, ya que al comienzo de la imposición de la salinidad, las plantas aún no habrían llegado a acumular Na⁺ en sus tejidos.**

Existen, por otro lado, efectos específicos de la sal. Un efecto específico puede ocurrir en la raíz, donde la salinidad induce una deficiencia de Ca⁺⁺, que es más pronunciada en genotipos con bajas tasas de absorción del mismo. Si se consideran períodos de tiempo de días en la exposición al estrés salino, el crecimiento foliar es frecuentemente más reducido (por la salinidad) que el crecimiento radical, un fenómeno en común con los suelos secos (Hsiao y Xu, 2000; Munns y Sharp, 1993). Que sean efectos comunes indican la probabilidad de que sean factores asociados con el estrés hídrico más que a efectos ion-específicos. Esto es comprobado por la evidencia de que el Na⁺ y el Cl⁻ se encuentran siempre debajo de las concentraciones tóxicas en las células en crecimiento. Sin embargo, en períodos prolongados de tiempo, el Na⁺ puede comenzar a acumularse en los tejidos vegetales y llegar a ser tóxico para las plantas. **A partir de esto, en la presente tesis se estudiaron los efectos a largo plazo de la salinidad sobre el crecimiento en girasol, aseverándose que los genotipos con mayor inclusión foliar de Na⁺ presentarán las mayores reducciones en parámetros de crecimiento, es decir, serán los menos tolerantes; mientras que los genotipos excluyentes foliares de Na⁺ serán los más tolerantes a las respuestas prolongadas de la salinidad sobre el crecimiento.**

Si es el estado hídrico, la regulación hormonal o el aporte de fotoasimilados los que dominan sobre el crecimiento de las plantas bajo suelos secos o salinos, es un capítulo que

ha sido debatido durante las últimas dos décadas, y aún no se ha resuelto. Sobre la escala de días, existen evidencias que sugieren que las señales hormonales más que las relaciones hídricas, son las que están controlando el crecimiento en suelos salinos. La evidencia para esto es que la expansión foliar a las 24 horas de plantas en suelos salinos no responde a un incremento en el estado hídrico foliar. Además, los experimentos de “Split-root” con plantas cuyos sistemas radicales fueron divididos entre suelos secos y húmedos mostraron que la expansión foliar decreció mientras el estado hídrico no fue afectado (Saab y Sharp, 1989; Gowing *et al.*, 1990).

Si la salinidad es alta, y si la planta tiene poca habilidad para excluir NaCl, puede ocurrir un marcado daño en las hojas viejas con el paso de los días, como se encontró para lupino blanco una vez que la salinidad se incrementó por encima de los 100 mM (Munns, 1988). El daño por salinidad se debe al Na⁺ o al Cl⁻ (o a ambos) acumulándose en las hojas en transpiración a niveles excesivos, excediendo la habilidad de las células de compartimentizar estos iones en la vacuola. Los iones, entonces, aumentan rápidamente en el citoplasma e inhiben las actividades enzimáticas, o se incrementan en las paredes celulares y deshidratan la célula (Flowers y Yeo, 1986; Munns y Passioura, 1984). Consecuentemente la célula muere por envenenamiento o deshidratación, dependiendo si la concentración de los iones aumenta en el citoplasma o en la pared. **Por este motivo, en la presente tesis se abordó la hipótesis donde se afirma que los efectos de la salinidad sobre la dinámica de la expansión foliar de girasol, y sus determinantes, estarán influidos diferencialmente por la acumulación foliar de Na⁺, en donde los genotipos que mas incluyan Na⁺ serán los que resulten más afectados en su expansión foliar por el efecto venenoso del Na⁺ en los tejidos foliares.**

EFFECTOS FISIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA SALINIDAD EN LAS PLANTAS

Como ya se ha indicado, el efecto de la salinidad en plantas depende de la concentración, como ocurre con todo tipo de sustancias, pero en este caso es importante indicar que, a bajas concentraciones, la sal causa un efecto tóxico en la célula por el efecto

de sus iones por separado, pero cuando aumenta su concentración y por tanto aumenta aún más este efecto, es sumatorio su efecto osmótico, es decir el efecto general que provoca desecación o plasmólisis celular. Así, a concentraciones elevadas de NaCl, ambos efectos convivirán en el estrés y serán indistinguibles. Por esto, muchas veces se utiliza LiCl como sal estresante, ya que en ocasiones, una concentración baja de NaCl no es suficiente para causar un efecto fenotípico visible provocado por el componente tóxico, contrastando con la mayor potencia tóxica del LiCl. También es común usar una solución concentrada de macronutrientes como el medio Hoagland (Hoagland y Snyder, 1933) modificado para poder distinguir sendos efectos (Termaat y Munns, 1986).

Fisiológicamente, uno de los efectos que más temprano se puede detectar al tratar una planta con NaCl es la reducción en la tasa de crecimiento de las hojas, como se ha comprobado en maíz (Cramer y Bowman, 1991; Neumann, 1993), arroz (Yeo *et al.*, 1991) y trigo y cebada (Passioura y Munns, 2000). Pero estos efectos también se pueden detectar al tratar con KCl o manitol, sustancias que sólo provocan estrés osmótico (Yeo *et al.*, 1991; Chazen *et al.*, 1995). Por esto, no se puede decir que este efecto esté exclusivamente causado por la sal.

En la raíz ocurre algo similar. No tan súbito, pero si es rápido el descenso de la tasa de elongación al tratar con NaCl (Rodríguez *et al.*, 1997). También obtenemos este efecto al tratar sólo con KCl o manitol (Frensch y Hsiao, 1994, 1995), por lo que tampoco se puede decir que éste es un efecto específicamente salino. Sí se obtiene este efecto específico en el caso de la deficiencia de calcio en las raíces. Al añadir sal al medio de crecimiento, desciende la actividad de este catión (Cramer y Läuchli, 1986), descendiendo como se ha indicado anteriormente la tasa de crecimiento. Este efecto no ocurre con tratamientos exclusivamente osmóticos, y puede ser paliado con la adición exógena de Calcio (Cramer *et al.*, 1988).

Los efectos de la acumulación interna de iones comienzan a observarse a largo plazo. Un primer síntoma puede consistir en el amarillamiento de las hojas jóvenes y la muerte de las hojas más viejas, siendo éste el lugar donde se está acumulando el exceso de sal. Más adelante, en el Capítulo II, se muestra como los genotipos considerados como incluyentes

foliares de Na^+ presentan, fenotípicamente, evidencias de daño por toxicidad del Na^+ . Pero todos estos efectos a nivel fisiológico y fenotípico, tienen su origen a nivel molecular. Numerosos son los procesos descritos en los que intervienen los iones principales asociados a la salinidad por Na y Cl, destacando entre otros el desplazamiento de cationes fisiológicos de los centros activos de algunas enzimas, por la acción de Na^+ y Li^+ . Así, se ha demostrado que la actividad de enzimas como la malato deshidrogenasa, aspartato transaminasa, glucosa-6 deshidrogenasa o isocitrato liasa provenientes de guisante (*Pea sativa*), son inhibidas por la adición “*in vitro*” de NaCl (Greenway y Osmond, 1972). También es conocido que una enzima tan crucial como la ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa (RUBISCO), es inhibida por NaCl en garbanzo (*Cicer arietinum*) (Soussi *et al.*, 1998).

Mención especial requieren también los homólogos en planta de los genes HAL de levaduras. Estos genes fueron identificados en dichos organismos como dianas de la toxicidad iónica, ya que en general su sobreexpresión en *Saccharomyces cerevisiae* aumenta la tasa de tolerancia. Destaca el gen descrito en la cepa de la levadura HAL2 (Gläser *et al.*, 1993; Murguía *et al.*, 1995; 1996), de la que se han encontrado homólogos en *Arabidopsis thaliana* como SAL1 (Quintero *et al.*, 1996) o AHL (Gil-Mascarell *et al.*, 1999). Concretamente, este gen codifica una nucleotidasa 13 que desfosforila el 3'-fosfoadenosina 5'-fosfato (PAP) y 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS), y que se inhibe en presencia de NaCl y LiCl, pero no en el caso de KCl. Así, como este gen interviene en la ruta de asimilación del Azufre, podemos decir que estas sales influyen negativamente en esta ruta al inhibir una de sus enzimas.

También es importante la inhibición del proceso fotosintético, por la acción del cloruro sódico en distintas especies vegetales (Downton, 1977; Bethke y Drew, 1992; Longstreth y Nobel, 1979). Aunque el daño principal de los fotosistemas por la sal no es directo, sino que es consecuencia de procesos secundarios causados por la sal, como el aumento del estrés oxidativo en cloroplastos (Hernández *et al.*, 1996) o el descenso general de nutrientes necesarios para el buen funcionamiento de este proceso, debido a la dificultad que experimenta la planta para tomarlos desde el suelo en presencia de NaCl (Couia *et al.*, 1994; Martínez y Lauchli, 1994; Fernández-García *et al.*, 2002). Podemos encontrar un proceso de daño directo de los fotosistemas al desplazar el ion Na^+ al Ca^{++} (Shen y Katoh,

1991), siendo este efecto totalmente reversible. **El efecto de la salinidad sobre la concentración de clorofilas y sobre el aumento del estrés oxidativo en los tejidos por la salinidad, también fueron abordados en este trabajo de tesis. El estrés oxidativo fue medido en forma indirecta, cuantificando las concentraciones del subproducto de la peroxidación de lípidos (como es el malondialdeído, MDA); como así también cuantificando el nivel de daño de membranas. Estos aspectos se abordan en el Capítulo II.**

Otro factor limitante del crecimiento, provocado por la salinidad, es la estabilización del ADN en general (Chadalavada *et al.*, 1997). Es decir, el NaCl provoca un aumento de la Tm del ADN, dificultando que enzimas como la ARN polimerasa puedan unirse a él. Al mismo tiempo las ADNsas y nucleasas hacen su trabajo degradando esta molécula y provocando, muerte celular, al menos observada en meristemo radicular de cebada (Katsuhara y Kawasaki, 1996). Aunque este proceso sea provocado por el componente tóxico de la sal, se ha detectado que algunos osmolitos como la prolina o betaina, aparte de proteger ante un estrés osmótico, pueden hacer descender la Tm y por tanto contrarrestar el efecto de la sal (Chadalavada *et al.*, 1997).

El girasol ha sido clasificado como moderadamente tolerante a la salinidad (Andrade *et al.*, 1993; Francois, 1996), y las mermas en rendimiento en tales ambientes han sido atribuidas a la disminución en el número de aquenios por capítulo (Francois, 1996). Por otra parte, se ha informado que las restricciones en expansión foliar afectan el número de aquenios llenos por capítulo y su peso final (Alkio *et al.*, 2003). En girasol, la tasa de expansión foliar se reduce en respuesta a la salinidad del medio (Rawson y Munns, 1984). Los antecedentes previos sugieren, en el caso del girasol y bajo condiciones de salinidad, una vinculación entre la expansión foliar y las mermas en el rendimiento. **Como son escasos los estudios de los mecanismos de tolerancia a salinidad en girasol y, dado que, los estudios de expansión foliar se han realizado principalmente sobre estrés hídrico, en este trabajo de tesis se propone evaluar y poner a prueba los mecanismos de tolerancia a salinidad en girasol. Además se pondrá a prueba la hipótesis de la existencia de correlaciones entre los diferentes niveles de concentración foliar de Na⁺ para diferentes genotipos, con las respuestas de la dinámica de la expansión foliar en**

salinidad y con las respuestas del crecimiento a corto y largo plazo, como posibles mecanismos de tolerancia a estrés salino.

SALINIDAD, ACUMULACIÓN Y PARTICIÓN DE MATERIA SECA

Como ya se dijo, elevadas concentraciones de sales en el sustrato, especialmente cloruros y sulfatos de sodio, afectan el crecimiento de las plantas modificando sus características morfológicas, anatómicas (Kalaji y Pietkiewicz, 1993; Huang y Redmann, 1995; Ramos *et al.*, 2004; Céccoli *et al.*, 2011) y respuestas fisiológicas (Zhu, 2003). Un efecto primario del estrés salino es la reducción del crecimiento foliar, similar a los efectos que ocurren bajo estrés hídrico (Munns y Tester, 2008). Adicionalmente, en especies herbáceas, la ramificación se ve reducida por efecto de la salinidad y este parámetro es muy importante al momento de determinar la totalidad de materia seca acumulada en una especie en cultivo (Wu, 1981; Maas *et al.*, 1994). La partición y acumulación de biomasa en estados vegetativos tempranos está cercanamente relacionado al número de vástagos y el número de hojas (Zabala *et al.*, 2011). La ramificación y el crecimiento foliar son más afectados en especies que provienen de zonas no salinas que de aquellas que provienen de zonas salinizadas. **Los estudios que se realizaron en la presente tesis sobre modificaciones en la acumulación de materia seca y su partición aportan información inexistente hasta la fecha, además de permitir poner a prueba la hipótesis de la existencia de una correlación entre la inclusión foliar de Na^+ y los cambios diferenciales en aquellas variables de crecimiento en genotipos de girasol bajo salinidad (estas variables de crecimiento en estado vegetativo son las que permitirán establecer un ranking de tolerancia a largo plazo). El crecimiento medido en genotipos de girasol, a comienzos de la imposición del estrés, permitirá determinar la existencia de mecanismos de tolerancia al estrés osmótico (tolerancia a corto plazo) y saber si esta tolerancia es independiente de la acumulación foliar de Na^+ .**

En Eucaliptus híbridos, la mayor parte de los caracteres morfológicos y fisiológicos son inherentes al propio genotipo (Potts y Dungey, 2004) mientras que la superioridad en acumulación de biomasa es debida a su adaptabilidad y plasticidad (Feikema *et al.*, 2012). Meddings *et al.* (2001), por ejemplo, encontraron que la tolerancia de las semillas del

híbrido *E. camaldulensis x globulus* a la salinidad y a la inundación fueron evidentes en diferentes tratamientos en el campo; sin embargo, Dale y Dieters (2007) reportaron considerable vigor híbrido en el crecimiento de dos híbridos relativos a su especie parental con 7 años de edad y bajo suelos salinos en un sitio cerca de Mt Scobie (Victoria, Australia) considerando cambios en acumulación y partición de la materia seca (Feikama *et al.*, 2012).

Algunos estudios realizados sobre *Echinochloa pyramidalis* demostraron que la acumulación de materia seca estuvo linealmente correlacionada con la salinidad (Barreto de Morais Neto *et al.*, 2012). Esto puede ser explicado por muchos factores, como por ejemplo: al efecto osmótico, debido a que las altas concentraciones de sales disminuyen el potencial osmótico, causando una mayor retención de agua (haciendo que esté disponible en una menor cantidad hacia la planta) (Gheyi *et al.*, 2000); al efecto tóxico, caracterizado por la acumulación de iones específicos en la planta. Por ejemplo, el exceso de Na^+ y Cl^- en el protoplasma afecta la fotofosforilación, la cadena respiratoria, la asimilación de nitrógeno y el metabolismo de proteínas. Estos iones comienzan a inhibir la mayoría de las enzimas involucradas en estos procesos a concentraciones a partir de los 100 mM (Larcher, 2000; Munns, 2002). Además, la salinidad también modificó la partición de la materia seca en esta forrajera, afectando su capacidad para adquirir recursos y nutrientes (Barreto de Morais Neto *et al.*, 2012). **La generación de conocimiento respecto a los cambios en la acumulación en materia seca y en el crecimiento en distintos genotipos de girasol, sumado a la comprobación de la existencia diferencial de inclusión foliar de Na^+ , nos permitirán poner a prueba la hipótesis de existencia de mecanismos de tolerancia a salinidad y su correlación con la acumulación foliar de Na^+ . En otras palabras, se podrá verificar si existe variabilidad genotípica para acumulación foliar de Na^+ en genotipos de girasol bajo salinidad, si existen mecanismos de tolerancia a salinidad a corto y largo plazo, y si existe correlación entre estos dos aspectos.**

MECANISMOS DE TOLERANCIA A LA SALINIDAD

Bajo todos los mecanismos subyacentes, se encontró tempranamente, técnicas bioquímicas, que las enzimas de las halófitas (plantas adaptadas a ámbitos salinos) no son más tolerantes a altas concentraciones de NaCl que aquellas pertenecientes a las glicófitas. Por lo general, el Na⁺ comienza a inhibir la mayoría de las enzimas a una concentración por encima de los 100 mM. Incluso el K⁺ puede inhibir enzimas a concentraciones de 100-200 mM (Greenway y Osmond 1972). Los mecanismos de tolerancia, son, consecuentemente de dos tipos principales: aquellos que minimizan la entrada de sal dentro de la planta, y aquellos que minimizan la concentración de sal dentro del citoplasma.

Bajo transporte de sal hacia las hojas (el mecanismo conocido como “exclusión de sal”): la exclusión de sal funciona para reducir la tasa a la que la sal se acumula en los órganos transpirantes. Las plantas transpiran 30-70 veces más agua que la que usan para la expansión celular, pero este valor, obviamente depende ampliamente de las condiciones ambientales prevalentes. Los mecanismos por los cuales la sal es excluida de las hojas son los siguientes:

1. Carga en el xilema: existe evidencia de una carga preferencial de K⁺ más que Na⁺ por las células de la estela que está bajo control genético (Gorham *et al.*, 1990). Este mecanismo ha sido encontrado en trigo donde existen co-transportadores de Na⁺ y K⁺, pero que, a elevadas concentraciones de Na⁺ en en la solución del suelo, comienzan a presentar mayor afinidad por el catión K⁺ (Schachtman *et al.*, 1994; Horie *et al.*, 2009).

2. Remoción de la sal desde el xilema en la parte superior de las raíces, el tallo, pecíolo o vainas de las hojas: en muchas especies, el Na⁺ es retenido en la parte superior del sistema de raíces o en la parte inferior del sistema de vástagos, indicando un intercambio de Na⁺ por K⁺ por las células que revisten al flujo transpiratorio. **En la presente tesis se estudió la acumulación diferencial de Na⁺ y K⁺ en distintas partes de la planta en líneas de girasol para evaluar la existencia de este mecanismo de exclusión foliar de Na⁺.**

3. Compartimentación intracelular: Idealmente, el Na^+ y el Cl^- deberían ser secuestrados en la vacuola de las células. **La compartimentación en vacuolas permitiría, a genotipos “incluyentes foliares de Na^+ ”, presentar bajo daño por toxicidad de este ion, mecanismo comúnmente denominado tolerancia tisular al Na^+ , aspecto abordado en este trabajo de tesis.**

El crecer o sobrevivir en suelos salinos supone algunos costos: el costo de excluir las sales, la compartimentación intracelular, y la excreción de éstas a través de las glándulas de sales. Este costo, es relativamente pequeño en relación al costo necesitado para sintetizar solutos orgánicos para realizar el ajuste osmótico (Yeo, 1983; Raven, 1985). El número de moles de ATP necesarios para usar un mol de NaCl como un osmótico es de aproximadamente 4 en las células radicales, y de 7 en las foliares, donde el número requerido para sintetizar un compuesto orgánico está en un orden de magnitud mucho mayor (Raven 1985). El requerimiento de ATP para la síntesis o acumulación de solutos en hojas fue ensayado por Raven (1985) con valores de 3,5 para Na^+ , 34 para manitol, 41 para prolina, 50 para glicina betaína y alrededor de 52 para sacarosa (estos valores tienen como supuesto una producción de 0,5 moles de ATP por fotón, y como fuente del N al NO_3^-). **El tema de la generación de solutos orgánicos y la capacidad de realizar ajuste osmóticos se retoma en la sección “Ajuste osmótico ante estrés salino” de esta tesis.**

La expresión génica varía con el tiempo luego de haberse aplicado el “shock” salino. Después de que plantas de arroz fueran expuestas repentinamente a 150 mM de NaCl, los genes expresados en raíces a los 15 minutos fueron diferentes de aquellos expresados 1 semana después (Kawasaki *et al.*, 2001). Parecería que muchos genes que se inducen tempranamente luego de que la sal es aplicada, están relacionados con aquellos de estrés hídrico más que los específicos del estrés salino. En raíces de trigo, un gen expresado en la etapa temprana de respuesta a estrés (6 horas luego de una repentina exposición a 250 mM de NaCl) fue identificado como una proteína-kinasa, y es inducido también por ABA y salinidad (Shen *et al.*, 2001).

Los procesos que adaptan a la planta específicamente al suelo salino involucran la regulación de la absorción y compartimentación de la sal (Rajendran, 2009; Zhu, 2003),

para retrasar lo más posible el tiempo de ocurrencia del “umbral de concentración iónica” a partir del cual los iones alcanzan niveles tóxicos en las hojas que se encuentran activamente fotosintetizando (Munns, 2002). **Los mecanismos de tolerancia a salinidad reportados por Munns (2002) y los estudiados más recientemente por Rajendram *et al.* (2009) fueron seleccionados para determinar los mecanismos de tolerancia a salinidad en genotipos de girasol a corto y largo plazo. Lo anterior, sumado a la verificación de variabilidad intraespecífica (entre genotipos) para acumulación foliar de Na^+ nos permitirán poner a prueba las hipótesis de la existencia de dicha variabilidad genotípica para la acumulación foliar de Na^+ , la determinación de mecanismos de tolerancia a salinidad a corto y largo plazo y su correlación con la acumulación foliar de Na^+ . Este marco conceptual también permitirá verificar la independencia entre acumulación diferencial foliar de Na^+ y respuestas diferenciales tempranas del crecimiento frente al estrés salino.**

PAPEL DE LOS CAMBIOS EN EL BALANCE IÓNICO DURANTE LA ADAPTACIÓN A LA SALINIDAD

El K^+ juega un rol central en la capacidad de las plantas de adaptarse al estrés salino, más que nada por la capacidad de realizar “ajuste osmótico” (AO) sin dañar los tejidos que los circundan, manteniendo la turgencia y el control de la apertura estomática en plantas bajo estrés fisiológico o medioambiental (Maathuis y Amtmann, 1999). Los mecanismos por los cuales el K^+ actúa en el AO y la homeostasis iónica en el citosol, tanto en especies halófitas como glicófitas (como el girasol) no están adecuadamente dilucidados, así como también los procesos involucrados en la interacción del K^+ con el Na^+ , particularmente en relación a la selectividad de las membranas celulares (El-Haddad y O’Leary, 1994). Además, el K^+ es muy importante para el mantenimiento de la homeostasis iónica en el citosol en plantas estresadas por Na^+ (Zhu, 2003).

El estrés salino causa frecuentemente una reducción en el contenido de K^+ en los tejidos vegetales, especialmente en las raíces, a través de mecanismos no completamente entendidos hasta la actualidad (Viégas *et al.*, 2001). La especialización de algunas especies

de *Atriplex* a hábitats salinos podría involucrar habilidades peculiares de acumular iones, tanto de Na^+ como de K^+ (Ramos *et al.*, 2004). El modelo general propuesto para la homeostasis celular osmótica e iónica en las células foliares es presentado a través de un balance de solutos orgánicos e inorgánicos (compartimentizados) en el citosol y en las vacuolas. Los iones (Na^+ , Cl^-) y en menor proporción el K^+ son secuestrados dentro de vacuolas mientras que el K^+ y virtualmente todos los osmosolutos orgánicos son confinados en el citosol (Flowers *et al.*, 1977). **En los capítulos que siguen se estudió la concentración de Na^+ y K^+ en genotipos de girasol, con el objetivo de verificar la existencia de variabilidad para la acumulación foliar de estos cationes bajo condiciones de salinidad.**

EXPANSIÓN FOLIAR EN GIRASOL Y MECANISMOS CELULARES INVOLUCRADOS

Los mecanismos celulares que intervienen en el control de la expansión foliar han sido estudiados intensivamente, y fueron resumidos por Volkenburgh (1999). El crecimiento en expansión depende de: 1) la capacidad de captar agua por parte del tejido (asociada a su capacidad de generar diferencias de potencial hídrico con la fuente de agua, y a permitir el ingreso de la misma), y 2) las propiedades reológicas de sus paredes (Ray, 1987). Las limitantes mecánicas e hidráulicas al crecimiento foliar en salinidad han sido analizadas por Fricke (2002) quien destaca el rol del suministro de solutos a la zona en expansión en cereales para el mantenimiento del crecimiento y sugiere limitaciones por destino, más que por fuente, a la expansión foliar.

La partición de los asimilados se modifica bajo condiciones salinas, y su expresión morfológica es la modificación de las relaciones alométricas en la planta (Porter y Nagel, 2000; Niklas y Enquist, 2002; Agren y Franklin, 2003). La competencia de los órganos destino para la captación de carbono bajo salinidad, afecta la distribución de la materia seca y, consecuentemente, el rendimiento (Munns y Termaat, 1986). En las etapas iniciales de su desarrollo, las láminas foliares también son órganos destino (sumideros de carbohidratos). **Por lo anterior, se hipotetiza que los cambios en acumulación de materia seca y la menor disponibilidad de carbohidratos en genotipos de girasol bajo**

salinidad, afectarán la dinámica de la expansión foliar. Esta dinámica será afectada diferencialmente por la acumulación diferencial de Na⁺ de los diferentes genotipos de girasol estudiados. Además hojas iniciadas antes de la imposición del estrés salino, serán menos afectadas ya que en sus inicios, donde la actividad de división celular es elevada, presentará mejores condiciones de crecimiento que aquella que se hayan iniciado durante y luego de la imposición del estrés, hipotetizando así que las primeras se afectarán más que las últimas.

El tamaño de la hoja queda determinado tempranamente y tanto en girasol (Granier y Tardieu, 1998) como en *Arabidopsis thaliana* (Cookson *et al.*, 2005) el tamaño final fue correlacionado con la máxima tasa de expansión foliar y el número de células. El desarrollo foliar en girasol consiste en dos fases de crecimiento exponencial seguidas de una tercera fase de crecimiento decreciente. Se ha descrito que la tasa y la duración de la primera fase exponencial, dominada por actividades de división celular, es común a todos los fitómeros, condiciones de crecimiento y genotipos, pero que las hojas difieren en la tasa y la duración de la segunda fase exponencial de expansión (Dosio *et al.*, 2003). Las diferencias en área foliar final alcanzada bajo distintas condiciones de crecimiento se asocian a diferentes tasas de expansión durante esta segunda fase de expansión. Sin embargo, también está documentado que el déficit hídrico afecta tanto las actividades de división como de expansión celulares en girasol (Granier y Tardieu, 1999). Coincidentemente, la reducción en el área foliar de mandioca por estrés hídrico fue causada por un retraso en el desarrollo y una reducción en la división celular en las hojas meristemáticas (Alves y Setter, 2004). **No existe información de este tipo para los efectos del estrés salino sobre la dinámica de la expansión foliar en girasol y sobre actividades de división y expansión celulares. El estudio de las tasas de división y expansión celular en diferentes genotipos de girasol permitirá identificar los mecanismos involucrados en las respuestas diferenciales, en cuanto a cambios en la dinámica de la expansión foliar por salinidad. También se pondrá a prueba la hipótesis de que existirá correlación entre cambios diferenciales entre estos mecanismos involucrados y la acumulación diferencial de Na⁺. Por último, los trabajos realizados en esta tesis permitirán conocer si los genotipos más “incluyentes foliares de Na⁺” ven más afectada sus dinámicas de expansión celular o de división**

celular, en comparación con aquellos genotipos excluyentes (en el caso de que existiese acumulación diferencial de Na^+ en los distintos genotipos por efecto de la salinidad).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

- a) Existirá variabilidad para acumulación foliar de Na^+ en genotipos de girasol.

- b) La tolerancia a salinidad en genotipos de girasol incluirá variabilidad para mecanismos que intervienen en las respuestas tempranas y tardías a esta condición.
 - b1. Los efectos tempranos de la salinidad sobre el crecimiento serán independientes de la acumulación foliar de Na^+ .
 - b2. La acumulación foliar de Na^+ influirá en los efectos tardíos de la salinidad sobre el crecimiento.

- c. Los efectos de la salinidad sobre los determinantes del área foliar (división, expansión celular, tasas máximas y duración de la expansión foliar) y los cambios en parámetros estomáticos, estarán influidos diferencialmente por la acumulación foliar de Na^+ .

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar mecanismos de tolerancia a salinidad en genotipos de girasol y correlacionar los cambios en la dinámica de expansión foliar por salinidad, con la inclusión foliar de Na^+ .

Objetivos específicos:

- a) Determinar las concentraciones de Na^+ en 11 líneas y 18 híbridos de girasol y sus cambios por salinidad.

- b) Determinar variabilidad para mecanismos de tolerancia en base a respuestas tempranas y tardías en genotipos de girasol bajo salinidad.
 - b 1) Cuantificar cambios en las tasas relativas de elongación de plantas y en las relaciones hídricas de genotipos de girasol bajo salinidad y correlacionar estos resultados con las concentraciones foliares de Na^+ .

 - b 2) Determinar cambios por salinidad en parámetros vegetativos que determinan la tolerancia al estrés salino a largo plazo y correlacionar la inclusión foliar de Na^+ con los diferentes grados de tolerancia registrados.

- c) Identificar y cuantificar cambios en la dinámica de la expansión foliar por salinidad y los cambios en los determinantes de la misma (tasas de división y expansión celular). Correlacionar estas respuestas con las concentraciones foliares de Na^+ .

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Agren G. I. and Franklin O. 2003. Root: shoot ratios, optimization and nitrogen productivity. *Ann. Bot.* 92: 795-800.
- Alkio M., Schubert A., Diepenvrock W. and Grimm E. 2003. Effect of source–sink ratio on seed set and filling in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Pl. Cell Environ.* 26: 1609-1619.
- Alves A. C. and Setter T. 2004. Response of cassava leaf area expansion to water deficit: Cell proliferation, cell expansion and delayed development. *Ann. Bot.* 94: 605-613.
- Amsler A., Perreta M., Tivano J. C. y Vegetti A. C. 2004. Anatomía caulinar de especies de Oryzeae (Poaceae). *Candollea* 59: 135-156.
- Andrade A., Wolfe D. W. and Fereres E. 1993. Leaf expansion, photosynthesis, and water relations of sunflower plants grown on compacted soil. *Pl. Soil* 149: 175-184.
- Barreda V. D., Palazzesi L., Tellería M.C., Katinas L., Crisci J.V., Bremer K., Passalia M.G., Corsolini R., Rodríguez Brizuela R. and Bechis F. 2010. Eocene Patagonia fossils of the Daisy Famili. *Science* 329: 1621.
- Barreda V.D., Palazzesi L., Katinas L., Crisci J.V., Tellería M.C., Bremer K., Passala M., Bechis F. and Corsolini R. 2012. An extinct Eocene taxón of the daisy familia (Asteraceae): evolutionary, ecological and biogeographical implications. *Ann. Bot.* 109: 127-134.
- Barreto de Moraes Neto L., Socorro de Souza Carneiro M., Feitosa de Lacerda C., Roberto Góes Ferreira Costa M., Melo Fontenele R. and Valmir Feitosa J. 2012. Effect of irrigation water salinity and cutting age on the components of biomass of *Echinochloa pyramidalis*. *R. Bras. Zootec.* 41: 550-556.
- Bethke P.C. and Drew M. C. 1992. Stomatal and nonstomatal components to inhibition of photosynthesis in leaves of *Capsicum annuum* during progressive exposure to NaCl salinity. *Pl. Physiol.* 99: 219-226.
- Bolsa de Cereales de Buenos Aires. Actualidad de la producción del girasol. Publicado en internet, disponible en www.aial.fullblog.com.ar/inta-perspectivas-agricolas-20122013. Activo Abril 2012.
- Céccoli G., Ramos J. C., Ortega L. I., Acosta J. M. and Perreta M. G. 2011. Salinity induced anatomical and morphological changes in *Chloris gayana* Kunth roots. *Biocell* 35: 9-17.
- Chadalavada S.V., Rajendrakumar C.S., Suryanarayana T. and Reddy A. R. 1997. DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process. *FEBS Lett.* 410: 201-205.
- Chazen O., Hartung W. and Neumann P. M. 1995. The different effects of PEG 6000 and NaCl on leaf development are associated with differential inhibition of root water transport. *Pl. Cell Environ.* 18: 727-735.
- Chimenti C. A. and Hall A. J. 1993. Genetic variation and changes with ontogeny of osmotic adjustment in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* 71: 201-210.
- Chimenti C. A. and Hall A. J. 1994. Responses to water stress of apoplastic water fraction and bulk modulus of elasticity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes of contrasting capacity for osmotic adjustment. *Pl. Soil* 166: 101-107.
- Chimenti C. A., Pearson J. and Hall A. J. 2002. Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. *Field Crops Res.* 75: 235–246.

- Cookson S. J., Van Lijsebettens M. and Granier C. 2005. Correlation between leaf growth variables suggest intrinsic and early controls of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Pl. Cell Environ.* 28: 1355-1366.
- Couia H., Chorbal M. H. and Touraine B. 1994. Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and on NO₃-reduction rate within whole plants of salt-sensitive bean and salt-tolerant cotton. *Pl. Physiol.* 105: 1409-1418.
- Cramer G. R. and Läuchli A. 1986. Ion activities in solution in relation to Na⁺-Ca₂⁺ interactions at the plasmalemma. *J. Exp. Bot.* 25: 321-330.
- Cramer G. R., Epstein E. and Läuchli A. 1988. Kinetics of root elongation of maize in response to short-term exposure to NaCl and elevated calcium concentration. *J. Exp. Bot.* 25: 1513-1522.
- Cramer G. R. and Bowman D. C. 1991. Kinetics of maize leaf elongation 1. Increased yield threshold limits short-term, steady-state elongation rates after exposure to salinity. *J. Exp. Bot.* 25: 1417-1426.
- Dale G. and Dieters M. 2007. Economic returns from environmental problems: breeding salt- and drought tolerant eucalypts for salinity abatement and commercial forestry. *Ecol. Eng.* 31: 175-182.
- De La Vega, A. 2007. IV Congreso Argentino de Girasol. Buenos Aires: ASAGIR: Nuestro campo. Primera Edición.
- Dosio G. A. A., Rey H., Lecoer J., Izquierdo N. G., Aguirrezábal L. A. N., Tardieu F. and Turc O. 2003. A whole-plant analysis of the dynamics of expansion of individual leaves of two sunflower hybrids. *J. Exp. Bot.* 54: 2541-2552.
- Downton W. J. S. 1977. Photosynthesis in salt-stressed grapevines. *Austral. J. Pl. Physiol.* 4: 183-192.
- El-Haddad E. S. H. M. and O'Leary J. W. 1994. Effect of salinity and K/Na ratio of irrigation water on growth and solute content of *Atriplex amnicola* and *Sorghum bicolor*. *Irrig. Sci.* 14: 127-133.
- Fernández-García N., Martínez V., Cerdá A. and Carvajal M. 2002. Water and nutrient uptake of grafted tomato plants grown under saline conditions. *J. Pl. Physiol.* 159: 899-905.
- Feikema P. M., Sasse J. M. and Bandara G. D. 2012. Chloride content and biomass partitioning in Eucalyptus hybrids grown on saline sites. *New For.* 43: 89-107.
- Fiesta nacional del girasol. Publicado en internet, disponible en http://www.fiestanacdelgirasol.com.ar/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=38&Itemid=53. Activo Abril 2010.
- Flowers T. J. 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55: 307-319.
- Flowers T. J., Troke P. F. and Yeo A. R. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Pl. Physiol.* 25: 89-121.
- Flowers T. J., Hajibagheri M. A. and Clipson N.J.W. 1986. Halophytes Quarterly. *Revi. Biol.* 61: 313-337.
- Flowers T. J. and Yeo A. R. 1986. Ion relations of plants under drought and salinity. *Austral. J. Pl. Physiol.* 13: 75-91.
- Francois, E. 1996. Salinity effects on four sunflower hybrids. *Agron. J.* 88: 215-219.
- Frensch J. and Hsiao T. C. 1994. Transient responses of cell turgor and growth of maize roots as affected by changes in water potential. *Pl. Physiol.* 104: 247-254.
- Frensch J. and Hsiao T. C. 1995. Rapid response of the yield threshold and turgor regulation during adjustment of root growth to water stress in *Zea mays*. *Pl. Physiol.* 125: 303-312.

- Fricke W. 2002. Biophysical limitation of cell elongation in cereal leaves. *Ann. Bot.* 90: 157-167.
- Gheyi H. R. 2000. Problemas de salinidade na agricultura irrigada. En: *Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido*. Oliveira T.S., Romero R.E., Assis Jr., Silva J.R.C.S (Eds.). Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, DCS-UFC, p 329-346.
- Gil-Mascarell R., López-Coronado J. M., Bellés J. M., Serrano R. and Rodríguez P. L. 1999. The *Arabidopsis* HAL2-like gene family includes a novel sodium-sensitive phosphatase. *Pl. J.* 17: 373-383.
- Gläser H.U., Thomas D., Gaxiola R., Montrichard F., Surdin-Kerjan Y. and Serrano R. 1993. Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a putative phosphatase gene. *EMBO J.* 12: 3105-3110.
- Gorham J., Wyn Jones R. G. and Bristol A. 1990. Partial characterization of the trait for enhanced K^+ - Na^+ discrimination in the D genome of wheat. *Planta* 180: 590-597.
- Gowing D. J. G., Davies W. J. and Jones H. G. 1990. A positive root-sourced signal as an indicator of soil drying in apple, *Malus x domestica* Borkh. *J. Exp. Bot.* 41: 1535-1540.
- Granier C. and Tardieu F. 1998. Spatial and temporal analyses of expansion and cell cycles in sunflower leaves. *Pl. Physiol.* 116: 991-1001.
- Granier C. and Tardieu F. 1999. Water deficit and spatial pattern of leaf development. Variability in responses can be simulated using a simple model of leaf development. *Pl. Physiol.* 119:609-620.
- Greenway H. and Osmond C. B. 1972. Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. *Pl. Physiol.* 49:256-259.
- Greenway H. and Munns R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Annu. Rev. Pl. Physiol.* 31: 149-190.
- Hernández J.A., Olmos E., Corpas F.J., Sevilla F. and del Rio L. A. 1996. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Pl. Sci.* 105: 151-167.
- Historia de los colonos ruso-judíos arribados a la Argentina durante el siglo XIX. Publicado en internet, disponible en <http://www.casares.gov.ar/>. Activo Setiembre 2012.
- Hoagland D. R. and Snyder W. C. 1933. Nutrition of strawberry plants under controlled conditions. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 30: 288-296.
- Horie T., Hauser F. and Schroeder J.I. 2009. HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. *Trends in Plant Science* 14: 660-668.
- Hsiao T. C. and Xu L. K. 2000. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *J. Exp. Bot.* 51: 1595-1616.
- Huang J. and Redman R. E. 1995. Responses of growth, morphology, and anatomy to salinity and calcium supply in cultivated and wild barley. *Can. J. Bot.* 73: 1859-1866.
- Kalaji M. H. and Pietkiewicz S. 1993. Salinity effects on plant growth and other physiological processes. *Acta Physiol. Pl.* 15: 89-124.
- Katsuhara M. and Kawasaki T. 1996. Salt stress induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of barley roots. *Pl. Cell Physiol.* 37: 169-173.
- Kawasaki S., Borchert C., Deyholos M., Wang H., Brazille S., Kawai K., Galbraith D. and Bohnert H. J. 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Pl. Cell* 13: 889-905.

- Larcher W. *Ecofisiología vegetal*. São Carlos: RiMa, 2000. 533p.
- Longstreth D. J. and Nobel P. S. 1979. Salinity effects on leaf anatomy: consequences for photosynthesis 1. *Pl. Physiol.* 63: 700-703.
- Maas E. V., Lesch S. M., Francois L. E. and Grieve C. M. 1994. Tiller development in salt-stressed wheat. *Crop Sci.* 34: 1594-1603.
- Maathuis F. J. M. and Amtmann A. 1999. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Ann. Bot.* 84: 123-133.
- Martinez V. and Läuchli A. 1994. Salt-induced inhibition of phosphate uptake in plants of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *New Phytol.* 126: 609-614.
- Meddings R. L. A., Mc Comb J. A. and Bell D. T. 2001. The salt-waterlogging tolerance of *Eucalyptus camaldulensis* x *E. globulus* hybrids. *Aust. J. Exp. Agric.* 41: 787-792.
- Munns R. 1988. Effect of high external NaCl concentrations on ion transport within the shoot of *Lupinus albus*. I. Ions in xylem sap. *Pl. Cell Environ.* 11: 283-289.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Pl. Cell Environ.* 25: 239-250.
- Munns R. and Passioura J. B. 1984. Effect of prolonged exposure to NaCl on the osmotic pressure of leaf xylem sap from intact, transpiring barley plants. *Austral. J. Pl. Physiol.* 11: 497-507.
- Munns R. and Termaat A. 1986. Whole-plant responses to salinity. *Austral. J. Pl. Physiol.* 13: 143-160.
- Munns R. and Sharp R. E. 1993. Involvement of abscisic acid in controlling plant growth in soils of low water potential. *Austral. J. Pl. Physiol.* 20: 425-437.
- Munns R., Schachtman D. P. and Condon A. G. 1995. The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Austral. J. Pl. Physiol.* 22: 561-569.
- Munns R. and Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Pl. Biol.* 59: 651-681.
- Murguía J. R., Bellés J. M. and Serrano R. 1995. A salt-sensitive 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase involved in sulfate activation. *Science* 267:232-234.
- Murguía J. R., Bellés J. M. and Serrano R. 1996. The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity. *J. Biol. Chem.* 271: 29029-29033.
- Neumann P.M. 1993. Rapid and reversible modifications of extension capacity of cell walls in elongating maize leaf tissues responding to root addition and removal of NaCl. *Pl. Cell Environ.* 16: 1107-1114.
- Niklas K. J. and Enquist B. J. 2002. On the vegetative biomass partitioning of seed, plant leaves, stems and roots. *Ann. Nat.* 159: 482-497.
- Olsson O. 2001. The rise of neolithic agriculture. Working papers in economics. Publicado en internet. Disponible en handels.gu.se. Activo Junio 2012.
- Origen del girasol en argentina. Publicado en internet, disponible en <http://www.asagir.com.ar>. Activo Octubre 2008.
- Passioura J. B. and Munns. R. 2000. Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Austral. J. Pl. Physiol.* 27: 941-948.
- Pereyra-Irujo G. A., Velazquez L., Lechner L. and Aguirrezábal L. A. N. 2008. Genetic variability for leaf growth rate and duration under water deficit in sunflower: analysis of responses at cell, organ, and plant level. *J. Exp. Bot.* 59: 2221-2232.

- Perreta M. G. and Vegetti A.C. 2004. Structure and development of the branching system in *Melica macra* (Poaceae). *Flora* 199: 36-41.
- Perreta M. G. y Vegetti A. C. 2005. Patrones estructurales en las plantas vasculares: una revisión. *Gayana Botánica* 62: 9-19.
- Perreta M. G. and Vegetti A.C. 2006. Structure and development of the branching system in *Melica sarmentosa*. *Feddes Repertorium* 117: 264-271.
- Porter H. and Nagel O. 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Austral. J. Pl. Physiol.* 27: 595-607.
- Potts B. M. and Dungey H. S. 2004. Interspecific hybridization of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists. *New For.* 27: 115–138.
- Prentice, G. 1986. Origins of plant domestication in the Eastern United States: promoting the individual in archaeological theory. *South. Archaeol.* 5: 103-119.
- Rajendran K., Tester M. and Roy S. J. 2009. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Pl. Cell Environ.* 32: 237-249.
- Ramos J. C., Tivano J. C. y Vegetti A. C. 2002. Estudio anatómico de vástagos reproductivos en *Bromas auleticus* Trin. ex Ness (Poaceae). *Gayana Botánica* 59: 51-60.
- Ramos J., Perreta M., Tivano J. C. y Vegetti A. C. 2004. Variaciones anatómicas en la raíz de *Pappophorum philippianum* inducidas por la salinidad. *Phyton (USA)*: 103-109.
- Raven J. A. 1985. Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants: a cost-benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water. *New Phytol.* 101: 25–77.
- Rawson H. M. and Munns R. 1984. Leaf expansion in sunflower as influenced by salinity and short-term changes in carbon fixation. *Pl. Cell Environ.* 7: 207-213.
- Ray P. M. 1987. Principles of plant cell expansion. En: Physiology of cell expansion during plant growth. Cosgrove and D. J. and Kneivel D. P., (eds). American Society of Plant Physiologists, Bethesda, pp 1-27.
- Reinheimer R., Pozner R. and Vegetti A. C. 2005. Inflorescence, spikelet and floral development in *Panicum maximum* and *Urochloa plantaginea* (Poaceae). *Am. J. Bot.* 92: 565-575.
- Rhoades J.P., Kandiah A. and Mashali A.M. 1992. *The use of saline waters for crop production: Irrigation and drainage paper*. FAO. Roma. 133pp.
- Ribichich K. F., López S. E. and Vegetti A. C. 2000. Histopathological spikelet changes produced by *Fusarium graminearum* in susceptible and resistant wheat cultivars. *Pl. Dis.* 84: 794-802.
- Ribichich K. F. y Vegetti A. C. 2001. Fusariosis de la espiga de trigo: evaluación de caracteres exomorfológicos asociados a la resistencia. *Rev. Fac. Agron. La Plata* 104: 121-127.
- Rodríguez H. G., Roberts J. K. M., Jordan W. R. and Drew M.C. 1997. Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Pl. Physiol.* 25: 881-893.
- Saab I. M. and Sharp R. E. 1989. Non-hydraulic signals from maize roots in drying soil: inhibition of leaf elongation but not stomatal conductance. *Planta* 179: 466-474.
- Sanderson M., Stair D. and Hussey M. 1997. Physiological and morphological responses of perennial forages to stress. *Adv. Agron.* 59: 171-224.
- Schachtman D.P. and Schroeder J.I. 1994 Structure and transport mechanism of a high affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* 370, 655–658.

- Shen J.R. and Katoh S. 1991. Inactivation and Calcium-dependent reactivation of Oxygen evolution in photosystem II preparations treated at pH 3.0 or with high concentrations of NaCl. *Pl. Cell Physiol.* 32: 439-446.
- Shen W., Gómez-Cadenas A., Routly E. L., Ho T. H. D., Simmonds J. A. and Gulick P. J. 2001. The salt stress-inducible protein kinase gene, *Esi47*, from the salt-tolerant wheatgrass *Lophopyrum elongatum* is involved in plant hormone signaling. *Pl. Physiol.* 125: 1429-1441.
- Soussi M., Ocaña A. and Lluch C. 1998. Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.* 49: 1329-1337.
- Szabolcs. I. 1992. Salinization of soil and water and its relation to desertification. *UNEP Desert. Control Bull.* 21: 32-37.
- Termaat A. and Munns R. 1986. Use of concentrated macronutrient solutions to separate osmotic from NaCl-specific effects on plant growth. *Austral. J. Pl. Physiol.* 13: 509-522.
- Tribsch A. and Stuessy T. F. 2012. Evolution and phylogeography of arctic and alpine plants in Europe: Introduction. *Taxon* 52: 415-416.
- Vegetti A. C. 1997. Formas de crecimiento en *Bromus catharticus* y *Bromus auleticus*. *Kurtziana* 25: 165-182.
- Vegetti A. C. 2002. Caracterización de los sistemas de ramificación en especies de Oryzeae (Poaceae). *Candollea* 57: 251-260.
- Vegetti A. C. and Pilatti R. A. 1998. Structural pattern of tomato plants grown in greenhouse. *Genet. Resour. Crop Evol.* 45: 87-93.
- Viégas R. A., Silveira J. A. G. Melo A. R. B. Lima Júnior A. R., Queiroz J. E. and Fausto M. J. M. 2001. Effects of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation of young cashew plants. *Rev. Bras. Eng. Agric. Amb.* 5: 216-222.
- Volkenburgh E. V. 1999. Leaf expansion: an integrating plant behaviour. *Pl. Cell Environ.* 2: 1463-1473.
- Wu L. 1981. The potential for evolution of salinity tolerance in *Agrostis stolonifera* L. and *Agrostis tenuis* Sibth. *New Phytol.* 89: 471-486.
- Yeo A. R. 1983. Salinity resistance: Physiologies and prices. *Physiol. Pl.* 58: 214-222.
- Yeo A. R., Lee K. S., Izzard P., Boursier P. J. and Flowers T. J. 1991. Short- and long- term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 42, 881-889.
- Zabala J. M., Taleisnik E., Giavedoni J. A., Pensiero J. F. and Schrauf G. E. 2011. Variability in salt tolerance of native populations of *Elymus scabrifolius* (Döll) J.H. Hunz from Argentina. *Grass forage Sci.* 66:109-122.
- Zhu J. K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Op. Pl. Biol.* 6: 441-445.

VARIABILIDAD EN TOLERANCIA A SALINIDAD EN LÍNEAS ENDOCRIADAS Y GENOTIPOS HÍBRIDOS DE GIRASOL

INTRODUCCIÓN

La salinización de los suelos es una causa importante de restricción en el uso productivo de las tierras (Sanderson *et al.*, 1997) debido a que reduce el crecimiento y la productividad en la mayoría de los cultivos (Flowers, 2004) imponiendo a las plantas limitaciones hídricas y desbalances iónicos (Greenway y Munns, 1980).

De acuerdo al Servicio de Manejo de Nutrición de Plantas, dependiente de la FAO, más del 6 % de la tierra en el mundo está afectada tanto por salinidad como por sodicidad (<http://plantstress.com/Articles/index.asp>). El término “afectado por la salinidad” se refiere al suelo que es salino o sódico, y cubre más de 400 millones de hectáreas, las que representan el 6 % de las tierras antes mencionadas. La mayor parte de la superficie de la tierra no está sometida a condiciones de cultivo, pero una importante proporción de la tierra cultivada está afectada por la salinidad. De los actuales 230 millones de hectáreas irrigadas, 45 millones de ellas están afectadas por la salinidad (19,5 %) y de las otras 1.500 millones cultivadas en seco, 32 millones están afectadas por salinidad en diferentes grados (2,1%) (<http://plantstress.com/Articles/index.asp>).

La morfología y anatomía de las plantas, variable a distintos niveles del vástago (Vegetti, 2002; Perreta y Vegetti, 2006), es modificada dentro de un rango determinado de

plasticidad morfológica por condiciones limitantes del ambiente y por agentes patógenos (Ribichich y Vegetti, 2001; Perreta y Vegetti, 2005). Elevadas concentraciones de sales en el sustrato, especialmente cloruros y sulfatos de sodio, afectan el crecimiento de las plantas modificando sus características morfológicas, anatómicas (Kalaji y Pietkiewicz, 1993; Huang y Redmann, 1995; Ramos *et al.*, 2004; Céccoli *et al.*, 2011) y sus respuestas fisiológicas (Zhu, 2003). La partición de los asimilados se modifica bajo condiciones salinas, y su expresión morfológica es la modificación de las relaciones alométricas en la planta (Porter y Nagel, 2000; Niklas y Enquist, 2002; Agren y Franklin, 2003). La competencia de los órganos destino para la captación de carbono bajo salinidad, afecta la distribución de la materia seca y, consecuentemente, el rendimiento (Munns y Termaat, 1986). A partir de lo anterior, y teniendo en cuenta la acumulación foliar de Na^+ en los diferentes genotipos, en este **capítulo se estudiaron los cambios en la acumulación de materia seca y su partición en estado vegetativo de las plantas por efecto de la salinidad. Con la información obtenida a partir de los parámetros vegetativos se determinó la tolerancia a largo plazo en los distintos genotipos estudiados.** En otras palabras, estos estudios se hicieron con el objetivo de verificar la hipótesis que se planteó en el capítulo I donde se afirmó que la acumulación foliar de Na^+ influirá en los efectos tardíos de la salinidad sobre el crecimiento (hipótesis b2, capítulo I).

Debido a que el girasol ha sido desplazado en los últimos años hacia zonas marginales, incluyendo áreas salinizadas (ej. sudoeste de la provincia de Buenos Aires, cuenca del Salado), existe interés explícito en incrementar su tolerancia a estrés abiótico. Estudios fisiológicos y genéticos han mostrado, por ejemplo, que la capacidad de ajuste osmótico es uno de los caracteres que contribuyen al mantenimiento de su rendimiento bajo estrés hídrico (Chimenti y Hall 1993, 1994, Chimenti *et al.*, 2002); este último es la condición de estrés sobre la que existen más estudios. Por esto **en este capítulo se estudiaron las relaciones hídricas y sus cambios por efecto de la salinidad para poder determinar si los materiales utilizados realizaron algún tipo de ajuste osmótico.**

Según Rajendran *et al.* (2009) existen tres mecanismos de tolerancia a la salinidad en trigo. El primero de ellos involucra la tolerancia al estrés osmótico causado por las sales

(Hu *et al.*, 2007). Debido a que al comienzo de la aplicación del estrés salino, aún las plantas no acumularon sales en sus tejidos, solamente la salinidad impone una reducción en el potencial hídrico del suelo, generando estrés osmótico (Rajendran *et al.*, 2009). Siguiendo este marco de estudio, **en este capítulo se estudiaron las respuestas tempranas de las plantas de girasol a la salinidad, a través de la medición de las tasas relativas de elongación de plantas, tanto de las líneas como de los híbridos de girasol seleccionados.** Más específicamente, se midieron los cambios en estas tasas para poder determinar cómo el estrés osmótico provocado por la sal de NaCl afecta diferencialmente a los materiales vegetales utilizados. Así, las determinaciones de los cambios en las tasas relativas de elongación de plantas debido a la salinidad al comienzo de la imposición del estrés salino, se realizaron con el fin de corroborar la hipótesis de que los efectos tempranos de la salinidad sobre el crecimiento serán independientes de la acumulación foliar de Na⁺. Para tal fin, se correlacionaron los cambios en estas tasas con la acumulación foliar de Na⁺.

Existe un segundo y un tercer mecanismo de tolerancia a salinidad, dentro del marco conceptual de Rajendran *et al.* (2009), que involucran la capacidad de las plantas de reducir el estrés iónico, minimizando la cantidad de Na⁺ que se acumula en las células, particularmente en aquellas que están en las hojas que transpiran. El segundo mecanismo funciona excluyendo el Na⁺ de las hojas (Tester y Davenport, 2003; Moller y Tester, 2007; Munns y Tester, 2008), y el tercer mecanismo funciona compartimentalizando eficientemente el Na⁺ dentro de vacuolas o en células donde el daño es menor que en el citosol (Apse *et al.*, 1999; Qiu *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002, 2003; Sunnarpi *et al.*, 2005; Rus *et al.*, 2006; Davenport *et al.*; 2007). Este marco conceptual se utilizó en este capítulo para medir la concentración de Na⁺ y K⁺ y sus relaciones, realizados en láminas foliares de plantas de girasol, tejidos con fundamental actividad fotosintética. Con la información recabada con estas determinaciones se intentó encontrar la existencia de variabilidad intraespecífica para acumulación foliar de Na⁺; con esto se puso a prueba la primera hipótesis presentada en capítulo I, que afirma que existirá variabilidad para la acumulación foliar de Na⁺ en diferentes genotipos de girasol (hipótesis “a”, capítulo I). También se estudió la tolerancia tisular al Na⁺, evaluando la correlación entre el contenido foliar de

Na^+ y el porcentaje de hojas muertas. De esta forma, se evaluaron los genotipos en cuanto a inclusión/exclusión foliar de Na^+ y además se evaluó la tolerancia tisular al Na^+ como porcentaje de tejido muerto en función de la concentración de Na^+ en el mismo, para el caso de los híbridos, y la relación entre estabilidad de membranas y concentración foliar de Na^+ , para los genotipos híbridos.

Sintéticamente, en este capítulo se pusieron a prueba las siguientes hipótesis:

a) Existirá variabilidad para la acumulación foliar de Na^+ en diferentes genotipos de girasol.

b) La tolerancia a la salinidad en diferentes genotipos de girasol incluirá variabilidad para mecanismos que intervienen en las respuestas tempranas y tardías en salinidad;

b1) los efectos tempranos de la salinidad sobre el crecimiento serán independientes de la acumulación foliar de Na^+ ;

b2) la acumulación foliar de Na^+ , entonces, sólo influirá sobre los mecanismos de tolerancia a salinidad a largo plazo (tardíos).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos se describen como se menciona a continuación:

1. Enumeración de los experimentos realizados (Tabla 2.1)
2. Materiales vegetales utilizados para cada experimento y condiciones de cultivos.
3. Condiciones de cultivo en los diferentes experimentos.
4. Variables de respuesta medidas, calculadas y estimadas.

1. Experimentos

Los experimentos se realizaron tanto en invernadero (I) como en cámaras de crecimiento (CC). Los lugares donde se realizaron los experimentos fueron en la Cátedra de Morfología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias localizada en la ciudad de Esperanza (Provincia de Santa Fe), donde se utilizaron cámaras de crecimiento; en el Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP, INTA Córdoba), donde se utilizaron invernaderos y en la Unidad Integrada Balcarce, dependiente del INTA y de la Universidad Nacional de Mar del Plata (Balcarce Provincia de Buenos Aires), donde también se utilizaron invernaderos. En la Tabla 2.1 se detallan los experimentos realizados, los materiales genéticos utilizados en cada uno de ellos y las condiciones de cultivo (I o CC). Previo a la realización de los experimentos que se exponen en la Tabla 2.1., se realizó un pre-ensayo para ajustar las técnicas de mediciones. Los resultados de este pre-ensayo pueden verse en el Anexo (Figuras A.1-A.9). Además, en el experimento realizado en Balcarce (experimento “c”, Tabla 2.1), se utilizaron las líneas para realizar mediciones de la dinámica de la expansión foliar tanto en salinidad como en déficit hídrico. Para más detalles sobre los resultados en déficit hídrico, en el Anexo se encuentran las figuras correspondientes (Anexo, Figuras A.21-A.41).

Tabla 2.1. Localización de los experimentos realizados para el logro de esta tesis, materiales vegetales (híbridos o líneas) utilizados en cada experimento y condiciones de crecimiento empleadas en cada uno de ellos (I: invernadero; CC: cámara de crecimiento; Cb: Córdoba; E: Esperanza; B: Balcarce). Las letras a-f indican los distintos experimentos realizados.

Variables respuesta		Experimentos					
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)
		11 líneas (I, Cb)	4 líneas (CC, E)	5 líneas (I, B)	18 híbridos (CC, E)	2 líneas (CC, E)	4 híbridos (CC, E)
Crecimiento	Altura de plantas	X		X			X
	Relaciones alométricas- Área foliar específica		X				
	Filocrono	X	X	X			
	Área foliar final real por hoja y total por planta	X	X				X
	Número de hojas		X				X
	Materia seca y su partición		X				X
	Porcentaje de hoja muerta	X	X				
Determinación de tolerancia a la salinidad	Estimación de tolerancia al componente osmótico de la salinidad	X					X
	Tolerancia tisular al Na ⁺ .		X				
	Ranking de tolerancia a la salinidad		X				X

Tabla 2.1. Localización de los experimentos realizados para el logro de esta tesis, materiales vegetales (híbridos o líneas) utilizados en cada experimento y condiciones de crecimiento empleadas en cada uno de ellos (I: invernadero; CC: cámara de crecimiento; Cb: Córdoba; E: Esperanza; B: Balcarce). Las letras a-f indican los distintos experimentos realizados. MDA: Malondialdeído. CRA: Contenido Relativo de Agua. PO: potencial osmótico. (Continuación).

Variables respuesta		Experimentos					
		(a) 11 líneas (I, Cb)	(b) 4 líneas (CC, E)	(c) 5 líneas (I, B)	(d) 18 híbrid. (I, B)	(e) 2 líneas (CC, E)	(f) 4 híbrid. (CC, E)
Determinac. de iones	Concentración tisular de Na ⁺ .	X	X		X		
	Concentración tisular de K ⁺ .	X	X		X		
Determinac. de daño fisiológico por Na ⁺ tisular	Contenido de clorofila		X				
	Contenido de MDA		X				
	Daño de membranas		X		X		
Relaciones hídricas	CRA		X				X
	Potencial hídrico		X				
	PO						X
	Ajuste osmótico						X
Dinámica del crecimiento foliar	Detallado en el capítulo III (Tabla 3.1)	X	X	X		X	X

2. Material Vegetal

Las líneas endocriadas utilizadas en este trabajo de tesis fueron provistas gentilmente por el Dr. Luis A.N. Aguirrezábal de la Estación Experimental del INTA (Unidad Integrada Balcarce, UIB, Balcarce). Las mismas pertenecen a la empresa Advanta Semillas S.A. Éstas líneas ya fueron previamente caracterizadas por sus respuestas en expansión foliar bajo estrés hídrico (Pereyra Irujo *et al.*, 2008). Los genotipos híbridos utilizados fueron lo que se cultivan ampliamente en la zona centro norte de la provincia de Santa Fe y son pertenecientes a las siguientes empresas: De la empresa Pioneer: 65A40, 64A89; de la empresa Dekalb: DK3810, DK3820, DK3940, DK4045, DK4065, DK4200; de la Asociación de Cooperativas Argentinas (ACA): ACA885; de Helianthus S.R.L: Helio250; de Dow AgroSciences: NTO 2.0; de Argenetics: 50A0; de Sursem: SMR769, SMR779CL, SMR882, NEON, CIRO y TRITÓN MAX. En la Tabla 2.2. se enumeran los genotipos utilizados en cada experimento.

Tabla 2.2. Genotipos utilizados en los distintos experimentos en cámara de crecimiento y en invernadero. Los asteriscos indican las líneas ya caracterizadas por su respuesta en expansión foliar bajo estrés hídrico. I: invernadero; CC: cámara de crecimiento Cb: Córdoba; B: Balcarce; E: Esperanza. Detalles de experimentos a-f, ver tabla 2.1.

COND DE CULTIVO	I	I	CC	CC	CC	CC
LUGAR	Cb	E	B	E	E	E
Materiales	exp. a	exp. b	exp. c	exp. d	exp. e	exp. f
HA124*	X					
HA370*	X					
HA64*	X	X	X			
HA821*	X					
HA89*	X		X			
HAR1*	X	X			X	
HAR2*	X	X	X		X	
HAR3*	X		X			
HAR4*	X					
HAR5*	X	X				
ND 761*	X		X			
ACA 885				X		X
65A40				X		
64A89				X		
DK3810				X		
DK3820				X		
DK3940				X		
DK4045				X		
DK4065				X		
DK4200				X		
Helio250				X		
50A0				X		
SMR769				X		X
SMR779CL				X		X
SMR882				X		
NEON				X		
CIRO				X		
TRITÓN MAX				X		X
NTO 2.0				X		

Las líneas ya caracterizadas por su respuesta a estrés hídrico se encuentran marcada con un asterisco en el cuadro anterior. Los genotipos híbridos se utilizaron en los experimentos 5 y 7 y fueron conducidos en condiciones controladas de crecimiento en cámaras de tipo “walk in” de la Facultad de Ciencias Agrarias (Esperanza, Santa Fe).

Las líneas endocriadas utilizadas como “contrastantes en inclusión foliar de Na⁺” para luego determinar mecanismos de tolerancia a salinidad y para posteriores experimentos, cuyos resultados se muestran en el capítulo III, se esquematizan en la Tabla 2.3. Mientras que los genotipos híbridos contrastantes en inclusión foliar de Na⁺ y contrastantes en daño de membrana, estudiados luego para determinar sus mecanismos de tolerancia a la salinidad, se esquematizan en la Tabla 2.4.

Tabla 2.3. Líneas contrastantes en inclusión foliar de Na⁺ utilizadas para realizar posteriores estudios que se detallan más adelante.

Absorción de Na ⁺	Excluyente	HAR2	HAR5
	Incluyente	HA64	HAR1

Tabla 2.4. Genotipos híbridos utilizados en el experimento f contrastantes en inclusión foliar de Na⁺ y contrastantes a su vez, dentro de cada grupo, en el nivel de daño de membranas.

		Nivel de daño en membrana	
Absorción de Na ⁺		Bajo	Alto
	Excluyente	SMR 779CL	ACA885
	Incluyente	TRITÓN MAX	SMR769

3. Condiciones de cultivos en los distintos experimentos

El experimento “a”, se desarrolló dos veces y se realizó en invernadero, al igual que el experimento “c” realizado en Balcarce (Tabla 2.1). Por el contrario el resto de los experimentos se desarrollaron en cámara de crecimiento. En los experimentos de Córdoba y Balcarce las temperaturas promedio durante el día fueron de $25,5 \pm 1$ °C y de $19 \pm 1,1$ °C durante la noche. La radiación promedio fue de $14,52 \pm 0,44$ mol.m⁻².d⁻¹. Para los experimentos en cámara de crecimiento, las variables ambientales estuvieron controladas y monitoreadas con sensores de temperatura, radiación y humedad. La temperatura se ajustó a valores de 28 °C/ 18°C (día/noche), programándose un fotoperíodo de 16 horas (valor normal para latitudes de 32° Sur como lo son la ciudad de Santa Fe y Córdoba). Se utilizaron lámparas de vapor de Sodio de alta presión, las cuales aportaron una radiación de $15,47 \pm 0,55$ mol.m⁻².d⁻¹ en todos los casos.

Las semillas fueron lavadas, previo a la colocación para la germinación, durante 20 minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 30 % para evitar infecciones por hongos y bacterias al momento de la germinación (Schroeder Murphy *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2009). Luego se hicieron 3 lavados con agua destilada durante 5 minutos y posteriormente se las colocó en cajas de Petri con papel humedecido y se las mantuvo a 28 °C en la oscuridad en una estufa de germinación. Las semillas germinadas fueron sembradas en macetas de entre 3 y 5 litros para los experimentos en invernadero y de 7 litros para los experimentos en cámara de crecimiento. Como sustrato se utilizó una mezcla de arena y perlita en una proporción 3:1 (volumen: volumen). Se midió el volumen de agua que retenían estas macetas para determinar el volumen de agua de riego. Las macetas se regaron con solución Hoagland al ½ luego de dos días de aclimatación (Hoagland y Arnon, 1950).

La salinización comenzó cuando las plántulas presentaron el primer par de hojas en plena expansión (alrededor de 1 cm de longitud). Este estado fenológico coincidió con, aproximadamente, 150-200 °Cd (cantidad de calor que acumula una planta durante una determinada cantidad de tiempo) desde la emergencia de las plántulas (el momento en el cual las hojas alcanzaban este estado fenológico era distinto según cada planta, pero fue uniforme

considerando todos los genotipos en su conjunto). La salinización fue gradual, colocándose 35 mM el primer día, 75 mM el segundo y el tercero y finalmente 130 mM el cuarto día. La salinización gradual se hizo para evitar un shock hipo-osmótico impuesto por el bajo valor de potencial hídrico que posee el agua en solución con NaCl. En algunos experimentos la salinización gradual fue de 5 días y no de cuatro, colocándose 35 mM el primero y el segundo día, 75 mM el tercero y el cuarto y 130 mM el quinto día.

Se utilizó como agente salinizador el NaCl ya que sus componentes (sodio y cloro) son los iones principales responsables del efecto negativo de la salinidad en el crecimiento de las plantas y su rendimiento (Munns y Tester, 2008). Además, en los suelos salinos, pese a la existencia de otras sales con otros aniones y cationes, como sulfatos, nitratos, y cationes como Mg y amonio, el cloruro de sodio es la sal más común de observar en los suelos y bajos salinos.

Para mantener la solución dentro de las macetas en 130 mM y evitar su concentración, los riegos fueron diarios y se dejó percolar en cada uno de ellos solución para hacer pequeños lavados diarios. Además, se controló que la conductividad eléctrica de la solución percolante fuera similar a la del agua de riego (13 dS/m que es el equivalente a 130 mM de NaCl). Para cumplir con este objetivo se realizaron 3 lavados extras semanales donde se aplicaba 1,5 veces el volumen de las macetas para realizar un lavado total.

En el primer experimento (donde se probaron las once líneas), se utilizó un tratamiento con 75 mM de NaCl. Este tratamiento no evidenció diferencias en las respuestas entre las líneas. A partir de esto, el resto de los experimentos incluyeron solamente los tratamientos controles y con 130 mM de NaCl.

Es de destacar que una concentración de la solución de riego de 130 mM de NaCl equivale a un potencial osmótico de -0,65 MPa, potencial hídrico utilizado por el grupo de Balcarce para imponer el estrés hídrico sobre las mismas líneas que se estudiaron en nuestros experimentos (Pereyra-Irujo *et al.*, 2008).

La temperatura del aire y la radiación fotosintéticamente activa (RFA) se midió cada hora (en los experimentos de Córdoba y Balcarce) y cada 15 minutos (en Esperanza) con un datalogger (Cavadevices SATM).

El tiempo termal (desde la emergencia de las plántulas) se midió en grados día ($^{\circ}\text{Cd}$) y fue calculado integrando las sumas térmicas diarias. Estas últimas se calculan sustrayendo a la temperatura media diaria, el valor de la temperatura base para el cultivo de girasol, cuyo valor es de $4,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Granier y Tardieu, 1998). Cabe aclarar que la temperatura base de un cultivo es aquella por debajo del cual no hay ni crecimiento, ni desarrollo alguno. Además, a mayores temperaturas se acelera el crecimiento y el desarrollo, de aquí la necesidad de utilizar para la ontogenia del cultivo el tiempo medido en $^{\circ}\text{Cd}$ y no en días (Granier y Tardieu, 1998).

4. Parámetros y variables medidas, calculadas y/o estimadas

En los siete experimentos desarrollados durante el período de tesis se midieron las siguientes variables y/o parámetros.

Crecimiento

Altura de plantas y cálculo de tasas de elongación relativa de plantas: Las alturas de las plantas se midieron día por medio en el caso del estudio de las once líneas (experimento “a”) y todos los días en el caso de los 4 híbridos (experimento “f”). Las alturas se tomaron con una regla y para cada línea o híbrido, las alturas de cada tratamiento fue comparada en cada día de muestreo (Student’s t-test).

Para calcular las tasas relativas de elongación de plantas (TREPs), se graficó el logaritmo natural de sucesivos datos de altura para cada planta en función de los $^{\circ}\text{Cd}$ y se ajustó una función lineal en el intervalo comprendido por el tiempo que demoró la salinización gradual hasta alcanzar una concentración final de 130 mM . La comparación de las pendientes iniciales de estas funciones lineales entre plantas testigos y tratadas sirvieron para estimar la respuesta de las líneas y los híbridos al componente osmótico de la salinidad

(Rajendran *et al.*, 2009). Una medición adicional de la sensibilidad al tratamiento fue realizada para la determinación del momento (en °Cd) en el que las funciones lineales entre tratamientos y genotipos comenzaron a separarse en forma detectable.

Relaciones alométricas-Área foliar específica: En el experimento “b”, se midió la materia seca foliar de las hojas 1 a 20 y el área foliar utilizando un areafoliómetro portátil de la marca Li-Cor, modelo LI-3000®. El área foliar específica se determinó según lo recomendado por Garnier *et al.* (2001) realizando el cociente entre el área foliar y la materia seca foliar.

Determinación del filocrono: Para la determinación del filocrono se registró cada 2 o 3 días el número de hojas totales emergidas (visibles). Luego las tasas de aparición de hojas (filocrono o °Cd que se requieren para la aparición de dos hojas sucesivas) fueron calculadas mediante la pendiente del número de hojas en función del tiempo termal para cada planta, siguiendo la metodología propuesta por Slafer y Rawson (1997) para trigo sometido a diferentes regímenes térmicos y diferentes fotoperíodos.

Área foliar final real por hoja y total por planta: El área foliar final real para los genotipos HAR5, HAR2, HAR1 y HA64 se midió utilizando un areafoliómetro portátil de la marca Li-Cor, modelo LI-3000®. Dicha medición se realizó en el total de las hojas al finalizar el experimento. El experimento con estas cuatro líneas finalizó a los 918 °Cd desde la emergencia de las plántulas.

Número de hojas por planta: El número de hojas por planta fue cuantificado en el experimento “b” realizado en cámara de crecimiento y para los genotipos HAR5, HAR2, HAR1 y HA64.

Materia seca y su partición: En el experimento “b”, llevado a cabo con los genotipos HAR5, HAR2, HAR1 y HA64 y en el experimento “f” (donde se utilizaron SMR779CL, ACA885, TRITÓN MAX y SMR769), se cuantificaron los pesos frescos y pesos secos al momento de

finalizar los experimentos. En el experimento “b”, la cosecha se hizo a antesis y en el experimento “f”, al finalizar la expansión de la hoja 8, coincidente con el estado fenológico de pre-antesis. Igualmente, la cosecha en ambos casos se realizó en estadio vegetativo previo a que las plantas florecieran completamente. Se midió la materia seca total y su partición en los distintos órganos, es decir: materia seca radical (MSR), materia seca aérea (MSA), materia seca de hojas secas (HM), materia seca de hojas verdes (MSHV) y materia seca de capítulos (en el caso que los hubiera/hubiese).

Porcentaje de hoja muerta: En el experimento “b”, se determinó el porcentaje de hoja muerta que había sobre el total de materia seca de hojas (HM/MSH) para los genotipos HAR5, HAR2, HAR1 y HA64. A partir de esta variable (porcentaje de hoja seca sobre el total de hojas) se pudo graficar la tolerancia tisular al Na⁺ (Figura 2.4.).

Determinación de tolerancia a la salinidad

Ranking general de tolerancia a la salinidad: Para los genotipos HAR5, HAR2, HAR1 y HA64 y para los híbridos ACA 885, SMR769, SMR 779 CL y TRITÓN MAX, se determinó la tolerancia relativa a la salinidad.

Para la determinación del ranking se utilizó el siguiente procedimiento propuesto por la Dra. Taleisnik: Primeramente se realizó un análisis de componentes principales para determinar las variables que mayor aporte tenían para discriminar y diferenciar los genotipos. Esas variables fueron: área foliar total (AF) para las líneas; Materia seca total (MST) para líneas e híbridos; porcentaje de hoja muerta (HM/MSH) para las líneas; área foliar total por planta (AF) para las líneas; daño de membranas para los híbridos; materia seca radical (MSR) para líneas e híbridos y tasas relativas de elongación de plantas (TREP) para las líneas e híbridos. Luego de determinadas las variables a utilizar, se dividió el valor promedio de una variable determinada obtenidos de las plantas salinizadas por el valor promedio para dicha variable de las plantas testigos. Así se obtuvieron, para cada genotipo, valores proporcionales respecto al tratamiento control (proporciones respecto al control por genotipo y variable).

Luego, para cada variable, se promediaron las proporciones respecto al control de todos los genotipos y se obtuvo una proporción promedio por variable. Las proporciones obtenidas por variable y genotipo fueron divididas por la proporción para cada variable obtenida del total de los genotipos, determinando así, si ese genotipo fue afectado para una variable dada por encima o por debajo de la media de esa variable del total de los genotipos. Sumando los valores de AF, MSR, MST y restando HM/MSH en las líneas, se obtuvo un ranking para tolerancia a largo plazo. Si a ese valor se le suma la proporción obtenida para la variable TREPs, se obtiene así el valor de tolerancia para corto y largo plazo. En el caso de los híbridos se utilizaron, como ya se mencionó, las variables MSR, MST, daño de membranas (en vez de HM/MSH) y TREPs.

Análisis de Componentes principales: El análisis de componentes principales se realizó en el experimento “b” y “f” teniendo en cuenta todas las variables cuantificadas en esos experimentos y además con los cuatro genotipos/líneas estudiadas (HAR5, HAR2, HAR1 y HA64, entre las líneas y ACA885, TRITÓN MAX, SMR 769 y SMR 779 CL, entre los híbridos) con el fin de discriminar las variables más importantes y así elegir estas para realizar el ranking de tolerancia a salinidad en los híbridos y en las líneas. Así, se realizó un biplot con las componentes principales 1 y 2, se graficó el árbol de recorrido mínimo para obtener una síntesis de los efectos de la salinidad sobre las variables y los genotipos como un todo. El análisis de componentes principales reduce el espacio multivariado (materia seca radical, materia seca de hojas, materia seca de tallo mas peciolo, numero de hojas, etc.) a sólo dos variables nuevas (CP1 y CP2) permitiendo, a través de estas dos nuevas variables, discriminar las variables originales que más influyeron y que más peso tienen al momento de separar y agrupar entre los genotipos estudiados. El árbol de recorrido mínimo fue graficado en el biplot para mostrar lo adecuado o no de la reducción de dimensión. Las líneas que unen las unidades experimentales más cercanas sin que se crucen unas a otras en el biplot, indican una buena reducción de la dimensión, consecuentemente una buena explicación de la realidad multivariada. El coeficiente de correlación cofenético también indica la calidad de la reducción del espacio multivariado a este nuevo espacio bivariado. Un coeficiente cercano a 1 como el que se obtuvo en nuestro análisis indica una buena reducción del espacio multivariado.

Tolerancia tisular al Na⁺: Esta variable o índice se calculo relacionando el porcentaje de hoja seca del total de hojas sobre el contenido foliar de Na⁺. De estos datos se detallará más adelante que el genotipo HAR1 presentó la mayor tolerancia tisular al Na⁺. Esta tolerancia se determinó para HAR5, HAR2, HAR1 y HA64 (Figura 2.4.).

Concentración de Na⁺ y K⁺

Para determinar la concentración de Na⁺ y K⁺, se tomaron muestras en hipocótilos, entrenudo 1, pecíolo de la hoja 7 y lámina de la hoja 7. Esto se realizó en el experimento “a” (CIAP, Córdoba). Para el experimento “d” se tomaron discos de lámina de hoja 8 (en los 18 híbridos) y las muestras, previamente pesadas, fueron congeladas para su posterior procesamiento. Algunas determinaciones se realizaron en hoja 7 ya que la hoja 8 fue utilizada para realizar otras investigaciones. Además, en experimentos previos se encontró que la hoja 7 acumulaba la misma cantidad de Na⁺ que la hoja 8.

Para el primer experimento, la determinación del contenido de Na⁺ y K⁺ se realizó de la siguiente manera: las muestras se pesaron y se colocaron en agua destilada, luego se congelaron, y posteriormente se hirvieron por 30 minutos. La concentración de iones se determinó en el medio de suspensión utilizando un fotómetro de llamas marca Jenway PFP7 Flame Photometer™. Las muestras luego fueron secadas y pesadas. Para el caso de la concentración de iones en el experimento de los 18 híbridos (experimento “d”), tres discos de hoja 8 por planta fueron colocados en tubos Eppendorf® conteniendo 1 ml de ácido nítrico 0,1 N. Las mismas fueron dejadas unas semanas y posteriormente se llevaron a Córdoba para la medición de la concentración de iones utilizando cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés). Las concentraciones se expresaron en función del peso seco de las muestras.

Determinaciones de daño fisiológico: Concentración de clorofila, malondialdeído (MDA) y daño de membranas

Determinación del contenido de clorofila: La determinación de clorofila se realizó en discos de láminas de hoja 12 totalmente expandidas. Se tomaron discos de láminas foliares de aproximadamente 100 mg, se pesaron y se colocaron en 10 ml de etanol al 80%. Se mantuvieron las muestras en tubos Falcon tapados durante 40 minutos en baño maría a 80°C. El extracto fue medido a 654 nm utilizando un espectrofotómetro. El contenido de clorofila se determinó utilizando la siguiente fórmula (Ec. 2.1.):

$$\text{Clorofila } (\mu\text{g clorofila/ gPF}) = (\text{DO654} * 100 * \text{vol.tubo}) / (39,8 * \text{PF}) \quad (\text{Ec. 2.1.})$$

Determinación del contenido de MDA: Este protocolo se realizó según lo indicado por Draper y Hadley (1990). Al igual que la determinación de clorofila, la determinación de MDA se realizó en discos de láminas de hoja 12 totalmente expandidas. Se tomó una alícuota de 1ml del extracto de la muestra realizada para obtener clorofila y se agregó 1 ml de una solución TBA 0,5 % + TCA 20% (ácido tiobarbitúrico y ácido tricloroacético), es decir, se tomaron volúmenes iguales del extracto y reactivo TBA+TCA. Se llevó a baño maría durante 20 minutos a una temperatura de 90 °C y se determinó absorbancia con espectrofotómetro en dos longitudes de onda (532 y 600 nm). El contenido de MDA se determinó de la siguiente manera (Ec. 2.2.):

$$\text{MDA (mM MDA/gPF)} = [20 * (\text{DO532} - \text{DO600})] / (155 * \text{PF}) \quad (\text{Ec. 2.2.})$$

Tanto las determinaciones de clorofila como de MDA se llevaron a cabo en el CIAP (Centro de Investigaciones Agropecuarias, INTA Córdoba).

Determinación de daño de membranas: Se utilizó el método modificado de Hancock (1972) para la medición del daño de membranas. Se tomó agua miliQ (para una mayor precisión en la realización de la técnica se tuvo igualmente en cuenta la conductividad del agua para hacer realizar un control). Se colocaron 45ml en tubos Falcon de 50ml, se agregó 1 g de discos de hoja 7 y se dejó incubar 2 horas a 25 °C. Pasado ese tiempo se midió la conductividad inicial (CI) con un conductímetro marca HANNA Instruments (modelo Dist 4). Las muestras fueron congeladas en freezer a -80 °C para producir la destrucción total de las membranas. Las muestras luego fueron dejadas para su descongelación y una vez alcanzada una temperatura de 25 °C se volvió a realizar la medición final de conductividad eléctrica (CF). Finalmente, el daño de membrana se cuantificó mediante la siguiente ecuación (Ec. 2.3.):

$$\text{Daño membrana (\% respecto a daño total)} = [(CF - CI) / (CF)] * 100 \quad (\text{Ec. 2.3.})$$

Para comprobar si el congelamiento produjo el daño total de las membranas, se tomó una alícuota de muestras de las que previamente se había medido su CF y se autoclavaron durante 15 minutos a 121°C a una presión de 0,103 MPa (Cottee *et al.*, 2007), posteriormente se volvió a medir la conductividad eléctrica. No hubo diferencias en los valores de conductividad eléctrica entre las muestras descongeladas y las que fueron autoclavadas.

Adicionalmente, se utilizó el método de Flint (1967) para poder diferenciar mejor los genotipos híbridos analizados. Para el cálculo de este índice, se utilizaron las mediciones obtenidas como se describió para el método de Hancock (1972), utilizándose una metodología de cálculo diferente. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 2.8 y solo se determinó el índice para plantas tratadas (ya que en la ecuación se incluyen los valores de las plantas controles). La ecuación utilizada es la siguiente (Ec. 2.4.):

$$It = 100 * (L_{2s}/L_{24s} - L_{2cm}/L_{24cm}) / (L_{24cm} - L_{2cm}) / L_{24c} \quad (\text{Ec. 2.4.})$$

Donde:

I_t : índice de daño de membranas según Flint

L_{2s} : es el valor de conductividad eléctrica (C.E.) de los discos de hoja de plantas salinizadas a las 2 horas de haber sumergido el tejido foliar en el agua.

L_{24s} : C.E. de los discos de hojas de plantas salinizadas luego de congelarlas durante 24 horas.

L_{2cm} : C.E. media de los discos del tratamiento control a las 2 horas de la preparación de la muestra

L_{24cm} : C.E. media del tratamiento control luego de congelarlas durante 24 horas.

Para la determinación del ranking de tolerancia a la salinidad a corto y largo plazo para los híbridos comerciales (Tabla 2.10.) se utilizó el Índice de daño de membranas calculado según la metodología recomendada por Blum y Ebercom (1981), ya que al utilizar los índices según la metodología de Flint *et al.* (1967), esta variable poseía mucho peso y no daba un índice de tolerancia real, subestimando el peso de las otras variables utilizadas para la determinación del ranking de tolerancia a salinidad. Se utilizó la siguiente ecuación para la determinación del daño de membranas según Blum y Ebercom (1981) (Ec. 2.5.):

$$I_b = \{1 - [(1 - T_2/T_{24}) / (1 - C_2/C_{24})]\} * 100 \quad (\text{Ec. 2.5.})$$

Donde:

I_b : Índice de daño de membranas según Blum y Ebercom (1981).

T_2 : C.E. media de los discos del tratamiento control a las 2 horas de la preparación de la muestra.

T_{24} : C.E. de los discos de hojas de plantas salinizadas luego de congelarlas durante 24 horas.

C₂: C.E. media de los discos del tratamiento control a las 2 horas de la preparación de la muestra.

C₂₄: C.E. media del tratamiento control luego de congelarlas durante 24 horas.

Relaciones hídricas

Contenido Relativo de Agua (CRA): El contenido relativo de agua es un indicador del estado hídrico de una hoja. Al finalizar la expansión de la hoja 8 (que es la primera hoja que aparece al momento de salinizar), se realizó un muestreo de discos para determinar contenido relativo de agua (CRA) mediante la siguiente fórmula (Ghoulam *et al.*, 2002) (Ec. 2.6.):

$$\text{CRA} = [(\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) / (\text{Peso a saturación} - \text{Peso Seco})] * 100. \quad (\text{Ec. 2.6.})$$

El peso saturado se calculó colocando tres discos de hoja 8 por planta y colocados en cámara húmeda durante 24 horas. Para determinar peso seco se colocaron los discos en estufa con aire forzado durante 72 horas a 75 °C. El CRA se determinó en el experimento sobre las líneas HAR5, HAR2, HAR1 y HA64 y sobre los cuatro híbridos (ACA 885, TRITÓN MAX, SMR 769 Y SMR 779 CL). En el caso de los híbridos, el cálculo del CRA se realizó para compararlos con los cambios en el Potencial Osmóticos (P.O.) y determinar si alguno de estos híbridos realizó ajuste osmótico. Para lo mismo se siguió, de igual manera, la metodología empleada por Ghoulam *et al.*(2002).

Potencial hídrico: Se determinó el potencial hídrico de la hoja 9 (ya que la hoja 8 fue utilizada para otras determinaciones) mediante el uso de cámara de Scholander sobre los genotipos HAR5, HAR2, HAR1 y HA64 en el experimento “b”. La medición del potencial hídrico se realizó según la metodología propuesta por Boyer (1967). La cámara de Scholander consiste en un recinto donde se coloca la lámina de la hoja y un orificio por donde se deja salir el pecíolo de la misma. Se cierra la cámara herméticamente para evitar la pérdida de aire

y, consecuentemente, de presión. Mediante la adición de presión a esta cámara y su lectura con un manómetro, se le impone a la hoja presión hasta que se observen unas gotitas en la incisión del peciolo. Una vez realizada dicha observación, se toma la lectura del manómetro considerando que esa presión positiva que da la lectura del manómetro es equivalente al potencial hídrico negativo que posee la hoja (Boyer, 1967).

Potencial osmótico: Para la medición de potencial osmótico se prosiguió con la metodología recomendada por Babu *et al.* (1999). Brevemente, la técnica consiste en tomar discos de hojas, llevarlos a cámara húmeda por un tiempo determinado y luego congelar las muestras para destruir las membranas celulares. A continuación se realiza la lectura con un psicrómetro, teniendo en cuenta que se debe dejar cada muestra en la cámara del psicrómetro durante unos minutos para poder equilibrar las condiciones dentro de la cámara y la muestra (Brown y Oosterhuis, 1992). En nuestro caso, la medición de potencial osmótico se realizó utilizando discos de lámina de hoja 8. Se cuantificaron los pesos frescos de tres discos, pesados individualmente y luego fueron llevados a cámara húmeda por al menos dos horas para lograr su saturación y luego las muestras fueron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para romper las membranas celulares. Para medir potencial osmótico se utilizó un psicrómetro, de la Firma Decagon Devices Inc[®], modelo WP4-T.

Caracterización de los genotipos híbridos por su ajuste osmótico (CRA vs P.O.): Para caracterizar si hubo ajuste osmótico se relacionó, con los cuatro híbridos contrastantes en “inclusión foliar de Na^{+} ” y en daño de membranas (Tabla 2.4), el valor obtenido para cada planta del Contenido relativo de agua (CRA) (eje y, Figura 2.8) con el potencial osmótico (PO) obtenido para cada una de ellas (eje x, Figura 2.8). Luego se compararon las observaciones de los puntos coordinados graficados entre las plantas control y salinizadas para cada genotipo, determinando si hubo un mantenimiento del CRA con descensos del PO en las plantas salinizadas respecto de las plantas controles. De esta forma, aquellos genotipos cuyas plantas salinizadas mantuvieran el CRA elevado, disminuyendo el PO osmótico, estarían realizando ajuste osmótico.

Análisis estadístico

Programa estadístico utilizado: Todos los datos fueron estadísticamente analizados utilizando el programa InfoStat (2009).

Test estadísticos: Se realizaron las ANAVAS correspondientes y se utilizó el test de diferencias mínimas significativas entre medias por genotipo y tratamiento (DMS, diferencias mínimas significativas) según como fue descrito por Sokal y Rohlf (1971). Se utilizó un nivel de significancia del 5 % y del 1% donde correspondiese. Se verificaron las hipótesis del análisis de la varianza donde los errores debieron presentar una distribución normal. Esto se hizo a través del test de Shapiro-Wilks. También se realizó el test de homocedasticidad y homogeneidad de varianza a través del test de Levene.

RESULTADOS

Tolerancia a la salinidad en líneas endocriadas

Acumulación de Na⁺ y K⁺

Todas las líneas en este estudio acumularon Na⁺ en toda la planta (Figura 2.1A). Sin embargo, las concentraciones foliares de Na⁺ fueron significativamente mayores en HAR1 y HA821. Por otro lado, HA124 y HA64 fueron los genotipos con mayor acumulación en el hipocótilo, mientras que HAR2 y ND761 fueron los que menos concentraciones de Na⁺ presentaron en esta zona. En cuanto a la acumulación de Na⁺ en el entrenudo 1, HA821 y ND761 fueron los que más acumularon; por el contrario, las menores concentraciones en este órgano se dieron en HA89, HA370 y HAR2 (Figura 2.1 A). HA370, HA84 y HA89 tuvieron de bajas a nulas concentraciones en el pecíolo de la hoja 7, mientras que HA821, HAR1, HAR2 y ND761 presentaron elevadas concentraciones.

Las concentraciones de Na⁺ en las láminas de la hoja 7 se encuentran graficadas con mayor detalle en la Figura 2.1B. Así, HA821 fue el que presentó la mayor concentración de Na⁺ en lámina, siguiendo en orden HAR1, y las diferencias con respecto al resto de los genotipos fueron estadísticamente significativas. Los genotipos HAR3, ND761 y HA64, también presentaron elevadas concentraciones foliares de Na⁺. Los genotipos que menos Na⁺ presentaron en la lámina de la hoja 7 fueron: HA89, HA124, HAR2, HAR4 y HAR5 (Figura 2.1.).

Las concentraciones foliares de K⁺ tendieron a disminuir como resultado del tratamiento salino, con algunas excepciones como HAR3 y HA89, donde estas

concentraciones fueron incrementadas por efecto de la salinidad, especialmente HAR3 donde los valores alcanzados fueron incluso superiores a la de los testigos de otros genotipos (HA370, HA89, HAR1, HAR2, HAR4 y ND761) (Figura 2.1 C). Hubo diferencias significativas entre control y sal para todos los genotipos, excepto en HAR4 y ND761 (Figura 2.1.C). En cuanto a los valores máximos alcanzados en los controles, se destacan los genotipos HA64, HA124 y HAR5, con valores cercanos e incluso superiores a los 1500 $\mu\text{molK}^+/\text{gPS}$. HA89 fue el genotipo con menores concentraciones de este catión en condiciones control.

Entre las plantas salinizadas, se destacan los elevados valores de K^+ en los genotipos HAR3, HA821, HA124 y HAR5. Por el contrario, valores por debajo de los 500 $\mu\text{molK}^+/\text{gPS}$ fueron encontrados en HAR2 y HAR1. Cabe destacar que estos bajos valores encontrados para estos dos genotipos, contrastan con las concentraciones de Na^+ que poseyeron estos mismos genotipos ya que HAR1 presentó elevadas concentraciones de este ion en condiciones salinas mientras que HAR2 presentó uno de los menores valores. Con esto queda asentado cómo puede variar la relación K^+/Na^+ variando una de las dos concentraciones de cationes, ya que HAR1 presentará una mayor relación por presentar elevados contenidos de Na^+ frente a similares contenidos de K^+ que HAR2.

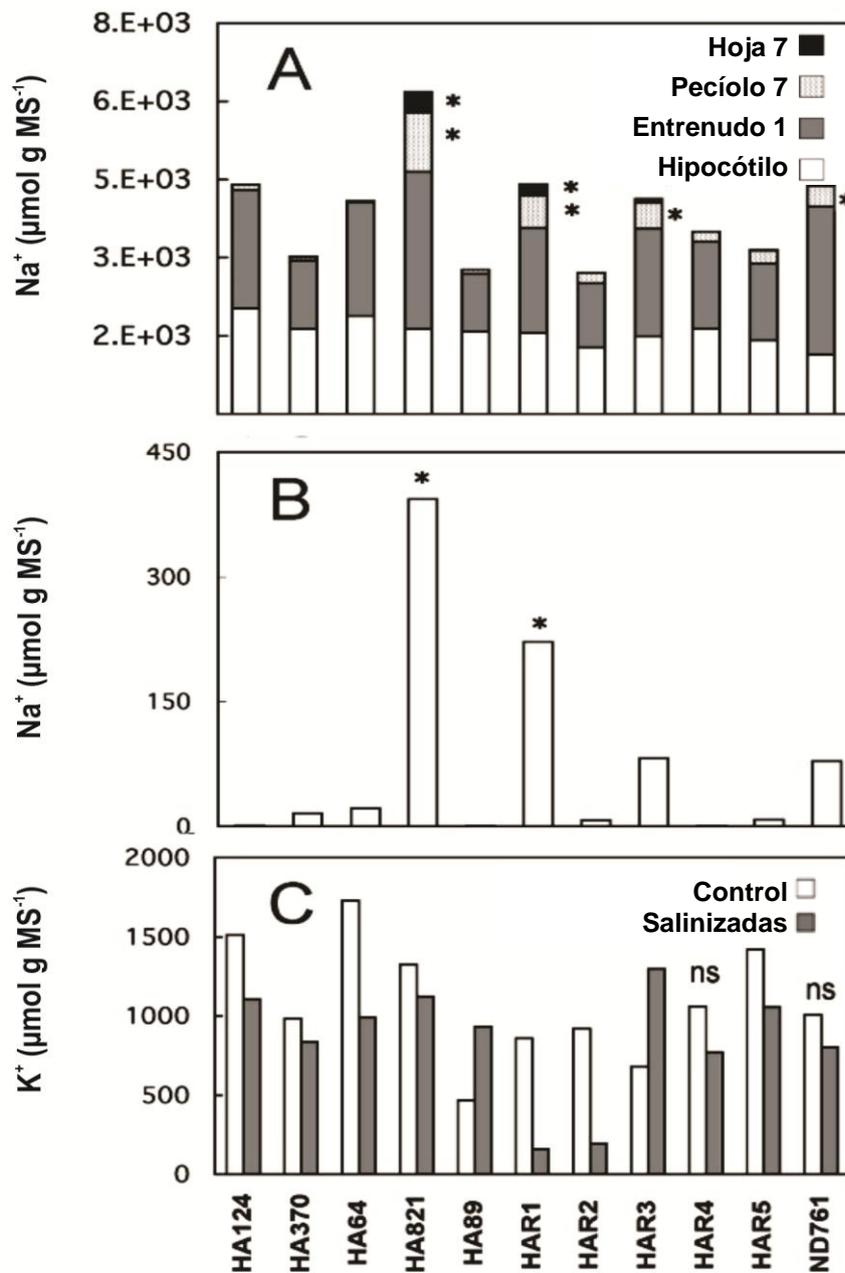


Fig. 2.1. A. Acumulación de Na⁺ en distintas partes de la planta en once genotipos/líneas de girasol e. Los asteriscos simples indican diferencias estadísticamente significativas entre plantas salinizadas de los distintos genotipos ($p < 0,05$). Los dobles asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,01$). B. Acumulación foliar de Na⁺ en las mismas líneas que A. C. Acumulación foliar de K⁺. Barras blancas indican promedio de plantas controles y barras grises el promedio de plantas salinizadas. El tratamiento salino se realizó con el agregado de 130 mM de NaCl a la solución de riego (condiciones de invernadero). Se realizó un ANAVA y se utilizó el test LSD de Fisher para detectar diferencias estadísticamente significativas entre medias ($p < 0,05$), se indican las diferencias no significativas (ns). (n=3-8).

En el anexo se pueden encontrar las relaciones K^+/Na^+ para las once líneas estudiadas (Figura A.45.). Los datos fueron muy variables. Solamente el genotipo HAR1 tuvo un valor menor a 1. Este valor está dado principalmente por las elevadas concentraciones de Na^+ que presentó este genotipo. Los materiales HA821 y ND761 tuvieron valores menores a 10. Estas líneas fueron distintas respecto a las otras ($P < 0,05$). El resto de las líneas tuvieron valores mayores a 500, alcanzando algunos genotipos valores superiores a 1000 como HA124, HA89 y HAR4.

El efecto tóxico de la salinidad sobre las hojas pudo observarse por necrosis en zonas marginales de hojas que habían completado su expansión (Figura 2.2). Esta observación se correspondió con la inclusión foliar de Na^+ de los distintos genotipos. Así, el genotipo HAR2 presentó escasa a nula necrosis en los márgenes de las hojas, mientras que HAR1 y HA64 presentaron mayores daños por el efecto tóxico de este ion (Figura 2.2).

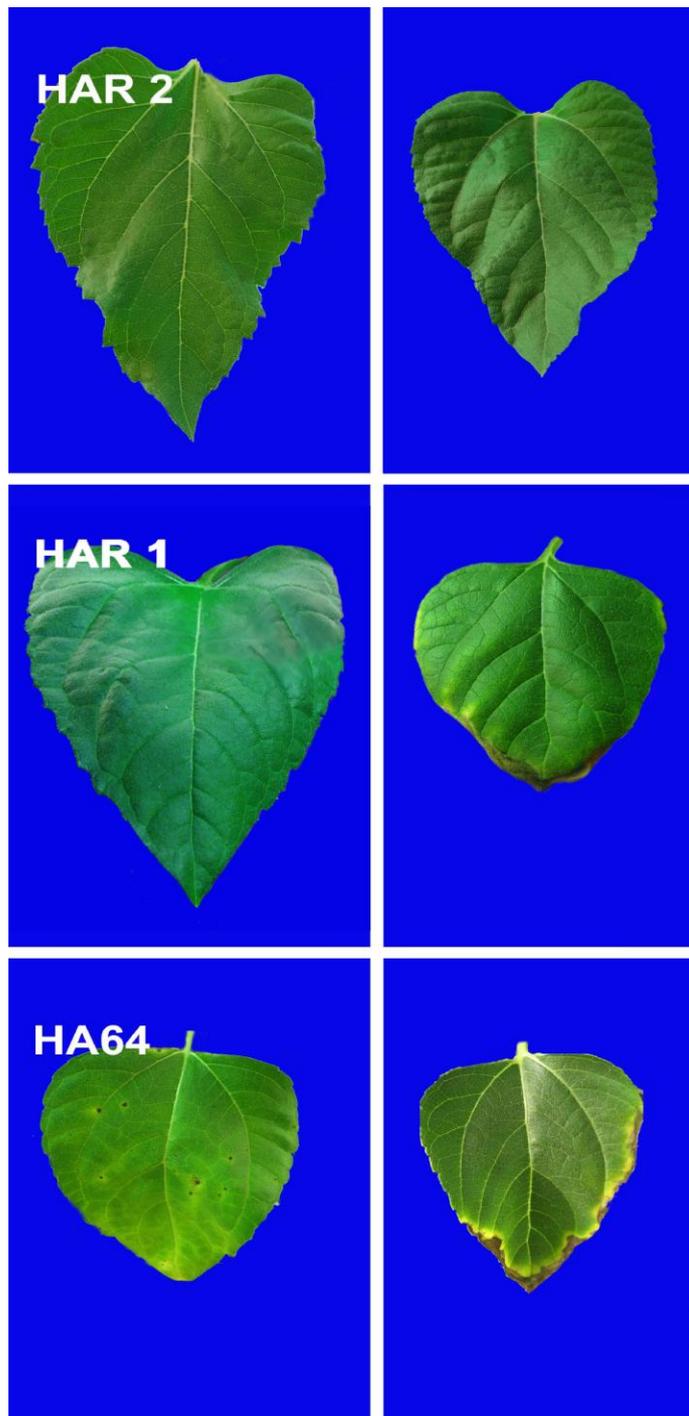


Fig. 2.2. Efecto de la salinidad (130mM, condiciones de cámara de crecimiento) sobre el daño de la hoja 8 en HAR2, HAR1 y HA64. La columna de la izquierda corresponde a plantas control y la derecha a las plantas salinizadas.

Respuestas tempranas del crecimiento a la salinidad

Como se muestra en la tabla 2.5., las tasas relativas de elongación de plantas (TREP) variaron, en las líneas de girasol, en el tratamiento control; los genotipos con mayores tasas fueron HA124, HAR3 y HAR2, mientras que los de menores tasas fueron HA821 y HA64 (Tabla 2.5.). Cabe destacar que dentro de las líneas estudiadas, sobresalió el genotipo HA64, que presentó baja estatura y elevada producción de hojas en toda la planta. Inicialmente, tanto las plantas controles como las tratadas, dentro de una determinada línea, tuvieron alturas estadísticamente similares; los efectos del tratamiento salino fueron detectados a medida que éste progresaba. Las líneas más afectadas fueron HA821, ND761, HAR1, HAR3, HAR4, HAR5 y HA370, mientras que HA64, HA124, HA89 y HAR2 tuvieron las menores disminuciones de sus tasas comparando cada una de ellas con sus respectivos controles. Los efectos de la salinidad sobre la elongación en estas líneas fueron independientes de las tasas de elongación en las plantas control. Efectos de similares magnitudes fueron observados tanto en las líneas de crecimiento más rápido como en las líneas con tasas menores (las más lentas). Así, puede compararse, por ejemplo, HAR1 con HAR3, donde el primero tuvo TREP's mucho más elevadas pero ambos tuvieron la misma disminución porcentual en salinidad. Otro ejemplo es HA64 y HA124. Ambos tuvieron disminuciones porcentuales en sus TREP's similares (entre 10 y 15 %) mientras que HA124 tuvo tasas de elongación, en condiciones control, más elevadas ($6,21E-03$ en HA124 y $4,31E-03$ °Cd en HA64).

Los efectos significativos del tratamiento salino sobre la altura de las plantas comenzaron a evidenciarse en distintos momentos a partir del comienzo de la salinización, dependiendo del genotipo estudiado. Así, algunos genotipos evidenciaron diferencias en altura 150 °Cd antes que otros. Los genotipos HA370, HAR1, HAR4 y HAR5 presentaron diferencias a los 334 °Cd luego de comenzado el experimento, mientras que HA124, HA64, HAR2, HAR3 y ND761 comenzaron a tener diferencias entre tratamientos a los 484 °Cd.

Tabla 2.5. Tasa relativa de elongación de plantas (TREP, en °Cd⁻¹ x 10⁻³) en 11 líneas de girasol, determinadas a partir de cuatro mediciones de altura de planta consecutivas, a los 363, 484, 603 y 736 °Cd registrados a partir del inicio del experimento. Los porcentajes de los controles fueron calculados como el cociente de cada planta salinizada sobre el valor promedio de todas las plantas control. Los °Cd en los cuales ocurre las primeras diferencias en altura indican el momento más temprano (medido en °Cd) cuando las diferencias significativas en altura se detectaron entre plantas control y salinizadas (130 mM de NaCl en la solución de riego). Las tasas corresponden a los primeros 15 días de exposición a la salinidad.

Genotipo	TREP, °Cd ⁻¹			°Cd a los cuales comienzan las diferencias en altura
	Control	Sal	% del Control	
HA124	6,21	5,72	91,9 CD	484
HA370	5,05	3,76 *	76,0 AB	334
HA64	4,31	3,70	86,5 BCD	484
HA821	4,90	3,50 *	7,4 A	363
HA89	4,37	3,77	86,4 ABCD	363
HAR1	4,59	3,72 *	73,9 AB	334
HAR2	5,87	5,61	94,9 D	484
HAR3	6,10	4,57 *	75,4 AB	484
HAR4	5,16	4,04 *	76,9 ABC	334
HAR5	5,34	3,90 *	73,6 AB	334
ND761	5,80	4,50 *	77,6 ABC	484

Estadísticas: Los resultados fueron sometidos al test de ANAVA seguido por el test de comparación de medias LSD de Fisher, con $p < 0,05$. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre plantas control y tratadas (en orden de evitar letra excesiva). En los % de controles, letras diferentes indican diferencias significativas. Los °Cd a los cuales se dan las diferencias iniciales en altura estadísticamente significativas fueron determinados comparando las diferencias en altura

entre plantas control y salinizadas en cada línea a cada fecha de muestreo sucesiva desde la iniciación del tratamiento salino y registrando la primera diferencia significativa ($p < 0,05$), utilizando el test “t” de Student.

No hubo correlación entre las diferencias más tempranas entre plantas controles y salinas de algunos genotipos y la reducción significativa de las tasas bajo condiciones salinas. Esto pudo observarse en los genotipos que mostraron diferencias tardías. HA124 y ND761 mostraron diferencias entre tratamientos a los 484 °Cd, pero el primero tuvo una disminución de sus tasas relativas de elongación de 8,1% mientras que el segundo lo tuvo en mayor medida. Sin embargo, si se toma en cuenta solamente el grupo de líneas que presentó diferencias tempranas en sus TREPs (a los 334 °Cd) se podrá ver que todos disminuyeron sus tasas relativas de elongación de plantas en una magnitud similar, del orden del 25%. Esto es para los genotipos HA370, HAR1, HAR4 y HAR5 (Tabla 2.1.).

Alteraciones en parámetros hídricos por salinidad

En la Tabla 2.6. se indican los valores de potencial hídrico (Ψ , en MPa) y el contenido relativo de agua (CRA, en porcentaje) para los cuatro genotipos estudiados en condiciones control y con el tratamiento salino de 130 mM de NaCl en la solución de riego.

Las plantas controles presentaron valores de potencial hídrico elevados y cercanos a 0 MPa (Tabla 2.6.). HAR5 fue el que presentó el mayor potencial hídrico (-0,35 MPa) mientras que HAR2 presentó el menor valor (-0,44 MPa). La salinidad disminuyó significativamente este parámetro en todos los genotipos, pero de manera más acentuada en los genotipos HAR5 y HA64 (disminuciones de -162 y -130% en el CRA entre plantas salinizadas y control de HAR5 y HA64, respectivamente). Los valores de este parámetro fueron aproximadamente dos veces menores que los valores para condiciones control, en todos los genotipos.

Tabla 2.6. Efecto de la salinidad (130 mM NaCl, condiciones de cámara de crecimiento) sobre el potencial hídrico (Ψ) y el contenido relativo de agua (CRA).

	HAR5		HAR2		HAR1		HA64	
	C	S	C	S	C	S	C	S
Ψ (MPa)	-0,35 c	-0,92 ab	-0,44 c	-0,87 ab	-0,36 c	-0,76 b	-0,43 c	-0,99 a
CRA (%)	94,10 c	85,10 a	97,02 c	84,69 a	97,75 c	90,01 b	94,60 c	90,16 b

C: medias para plantas control. S: medias para plantas salinizadas. n=5-9.

Los valores del contenido relativo de agua (CRA) fueron estadísticamente similares en los cuatro genotipos en condiciones control, alcanzando un valor promedio de 95,9 % (Tabla 2.6.). La salinidad disminuyó el CRA en mayor magnitud en los genotipos excluyentes (HAR5 y HAR2), mientras que las disminuciones fueron menos pronunciadas en los incluyentes (HAR1 y HA64) (Tabla 2.6.).

Adicionalmente, se determinaron los contenidos de clorofila y MDA, en los que no se observaron cambios por efecto del tratamiento salino (Véase Anexo, Tabla A.1.).

Respuestas a exposiciones prolongadas a salinidad

En esta sección se seleccionaron 4 genotipos de los 11 anteriormente estudiados para realizar un análisis más detallado. Se eligieron dos genotipos con elevadas concentraciones foliares de Na^+ (HAR1 y HA64) y dos genotipos con bajas concentraciones del mismo (HAR5 y HAR2), respectivamente (Tabla 2.3.).

Para evaluar el efecto de la salinidad sobre la materia seca y su partición se realizó una cosecha a los 978,17 °Cd desde el inicio el experimento (Figura 2.3). El genotipo

HAR5 fue el más afectado por la salinidad, llegando las plantas tratadas a poseer el 31% de materia seca total acumulada respecto a las plantas control (Figura 2.3 A). El genotipo HAR1 fue el menos afectado por la salinidad (54% respecto a la media de las plantas control). Valores intermedios de disminución tuvieron los genotipos HAR2 y HA64 con 45 y 43% de materia seca acumulada respecto al control, respectivamente.

El genotipo HAR1 fue el único genotipo que disminuyó el cociente entre la materia seca aérea y la materia seca radical (MSA/MSR), aunque esta variación no fue significativa (ver Anexo, figura A.10.). El resto de los genotipos aumentaron este cociente por efecto de la sal, siendo el efecto a nivel estadístico solamente significativo en el genotipo HA64.

La salinidad aceleró la ontogenia en los cuatro genotipos (Figura 2.3. A y B) y esto quedó reflejado en el aumento la materia seca de capítulos en condiciones de salinidad (Figura 2.3. A).

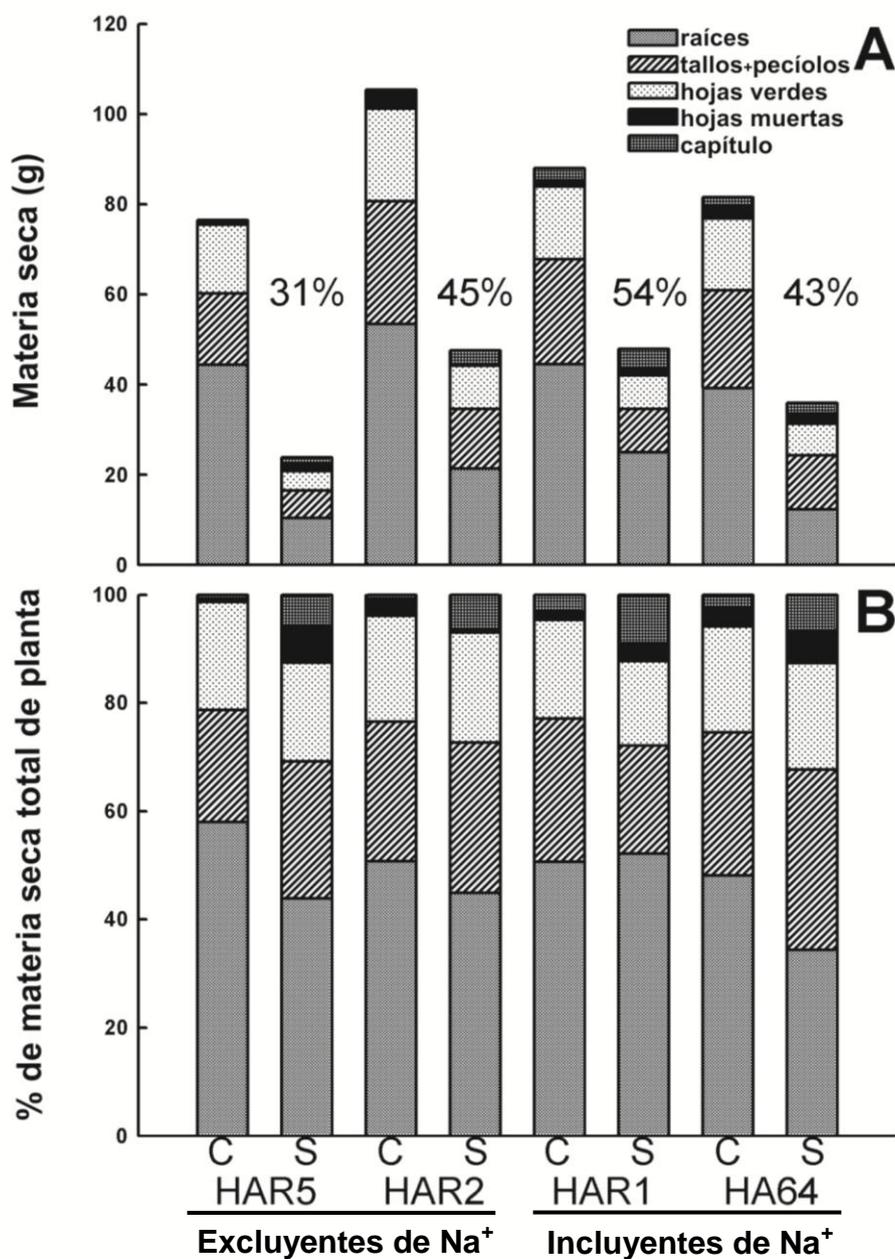


Fig. 2.3. Efecto de la salinidad sobre la acumulación de materia seca y su partición en cuatro genotipos de girasol contrastantes en inclusión foliar de Na⁺. El ensayo se llevó a cabo durante 978,17 °Cd en cámara de crecimiento con condiciones ambientales controladas. A. valores absolutos de materia seca en plantas control y tratadas (130 mM de NaCl). B. Valores porcentuales de materia seca para cada órgano respecto al total de la materia seca por planta para ambos tratamientos. C: plantas control. S: plantas salinizadas. (n = 5-9).

El porcentaje de hojas muertas aumentó en los genotipos HAR5, HAR1 y HA64 (Figura 2.3 B). El genotipo HAR2 no presentó un aumento del porcentaje de hojas muertas como consecuencia del tratamiento salino; contrariamente a lo observado en los otros genotipos, el porcentaje de hojas muertas disminuyó por efecto de la salinidad (3,21% vs. 0,67% para condiciones control y sal respectivamente). Esto pudo deberse a que este genotipo presentó, por un lado, una baja concentración foliar de Na⁺ y, por el otro, al disminuir el área foliar por efecto de la sal, podría haber disminuido la cantidad de hojas expuestas a bajas intensidades de radiación por efecto del sombreado de las hojas superiores.

En la Tabla 2.7. se presentan los valores de filocrono (FC), área foliar total (AFT), materia seca de hojas (MSFT) y el porcentaje de hoja muerta en relación a la materia seca total de hojas (como valores porcentuales)(MSHM/MSFT).

Tabla 2.7. Efecto de la salinidad (130 mM NaCl, condiciones de cámara de crecimiento) sobre el filocrono (FC), área foliar total (AFT), materia seca foliar (MSF) y materia seca de hojas muertas (MSHM) como porcentaje del total de materia seca foliar en cuatro genotipos de girasol. C: media de plantas control para cada parámetro. S: media de plantas tratadas con 130 mM para cada parámetro.

Parámetro	HAR 5		HAR2		HAR 1		HA 64	
	C	S	C	S	C	S	C	S
FC (°Cd)	30,36 d	35,98 e	21,93 b	25,77c	21,67 b	28,52 cd	17,58 a	19,98 ab
AFT (dm ²)	50,57 c	10,88 a	48,95 c	21,54 b	44,95 c	17,04 ab	52,36 c	20,35 ab
MSFT (g)	16,29 b	5,29 a	23,90 c	9,97 a	17,45 b	9,06 a	18,90 b	9,20 a
MSHM/MS FT *100	3,44 a	22,01 cd	13,57 abc	3,48 a	7,66 ab	17,1 cd	15,32 bc	24,38 d

DMS: FC= 3,79; AFT= 8,54; MSFT= 4,67; MSHM/MS= 9,98.

La salinidad disminuyó significativamente la tasa de aparición de hojas (aumentó el filocrono) en todos los genotipos, excepto en HA64. Cabe destacar que en este genotipo, la tasa de aparición de hojas fue la más elevada (Tabla 2.7.).

El área foliar por planta disminuyó significativamente en todos los casos, exceptuando en HA64 (Tabla 2.7.). Así, HAR5 fue el que mayor disminución tuvo en su área foliar por efecto de la salinidad. La materia seca de hojas disminuyó significativamente en todos los genotipos (Tabla 2.7.).

Tolerancia tisular al Na⁺

La tolerancia tisular al Na⁺ se evaluó relacionando el porcentaje de hoja muerta (%HM) con el contenido foliar de Na⁺. El valor de porcentaje de HM fue elevado para HAR1 y bajo para HAR2, teniendo en cuenta que el primero incluyó mayor cantidad de Na⁺ que el segundo. Para ver claramente la capacidad de cada genotipo de tolerar la presencia del Na⁺ en los tejidos, se ilustra la Figura 2.4.

El genotipo HAR1 presentó elevados valores de porcentaje de HM (Figura 2.4) y fue el que más Na⁺ incluyó en sus tejidos por lo que puede decirse que este genotipo presentó cierta capacidad de tolerar las altas concentraciones foliares de Na⁺. Los genotipos HA64 y HAR5 presentaron plantas con los mismos valores de porcentaje de hoja muerta, pero con contenidos de Na⁺ foliar muy inferiores a los encontrados en HAR1, indicando que estos genotipos fueron más susceptibles a la presencia de Na⁺ en sus tejidos foliares.

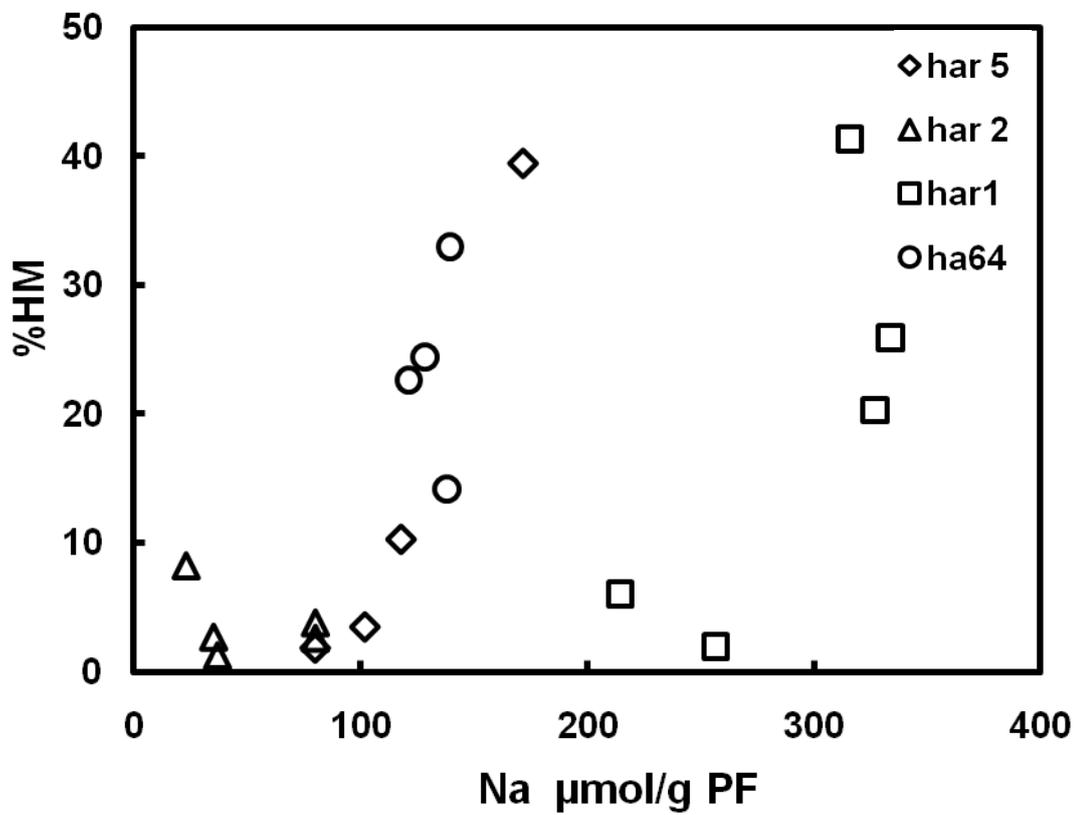


Fig. 2.4. Efecto de la salinidad (130 Mm NaCl, condiciones de cámara de crecimiento) sobre el porcentaje de hoja muerta (%HM) en función de la concentración foliar de Na^+ para cuatro genotipos de girasol. Cada símbolo indica una planta individual salinizada. (n=5-9).

Generación de ranking un de tolerancia a salinidad a partir de las variables morfológicas estudiadas

Las siguientes variables, expresadas como cocientes respecto al control, contribuyeron de manera cuasi equitativa para diferenciar las líneas estudiadas a partir de un análisis de componentes principales (para mayor información véase en el Anexo las Figuras A.17. y A.18.): Materia Seca foliar (MSF), Materia Seca Aérea (MSA), Materia Seca Radical (MSR), Materia Seca Total (MST), Número de Hojas (NH), Área Foliar Total (AF), y el cociente entre hojas muertas y la materia seca total de hojas (HM/MSH). Solamente AF, MST, MSR y HM/MSH presentaron diferencias significativas entre los genotipos (ANAVA, $p < 0,05$). Un ranking de tolerancia a salinidad a largo plazo, basado en estas variables, indicó que HAR2 fue el que mayor tolerancia presentó, seguido por HAR1, HA64 y HAR5 (HAR2>HAR1>HA64>HAR5, Tabla 2.8). Al agregar las tasas relativas de elongación de plantas (TREPs, ya estudiadas en la sección “Respuestas tempranas del crecimiento a la salinidad” en la Tabla 2.5), pudo determinarse un ranking de tolerancia a salinidad considerando variables respuestas a corto y largo plazo (Tabla 2.8.). El ranking generado es igual al ranking de tolerancia a largo plazo, donde HAR2 resultó ser el genotipo más tolerante y HAR5, el más susceptible (Tabla 2.8.).

Tabla 2.8. Ranking de tolerancia a la salinidad en cuatro genotipos de girasol irrigados con 130 mM de NaCl (cámara de crecimiento), basado en variables medidas a corto y largo plazo a partir de la exposición inicial a la salinidad.

líneas	Variables de crecimiento como proporciones del control					Tolerancia a la salinidad (largo plazo)	Tolerancia a la salinidad (corto y largo plazo)
	AF	MST	MSR	HM/MSH	TREP		
HA64	0,39	0,44	0,31	1,59	0,86		
HAR1	0,38	0,55	0,56	2,23	0,73		
HAR2	0,44	0,45	0,40	0,26	0,95		
HAR5	0,24	0,33	0,24	4,36	0,74		
Alteración promedio por variable (promedio de las 4 líneas)	0,38	0,46	0,40	1,79	0,82		
líneas	Cocientes de alteración promedio					a+b+c-d	a+b+c-d+e
	AF (a)	MST (b)	MSR (c)	HM/MSH (d)	TREP (e)		
HA64	1,02	0,96	0,79	0,89	1,05	1,88	2,93
HAR1	1,00	1,19	1,41	1,25	0,89	2,35	3,27
HAR2	1,16	0,98	1,00	0,14	1,16	3,00	4,18
HAR5	0,63	0,71	0,59	2,43	0,90	-0,50	0,42

Las siguientes variables fueron medidas 46 días luego de haber alcanzado el nivel de salinidad final, AF: área foliar, MST: materia seca total, MSR: materia seca radical, HM/MSH: proporción de hoja muertas sobre el total de materia seca de hojas, mientras que la elongación (TREP) fue medida en el intervalo comprendido entre los primeros 15 días de aplicado el tratamiento salino. Las mediciones de cada planta sometida a estrés fueron transformadas en cocientes respecto a la media de las plantas control, dividiendo cada una de ellas por el valor promedio de dicha variable del tratamiento control. Para determinar si una variable, en un genotipo dado, fue afectada por encima o por debajo del promedio de los genotipos, cada cociente de un genotipo determinado, obtenido como se dijo anteriormente, fue dividido por el valor promedio general para todos los genotipos. Los cocientes obtenidos para cada variable fueron entonces sumados para obtener el

ranking general, exceptuando la variable “porcentaje de hojas muertas” que fue utilizada con signo negativo. Los mayores valores fueron para las líneas menos afectadas, y los menores para las más sensibles.

Tolerancia a la salinidad en híbridos comerciales de girasol

En este apartado se evaluó la existencia de variabilidad intraespecífica para variables que permiten identificar mecanismos de tolerancia a la salinidad. También se evaluó la correlación de diversos parámetros con la acumulación foliar de Na^+ .

Acumulación de Na^+ y K^+

En la Figura 2.5 A se graficaron las concentraciones foliares de Na^+ en la lámina 8 de los 18 híbridos de girasol estudiados. Se detectaron híbridos con muy bajas concentraciones de Na^+ y otros híbridos que superaron los $450 \mu\text{mol}$ de Na^+ por gramo de peso seco de lámina (Figura 2.5 A.). Los híbridos que más acumularon Na^+ fueron: DK3940, Tritón Max y 50 A0 (Figura 2.5 A). También los híbridos SMR 769, 64 A 89 y CIRO presentaron elevadas concentraciones foliares de Na^+ . Por el contrario, se pudo verificar que ACA885 no acumuló Na^+ en hojas. SMR779CL, NTO2.0 y Neón acumularon menos de $20 \mu\text{mol/gPS}$ de Na^+ en láminas.

La salinidad modificó las concentraciones de K^+ de diferente forma para los diversos híbridos estudiados (Figura 2.5 B). En general, la salinidad disminuyó las concentraciones foliares de K^+ , con excepción de los híbridos DK4065, SMR769, DK3810, DK3820 y DK3940, donde hubo un aumento no significativo de las concentraciones de este catión por efecto del estrés salino. Por lo tanto puede afirmarse que, generalizando, la marca Dekalb presentó híbridos que incrementaron sus concentraciones foliares absolutas de K^+ en condiciones de estrés salino.

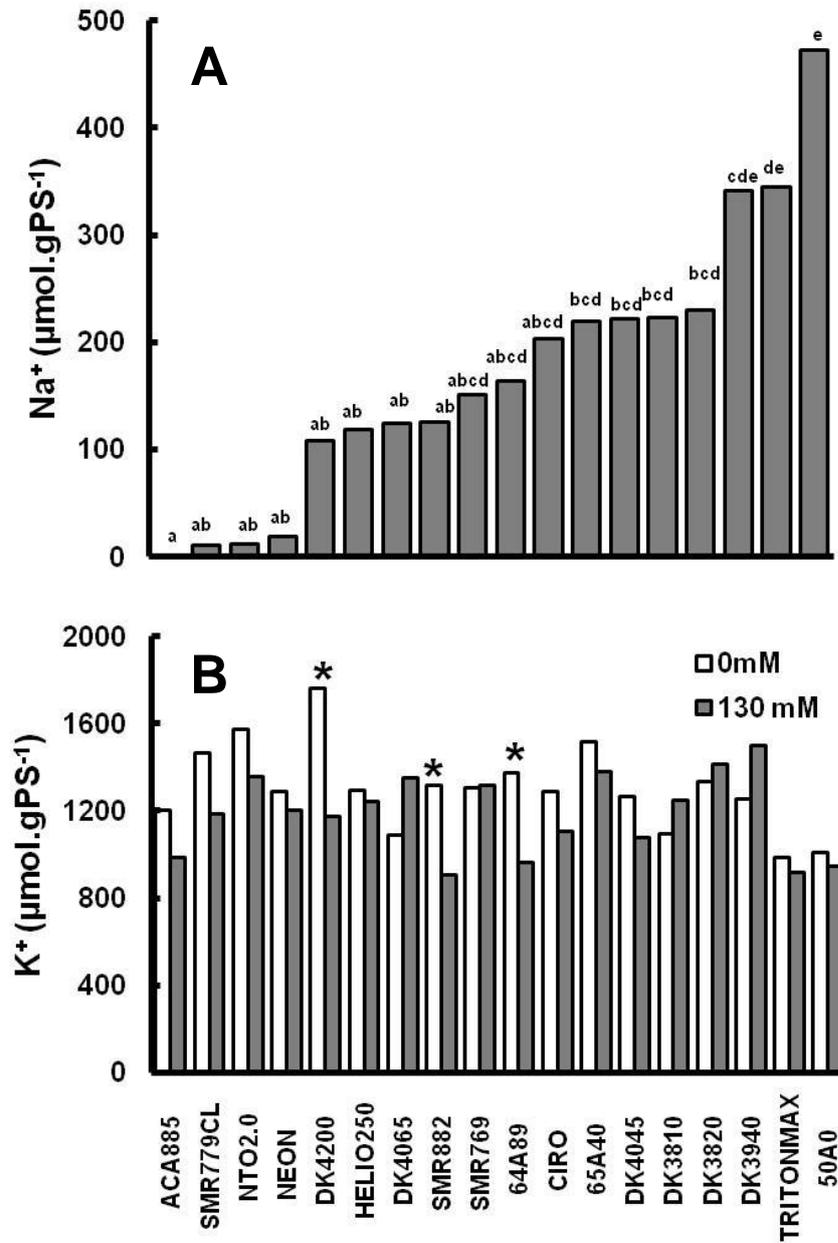


Fig. 2.5. A: Concentración foliar de Na⁺ en 18 híbridos de girasol cultivados durante grados día sin salinidad o con el agregado de 130 mM de NaCl en la solución nutritiva y B: concentración foliar de K⁺ en los mismos híbridos bajo las condiciones mencionadas. El ensayo se condujo durante 1141,95 °Cd en cámara de crecimiento con condiciones controladas de radiación y temperatura. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de significancia del 5 % (Test LSD de Fisher, ANAVA). (n=4).

Sólo hubo diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de K^+ entre el tratamiento control y el tratamiento con sal para los híbridos DK4200, SMR882 y 64A89 (Figura 2.5 B). Las mayores concentraciones de K^+ en condiciones control se encontraron en los híbridos NTO2.0, DK4200 y 65A40; los menores valores se registraron en los siguientes híbridos: DK4065, Tritón Max y 50 A0. Las mayores concentraciones absolutas en sal fueron para 65 A40, DK3820 y DK3940 y los menores valores se dieron en SMR882, Tritón Max y 50 A 0. Tanto Tritón Max como 50 A 0, tuvieron, en general, las menores concentraciones de K^+ en ambos tratamientos.

Las relaciones K^+/Na^+ para los 18 híbridos estudiados se encuentran graficadas en la Figura 2.6. Los valores para este cociente fueron mayores a 1, encontrándose los menores valores absolutos en los híbridos ACA885, TRITÓN MAX Y 50 A 0, y las mayores relaciones para el híbrido DK 4200. El valor de ACA 885 fue de cero ya que la no se detectó Na^+ en hojas en este híbrido (Figuras 2.5 A y 2.6).

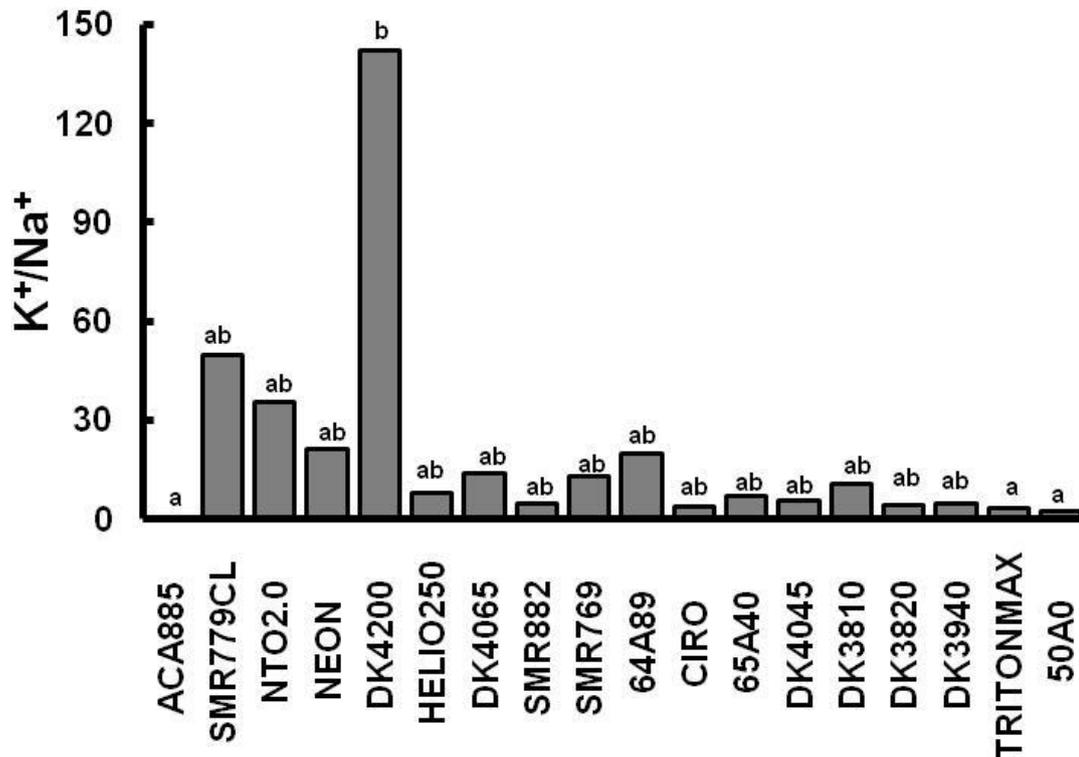


Fig. 2.6. Relación K^+/Na^+ en 18 híbridos irrigados con el agregado de 130 mM de NaCl en la solución nutritiva. El ensayo se condujo durante 1141,95 °Cd en cámara de crecimiento con condiciones controladas de radiación y temperatura. Las diferencias estadísticamente significativas entre plantas control y salinizadas para cada híbrido, se indican con asteriscos (test de LSD de Fisher, ANAVA). (n = 4).

Índice de daño de membranas

El índice de daño de membranas es un indicador de la estabilidad de estas estructuras e indica en cierto modo la tolerancia de los tejidos vegetales frente a un estrés. En nuestro trabajo se utilizó el índice de Flint como indicador de daño de membranas y, consecuentemente, de tejidos. En los 18 híbridos de girasol se evaluó la variabilidad intraespecífica para este parámetro. Flint *et al.* (1967) reportaron que una alternativa a los métodos tradicionales de medición de estabilidad de membranas resulta expresando (en el caso de estudio realizados por ellos con estrés por frío) el daño por enfriamiento convirtiendo el porcentaje liberado de electrolitos de una muestra a una escala donde las muestras no congeladas (testigos) son tomadas con valor 0 y a muestras hervidas se les asignó un valor de 100, representando el daño total (Flint *et al.*, 1967).

Se encontró variabilidad intraespecífica para daño de membranas por efecto de la salinidad (Figura 2.7 A). El híbrido 50A0 fue el que mayor índice de daño de membranas presentó. Coincidentemente, este híbrido fue el que tuvo los mayores valores de Na^+ foliares al ser salinizado y el que menor cantidad de K^+ presentó bajo estas condiciones (Figuras 2.5 A y B). El híbrido ACA 885 también tuvo elevado daño de membranas (16,08) (Figura 2.7 A). Los menores valores de daño en membranas se encontraron en los híbridos SMR779CL (genotipo que incluyó bajos contenidos foliares de Na^+) y en DK4045 (híbrido intermedio en acumulación foliar de Na^+).

En la figura 2.7 B se graficaron los valores de índice de daño de membrana en función de la concentración foliar de Na^+ para las plantas estresadas. De la Figura 2.7 B se concluye que no hubo una correlación entre concentración foliar de Na^+ e índice de daño de membranas, encontrándose híbridos incluyentes y excluyentes con índices de daños bajos y elevados en ambos grupos (Figura 2.7 B).

A partir de estos resultados se seleccionaron 2 híbridos “incluyentes” y dos “excluyentes” de Na⁺ foliar. En cada grupo de híbridos clasificados por su concentración foliar de Na⁺ se seleccionó un híbrido con alto y otro con bajo daño de membranas respectivamente (Tabla 2.4.). En la siguiente sección se detalla lo antedicho.

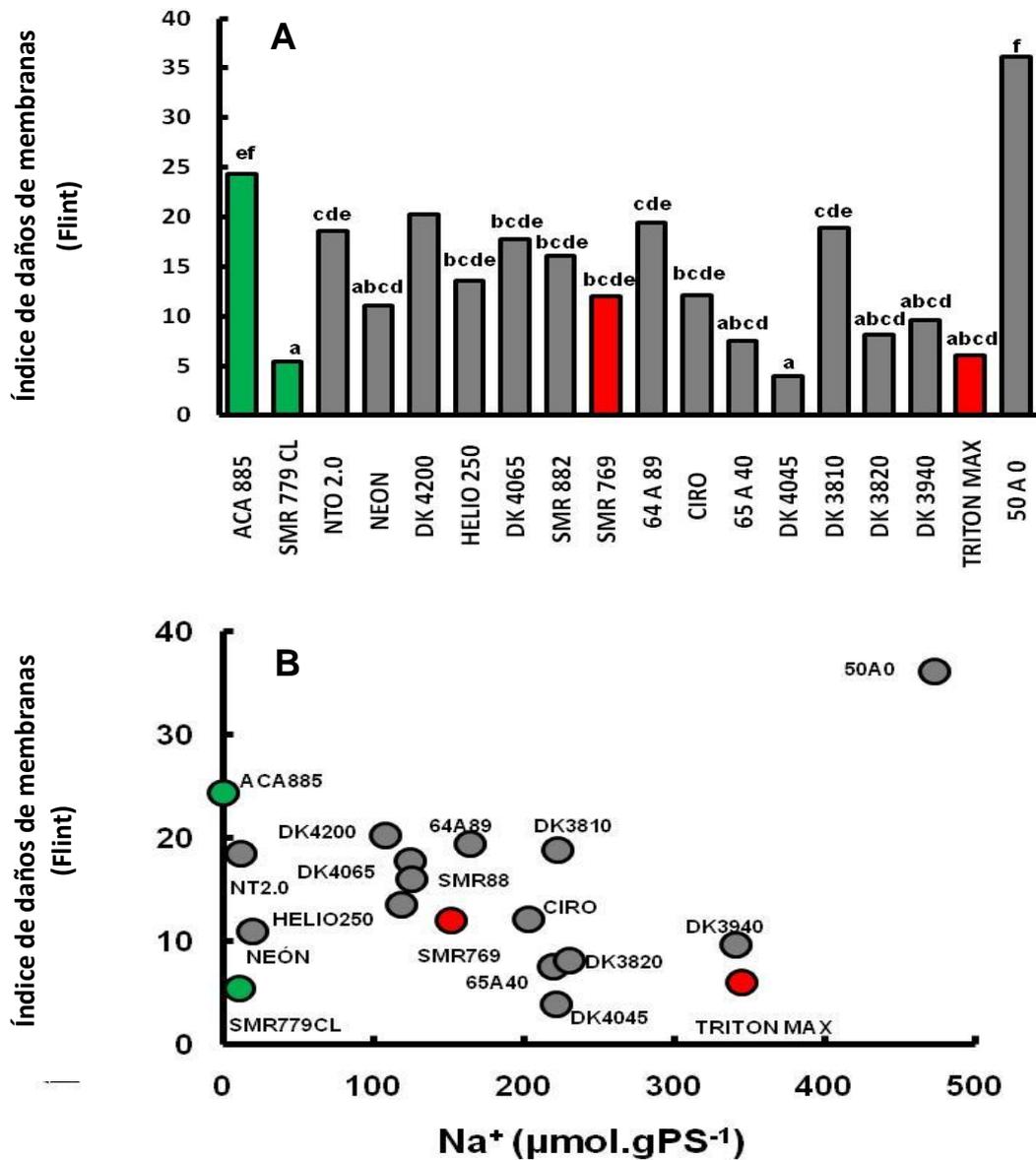


Fig. 2.7. A: índice de daño de membranas (utilizando la metodología descrita por Flint) en condiciones salinizadas (130 mM de NaCl agregado a la solución de riego). B: índice de daño de membranas en función de la concentración de Na⁺ foliar. Los círculos verdes indican los genotipos excluyentes con alto y bajo daño de membranas y los círculos rojos indican los genotipos incluyentes con alto y bajo daño de membranas. El daño de membranas por salinidad se cuantificó según el método de Flint *et al.* (1967). Se estudiaron 18 híbridos cultivados durante 1141,95 °Cd en cámara de crecimiento con condiciones controladas de radiación y temperatura. Las barras verdes y rojas en A indican los genotipos excluyentes e incluyentes, respectivamente. Los círculos verdes en B indican lo mismo que las barras verdes en A, es decir, los híbridos con bajas concentraciones de Na⁺ y bajo y alto daño de membranas, seleccionados para estudios posteriores mientras que los círculos rojos en B indican los genotipos con mayores concentraciones foliares de Na⁺ (n=4).

Respuestas tempranas del crecimiento a la salinidad

Luego de haber caracterizado los 18 híbridos por su concentración foliar de Na^+ y K^+ y el daño de membranas, se eligieron cuatro genotipos: dos excluyentes y dos incluyentes. Dentro de cada grupo, a su vez, se seleccionaron híbridos con bajo y alto daño de membranas. Los genotipos excluyentes seleccionados fueron ACA 885 y SMR779CL, mientras que los incluyentes, TRITÓN MAX y SMR769. Así, SMR779CL y TRITÓN MAX presentaron bajo daño de membranas y ACA885 y SMR769, alto daño (Tabla 2.4.). Si bien el híbrido SMR769 no fue el que mayor daño presentó dentro de los incluyentes y el híbrido TRITÓN MAX no fue el que menos daño de membrana tuvo dentro de este mismo grupo, se seleccionaron estos híbridos ya que se realizó una determinación de daño de membranas *a priori* según la metodología descrita por Hancock (1972). Utilizando esta metodología, los híbridos antes mencionados presentaron los mayores y menores daños, respectivamente. Igualmente, siguiendo la metodología de Flint *et al.*(1967), estos híbridos son contrastantes en daño de membranas (Tabla 2.6, Figura 2.7.).

En la Tabla 2.9 se expresan los valores de tasas relativas de elongación de plantas (TREP, en $^{\circ}\text{Cd} \times 10^{-3}$) para expresar los efectos primarios del estrés salino. Los efectos de la salinidad sobre las TREP comenzaron a verse durante la imposición del estrés. Los híbridos ACA885 y SMR 769 no mostraron diferencias en las TREP durante el proceso de salinización. Las tasas de elongación relativas igualmente cayeron a 58 % en SMR 779 CL y a 60 % en ACA 885. Luego de la imposición del estrés, el genotipo ACA 885 fue el que menos disminuyó su tasa relativa de elongación de planta (84% respecto del control). SMR769 disminuyó las TREP a un 80 %, Tritón MAX a un 63 % y, el genotipo más afectado fue SMR779 CL (60 %). Estos resultados fueron contrastantes ya que SMR 779CL es el que presentó bajo daño de membrana y presentó bajas concentraciones foliares de Na^+ . Los híbridos con menos reducción en sus TREP (ACA885 y SMR 769) son, coincidentemente, los híbridos que presentaron elevado daño de membrana por salinidad.

De esta manera, puede concluirse que los genotipos que más toleraron el estrés osmótico impuesto por la salinidad fueron los que presentaron elevados daño de membranas (ACA885 y SMR769), ya fueran incluyentes o excluyentes foliares de Na⁺ (Figuras 2.5 y 2.7; Tabla 2.9.)

Tabla 2.9. Efecto de la salinidad (130 mM, condiciones de cámara de crecimiento) sobre las tasas relativas de elongación de plantas (TREP, en °CD x 10⁻³) en cuatro híbridos de girasol con respuesta contrastante en acumulación foliar de Na⁺ y en daño de membranas. Se realizó el test de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD por sus siglas en inglés) y se utilizó un nivel de significancia del 5%. Los asteriscos para cada momento, indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

Híbrido	TREP (°Cd x 10 ⁻³)	
	C	S
	Antes	
ACA 885	4,1	3,4
SMR 769	6,9	5,9
SMR 779 CL	6,2	5,6
TRITÓN MAX	7,2	7,6
	Durante	
ACA 885	3,6	2,1
SMR 769	5,2	4,0
SMR 779 CL	5,5	3,2 *
TRITÓN MAX	5,6	3,4 *
	Después	
ACA 885	4,4	3,7
SMR 769	3,8	3,1
SMR 779 CL	5,5	3,3 *
TRITÓN MAX	4,4	2,8 *

DMS (°Cd x 10⁻³): 1,57 Antes: período previo a la imposición del estrés salino. Durante: período durante la exposición gradual a la salinidad. Después: período de mediciones comprendido luego de 1 que las plantas alcanzaran el nivel final de 130 mM de NaCl. n=5.

Alteraciones en parámetros hídricos por salinidad

En la Tabla 2.10. se exponen los valores de contenido relativo de agua (CRA) y de potencial osmótico (PO) para los híbridos ACA 885, SMR 769, SMR 779 CL y TRITÓN MAX . El genotipo ACA 885 fue el único híbrido que no disminuyó significativamente su CRA por efecto de la salinidad. TRITÓN MAX fue, por otra parte, el único híbrido que disminuyó significativamente su PO por efecto de la salinidad.

Tabla 2.10. Efecto de la salinidad (130 mM, condiciones de cámara de crecimiento) sobre el contenido relativo de agua (CRA) y sobre el potencial osmótico (PO, en MPa) en cuatro híbridos de girasol que contrastan en inclusión foliar de Na⁺ y en el nivel de daño de membranas. Letras distintas en una fila indican diferencias estadísticamente significativas (ANAVA, test LSD de Fisher. P<0,05). n=5. Las muestras se hicieron durante la mañana para evitar acumulación de solutos orgánicos por efecto de la fotosíntesis.

	ACA 885		SMR769		SMR779 CL		TRITÓN MAX	
	C	S	C	S	C	S	C	S
CRA (%)	0,82 c	0,78 bc	0,92 d	0,75 ab	0,89 d	0,70 a	0,89 d	0,74 ab
PO (MPa)	-1,24 ab	-1,32 bc	-1,23ab	-1,26 ab	-1,11 ab	-1,06 a	-1,21 ab	-1,53 c

DMS: CRA=0,053; PO=0,246. C: medias de plantas control; S: medias de plantas salinizadas. DMS: diferencias mínimas significativas para el Test de Fisher.

Para poder determinar si alguno de los híbridos realizó ajuste osmótico, en la Figura 2.8 se graficó para cada planta la relación entre el CRA y el potencial osmótico. Puede observarse como ACA 885 presentó disparidad entre plantas encontrándose plantas con CRA muy elevados y CRA más bajos. Sin embargo, todas las mediciones de cada planta dieron PO similares, de valores de aproximadamente -1,2/-1,3 MPa (Figura 2.8). Por otro

lado, TRITÓN MAX (TM) tuvo relativamente valores de medios a bajos de CRA pero bajando el PO mucho más que cualquier otro híbrido, con valores de -1,4 a -1,7 MPa. ACA885 modificó poco su CRA bajo estrés salino, sin modificar significativamente su PO. Por lo anterior, se concluye que ACA 885 fue el único híbrido que no disminuyó significativamente su CRA en sal (comparado con las plantas control) y TM fue el híbrido que más disminuyó su PO en condiciones de salinidad. Ninguno de los híbridos hizo ajuste osmótico ya que ACA885 mantuvo el CRA pero no bajo PO en salinidad y TM sí bajo el PO en salinidad, por lo que podría haber hecho ajuste osmótico, pero su CRA se vio fuertemente reducido en condiciones de estrés salino.

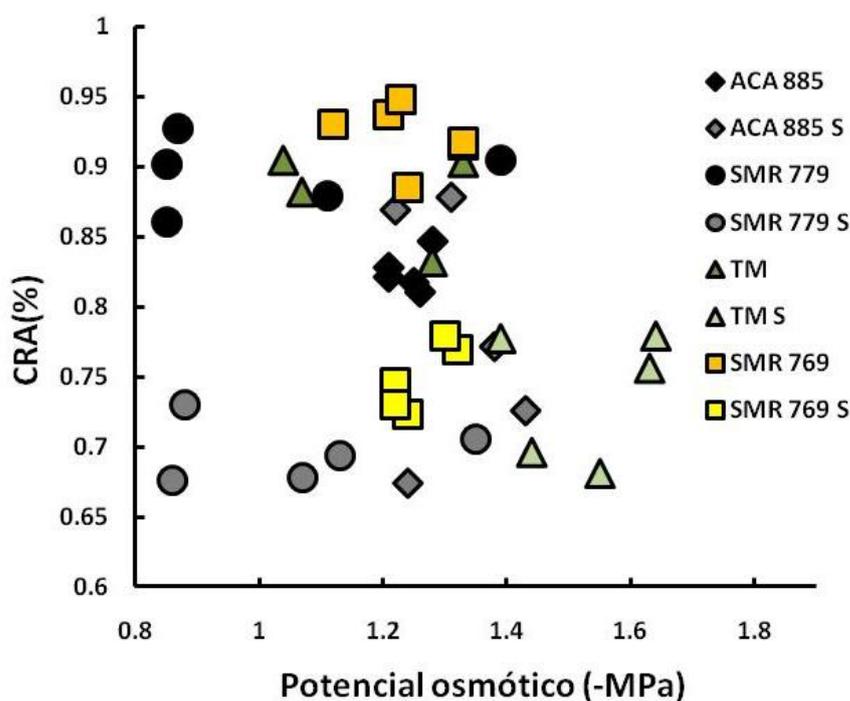


Fig. 2.8. Efecto de la salinidad (130 mM) sobre el contenido relativo de agua (CRA) en función del potencial osmótico (PO) para los cuatro híbridos estudiados. Símbolos diferentes indican diferentes híbridos. Colores diferente para un mismo símbolo indican los tratamientos control y con estrés salino (130 mM de NaCl, condiciones de cámara de crecimiento). Cada símbolo indica una planta individual. (n=5). S: plantas salinizadas.

Respuestas a exposiciones prolongadas a la salinidad

En la Figura 2.9 se encuentra graficada la materia seca, su partición y sus modificaciones por salinidad en los híbridos ACA 885, SMR 769, SMR 779 CL y TRITÓN MAX . Todos los materiales mostraron altas reducciones en acumulación de materia seca, sin que haya diferencias entre los mismos (Figura 2.9 A). En la Figura 9 B se encuentran graficados los porcentajes de materia seca que le corresponden a cada órgano con respecto al total de la plana.

La salinidad adelantó el desarrollo en todos los genotipos, especialmente en TRITÓN MAX y SRM 769 (Figura 2.9 B, zonas amarillas). Ambos genotipos son “incluyentes foliares de Na⁺” por lo que hubo correlación entre inclusión foliar de este ion y adelantamiento en el desarrollo de las plantas. La materia seca radical cambió su participación sobre el total según el genotipo, así en ACA 885 y SMR 769, las raíces disminuyeron su participación por salinidad, mientras que SMR779 no modificó esta relación y TM la aumentó. Coincidentemente, los híbridos que bajaron su participación de la materia seca radical sobre el total de la materia seca por planta fueron aquellos dos que presentaron niveles de daño muy elevados. A diferencia de las 4 líneas endocriadas (Figura 2.3), en este experimento no se observó presencia de hojas muertas en alguno de los genotipos o tratamientos.

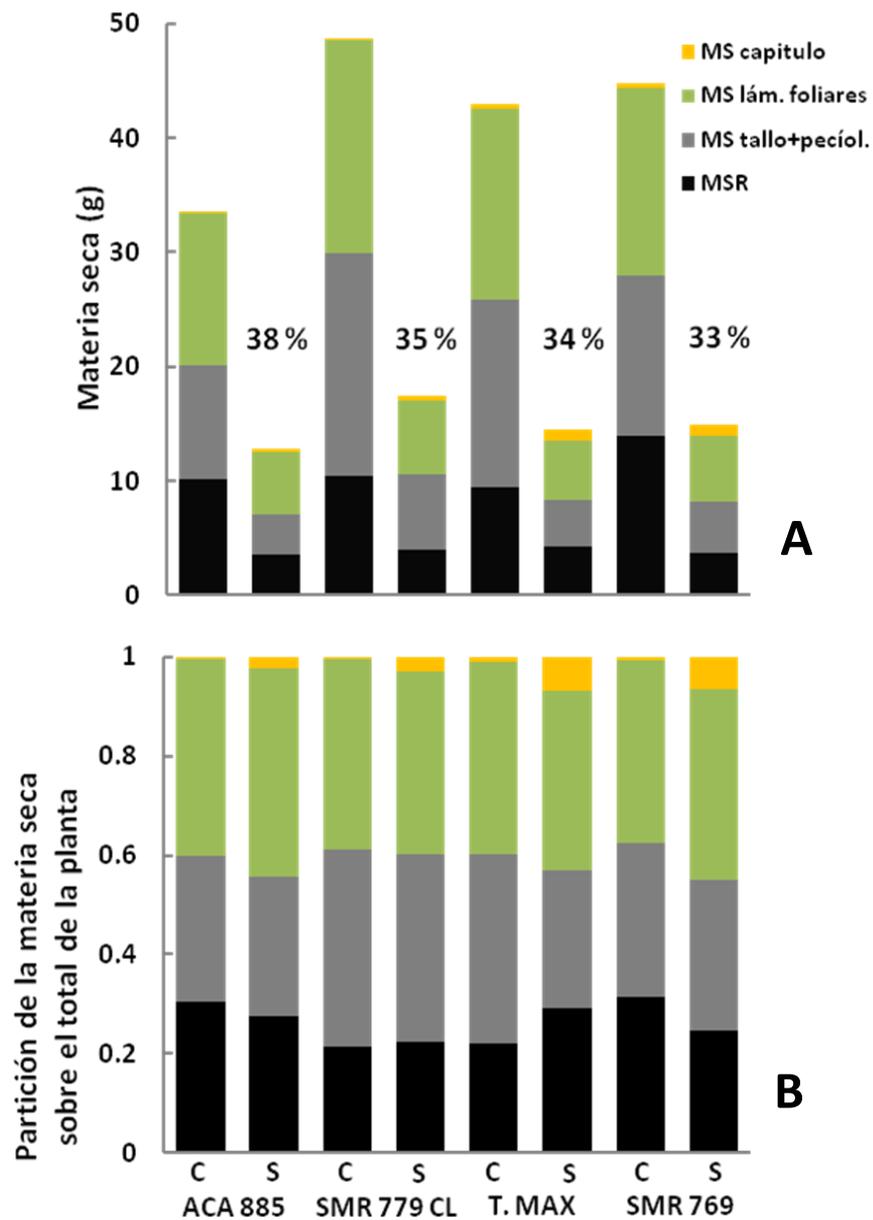


Fig. 2.9. Efecto de la salinidad (130mM) sobre la materia seca y su partición en cuatro híbridos de girasol. El ensayo se llevó a cabo durante 44 días (938,74 °Cd) en cámara de crecimiento con condiciones ambientales controladas. A. valores absolutos de materia seca en plantas control y tratadas. B. Valores porcentuales de materia seca para cada órgano respecto al total de la materia seca por planta para ambos tratamientos. C: plantas control. S: plantas salinizadas. (n= 5).

Generación de un ranking de tolerancia a salinidad a partir de las variables morfológicas estudiadas

Se confeccionó un ranking de tolerancia a la salinidad a largo plazo y a corto y largo plazo, como se realizó con las líneas (Tabla 2.8.). Las siguientes variables fueron tenidas en cuenta para realizar dicho ranking: materia seca radical (MSR), materia seca total (MST), daño de membranas y tasas relativas de elongación de plantas (TREPs). Al igual que lo realizado con las líneas para porcentaje de hoja muerta (HM/MSH, Tabla 2.8) el daño de membranas se utilizó con signo negativo ya que contribuye en forma opuesta al momento de confeccionar el valor que se le otorga a cada híbrido. Así, mayores valores de daño de membrana, implican menos tolerancia, como sucedió con el porcentaje de hojas muertas sobre el total de hojas (HM/MSH) en las líneas (Tabla 2.8). Las TREPs se utilizaron para determinar la tolerancia a corto plazo, es decir, la tolerancia de cada genotipo al estrés osmótico inducido por la salinidad. En la Tabla 2.11 se encuentran los valores para cada híbrido. Así se puede determinar que el híbrido SMR 779 CL fue el más tolerante tanto a largo como a largo y corto plazo (Tabla 2.11). El menos tolerante fue el híbrido SMR 769 (Tabla 2.11.) tanto a largo como a largo y corto plazo. El ranking, de mayor a menor tolerancia quedó conformado de la siguiente manera: SMR 779 CL < TM < ACA 885 < SMR769. La presencia de genotipos que incluyeron poco y mucho Na⁺ en las láminas foliares en los primeros puestos del ranking, indican que no hubo correlación entre inclusión foliar de Na⁺ y tolerancia a la salinidad. Estos descubrimientos, sumados a la falta de correlación entre inclusión foliar de Na⁺ y daño en membranas y la falta de correlación entre inclusión foliar de Na⁺ y respuestas tempranas a la salinidad, se discuten a continuación.

Tabla 2.11. Ranking de tolerancia a la salinidad en cuatro híbridos de girasol irrigados con 130 mM de NaCl (en cámara de crecimiento), basado en variables medidas a corto y largo plazo a partir de la exposición inicial a la salinidad.

Variables de crecimiento como proporciones del control						
líneas	MSR	MST	Daño membranas	TREP		
ACA 885	0,34	0,38	5,97	0,84		
SMR 769	0,28	0,36	6,76	0,80		
SMR 779 CL	0,40	0,41	2,12	0,60		
TRITÓN MAX	0,34	0,30	3,06	0,63		
Alteración promedio por variable	0,34	0,36	4,48	0,72		
Cocientes de alteración promedio					Tolerancia a la salinidad (corto y largo plazo)	Tolerancia a la salinidad (corto y largo plazo)
líneas	MSR (a)	MST (b)	Daño membranas (Blum) (c)	TREP (d)	a+b-c	a+b-c+d
ACA885	1,01	1,06	1,33	1,17	0,73	1,90
SMR 769	0,82	0,99	1,51	1,12	0,31	1,42
SMR 779 CL	1,18	1,13	0,47	0,84	1,83	2,67
TRITÓN MAX	0,99	0,82	0,68	0,88	1,13	2,01

Las siguientes variables fueron medidas 44 días luego de haber alcanzado el nivel de salinidad final, MST: materia seca total, MSR: materia seca radical, Daño de membranas: determinado según el método de Blum y Ebercom (1981), mientras que la elongación (TREP) fue medida en el intervalo comprendido entre los primeros 20 días de aplicado el tratamiento salino. Las mediciones de cada planta estresada fueron transformadas en cocientes respecto a la media de las plantas controles, dividiendo cada una de ellas por el valor promedio de dicha variable del tratamiento control. Para determinar si una variable, en un genotipo dado, fue afectada por encima o por debajo del promedio de los genotipos, cada cociente de un genotipo determinado, obtenido como se dijo anteriormente, fue dividido por el valor promedio general para todos los genotipos. Los cocientes obtenidos para cada variable fueron entonces sumados para obtener el ranking general, exceptuando la variable “porcentaje de hojas muertas” que fue utilizada con signo negativo. Los mayores valores fueron para las líneas más tolerantes, y los menores para las más sensibles.

DISCUSIÓN

Variabilidad de tolerancia a salinidad en líneas endocriadas e híbridos de girasol

La tolerancia de las plantas a salinidad es un fenómeno complejo (Shahbaz *et al.*, 2011) que depende de numerosos factores interrelacionados (Greenway y Munns, 1980; Dash y Panda, 2001; Ashraf, 2002; Ashraf *et al.*, 2010). Generalmente, las plantas expuestas al estrés salino experimentan cambios en una multitud de procesos metabólicos (Hurkman 1992; Duan *et al.*, 2008). Los mecanismos de tolerancia a salinidad se pueden agrupar en tres tipos (Munns y Tester, 2008). El primero implica la tolerancia al estrés osmótico. El segundo implica la exclusión de Na⁺ de las láminas foliares. El tercero es la tolerancia tisular, es decir, la tolerancia de los tejidos a la acumulación de iones potencialmente tóxicos. Por lo anterior, en este trabajo se estudiaron los mecanismos de tolerancia a salinidad a corto y largo plazo y además se correlacionaron las concentraciones foliares de Na⁺ (segundo mecanismo de tolerancia a la salinidad) con la relación a la tolerancia al estrés osmótico y con la tolerancia a exposiciones prolongadas a la salinidad (tolerancia a largo plazo).

Respuestas iniciales al estrés salino en genotipos de girasol: estrés osmótico inducido por salinidad

La salinidad reduce la capacidad de las plantas de absorber agua, y esto causa rápidamente una disminución en las tasas de crecimiento. Los efectos de la toxicidad por Na⁺ se expresan en etapas más avanzadas de la exposición a la salinidad (Munns, 2002). Tanto los efectos iniciales, como los de largo plazo y los mecanismos subyacentes de tolerancia a salinidad como la acumulación del Na⁺ y su toxicidad en hoja, se discuten, más ampliamente a continuación.

Las respuestas de las plantas al estrés salino e hídrico tienen mucho en común (Munns, 2002). Los efectos osmóticos de la salinidad pueden ser observados inmediatamente luego de exposición a este estrés y se cree que continúan en etapas posteriores (Flowers *et al.*, 1983; Yeo *et al.*, 1991; Passioura y Munns, 2000; Fricke, 2002; Munns, 2002; Munns y Tester, 2008). Las tasas relativas de elongación son variables que denotan la sensibilidad o tolerancia de las plantas a la imposición de estrés osmótico. En las Tablas 2.5 y 2.9, los genotipos estudiados disminuyeron sus TREP por salinidad, en diferentes intensidades. Así HA124 y HAR2 dentro de las líneas y ACA885 y SMR769 dentro de los híbridos, fueron los genotipos más tolerantes al estrés osmótico (Tablas 2.5 y 2.9, respectivamente), mientras que en otros, las tasas cayeron a la mitad, como se observó en el presente trabajo en el híbrido TRITÓN MÁX. La tolerancia al estrés osmótico involucra la capacidad de las plantas de tolerar el déficit hídrico. Esta capacidad implica que las plantas puedan mantener el crecimiento, la expansión foliar y la conductancia estomática. Rajendran *et al.* (2009), encontraron en genotipos de trigo variabilidad para la tolerancia al estrés osmótico impuesto por la salinidad. Utilizando 75 mM de NaCl (casi la mitad de la utilizada en el presente trabajo) se encontró que la mayoría de las líneas estudiadas presentaron una gran reducción en el crecimiento de las plantas en los primeros 7 días de haber sido impuesto el estrés. Esta reducción inicial en el crecimiento puede ser atribuido principalmente al estrés osmótico y es independiente de la acumulación de Na⁺ en los tejidos aéreos (Munns y Tester, 2008). En el presente trabajo de tesis, las diferentes tolerancias al estrés osmótico primario no estuvieron correlacionadas con la inclusión foliar de Na⁺ en las hojas. Así se corrobora la hipótesis b1 (presentada en el capítulo I) donde se afirmó que la tolerancia a los efectos tempranos de la salinidad será independiente de la acumulación foliar de Na⁺. Esto quedó corroborado tanto en los híbridos como en las líneas estudiadas. Así pudo determinarse que dentro de las líneas más tolerantes al estrés osmótico primario, se encontraban genotipos con poca inclusión foliar de Na⁺ (HAR2) como genotipos netamente incluyentes (HA64). Esto pudo verse en la tabla 2.8 donde los cocientes de alteración promedio para las TREP en estas líneas fueron de 1,16 y 1,05 respectivamente (Tabla 2.8). Lo mismo ocurrió con las líneas menos tolerantes al estrés osmótico primario, donde HAR5 que fue la menos tolerante, obtuvo un valor en el ranking de tolerancia de 0,9 y HAR 1 obtuvo el mismo valor (Tabla 2.8) y ambos son muy contrastantes en inclusión foliar de Na⁺ (Figura 2.1 B). Para el caso de los

híbridos, los más tolerantes fueron SMR 779 CL y TM, siendo el primero poco incluyente y el segundo netamente incluyente foliar de Na^+ (Tabla 2.11).

Las limitantes mecánicas e hidráulicas del crecimiento foliar en salinidad fueron analizadas por Fricke (2002), quien destacó el rol del suministro de solutos a la zona en expansión en cereales para el mantenimiento del crecimiento y sugiere limitaciones por destino, más que por fuente, a la expansión foliar. Muchos estudios han explicado las diferencias en las tasas de crecimiento de las plantas a través de cambios en las propiedades mecánicas de las paredes celulares, el umbral de estiramiento y la extensibilidad de las mismas (Cramer y Bowman, 1991; Barlow, 1986; Cosgrove, 1993, 1998; Hsiao y Xu, 2000). Sin embargo, algunas investigaciones (Boyer, 1974; Boyer *et al.*, 1985; Nonami *et al.*, 1997) han resaltado que el crecimiento puede estar limitado por las propiedades hidráulicas de los tejidos. Otros trabajos agregan además que la disponibilidad o el suministro de solutos hacia las células en expansión es co-limitante con el crecimiento, particularmente durante el estrés hídrico (Frensch, 1997; Hsiao *et al.*, 1998) o salino (Fricke y Peters, 2002). El movimiento de agua se puede dar por vía apoplástica o simplástica-transcelular; la conductividad hidráulica de la vía apoplástica suele ser 100 veces mayor que la vía simplástica (Steudle y Peterson, 1998). Boyer (1974) concluyó que en hojas de girasol el agua se mueve durante la transpiración (gradiente hidrostático) a través del apoplasto, mientras que durante el crecimiento (gradiente osmótico) el movimiento se realiza a través de la vía simplástica/transcelular ('protoplásmica'). La distinción entre diferentes vías por las cuales se mueve el agua no refleja una discriminación entre varias fuentes de agua a nivel celular: el agua se equilibra rápidamente a través de las membranas de células de plantas superiores (Steudle, 1993), y los protoplastos se encuentran en equilibrio con el potencial hídrico (ψ) del apoplasto. Análogamente a la ley de Ohms, la tasa de crecimiento relativo de las células o de un tejido es igual al producto entre la conductividad hidráulica y al gradiente de potencial hídrico entre la célula y el medio que la rodea (Fricke, 2002). Esto implica que las células pueden crecer a tasas invariables a pesar de la generación de gradientes de potenciales hídricos menores y la acumulación de menos solutos, simplemente incrementando la conductancia hidráulica del tejido (Fricke, 2002). A partir de las determinaciones de las tasas relativas de

elongación de plantas (TREPs), tanto para las líneas endocriadas como para los genotipos híbridos pudo observarse que la disminución del potencial hídrico del agua en el suelo (estrés osmótico provocado por las sales) hiciera que el gradiente de potencial hídrico entre la solución del suelo y las plantas fuera menor y así determinara menores TREPs, especialmente en HA370, HAR1, HA821, HAR3, HAR4 y HAR5 entre las líneas y en SMR779 CL y TRITÓN MAX, entre los híbridos. Queda abierta la posibilidad de realizar estudios posteriores en cuanto a las propiedades de las paredes celulares de los tejidos en crecimiento, especialmente los estudios concernientes a la extensibilidad de las paredes, que permitirían con una mayor extensibilidad, morigerar los efectos negativos del estrés osmótico, que normalmente determina una menor presión de turgencia en las células en crecimiento.

El contenido relativo de agua (CRA) en condiciones de salinidad varió entre 85-90 %, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre las 4 líneas en condiciones salinas (Tabla 2.3.). Por otro lado, en los cuatro híbridos estudiados, el CRA en salinidad estuvo dentro del rango de 70-78 %, mostrando valores un poco inferiores a los de las líneas en las mismas condiciones, pero sin que hubiera, nuevamente diferencias entre híbridos. Shahbaz *et al.* (2011), trabajando con 8 cultivares de girasol y con una salinidad un poco superior a la utilizada en este trabajo (150 mM NaCl), encontraron que no hubo efecto significativo del estrés salino sobre el CRA en todos los genotipos de girasol estudiados. Sin embargo, los materiales se diferenciaron estadísticamente en esta variable, y el CRA fue mayor en el cultivar Alstar-Rm, Mehran-II y Hysum-38 bajo condiciones control y salinas (Shahbaz *et al.*, 2011). Es decir hubo variaciones absolutas en el CRA pero por efecto propio del genotipo que tuvo mayores valores de CRA en condiciones control lo que no significa que mantuvieron elevados CRA en sal, comparados con las otras 5 líneas. Los valores encontrados por esos autores fueron significativamente menores a los encontrados por nosotros, con valores en las 8 líneas y en ambas condiciones que variaron entre 60 y 70 % de CRA. La capacidad de realizar ajuste osmótico de los diferentes materiales, o el umbral de presión de turgencia a partir del cual se logra un buen estado hídrico de cada genotipo, la capacidad de generar solutos osmocompatibles, pueden ser algunas de las razones por las cuales los materiales presentaron diferentes respuestas

frente a estrés salino. Es decir, las características intrínsecas en cuanto a la regulación del estado hídrico de cada genotipo (variabilidad intraespecífica) podría ser la causa por la que se observaron diferencias entre los distintos materiales utilizados, tanto por nosotros como por Shahbaz *et al.* (2011).

En general, a CRA similares, es de esperar que aquél genotipo que posea menor potencial osmótico sea que el que realice ajuste osmótico (Babu *et al.*, 1999). En este sentido, ACA 885 modificó poco los valores de CRA y potencial osmótico (PO) frente a salinidad, manteniendo el estado hídrico en sus hoja aún en condiciones salinas. Pero no se encontró que algún genotipo haya realizado ajuste osmótico ya que aquél que bajo su PO en salinidad (TRITON MAX) no mantuvo su nivel de CRA, y aquél que mantuvo su nivel de CRA en salinidad comparado con las condiciones controles (ACA885) no bajó sustancialmente el PO.

Por último, tampoco pudo observarse una correlación entre acumulación foliar de Na^+ y mantenimiento de las relaciones hídricas, específicamente, mantenimiento de CRA relativamente elevados. Por el lado de las líneas, en la tabla 2.6 ya se mostró que los valores de CRA fueron similares en los cuatro genotipos en condiciones control (Tabla 2.6), mientras que en salinidad, ocurrió todo lo contrario a lo esperado, donde los genotipos excluyentes (HAR2 y HAR5) fueron vistos disminuidos sus CRA en mayor magnitud que HAR1 y HA64 bajo salinidad. Y, por el lado de los híbridos, como se mencionó, pudo determinarse que el genotipo excluyente pero que tuvo mucho daño de membrana (Figura 2.7 A y Tabla 2.10) fue el único que mantuvo su CRA en condiciones salinas. Por el otro lado, el híbrido SMR 779 CL que también es poco incluyente foliar de Na^+ (Figura 2.5 A) vio severamente afectado su estado hídrico, disminuyendo su CRA de 0,89 en condiciones control a 0,74 bajo salinidad (Tabla 2.10).

Cambios en la acumulación de materia seca y su distribución en respuesta a exposiciones prolongadas a la salinidad

La salinidad disminuyó la acumulación de biomasa en todos los genotipos estudiados y adelantó el desarrollo (Figura 2.3 y 2.9). La proporción de raíces tendió a disminuir por efecto de la salinidad (Figuras 2.3 B y 2.9 B). A pesar de ello, algunos genotipos como HAR1 entre las líneas endocriadas y SMR779CL y TRITÓN MAX (entre los híbridos comerciales estudiados), tendieron a aumentar la contribución de materia seca de raíces sobre el total de materia seca acumulada en salinidad. Siguiendo la exposición a salinidad, la relación raíz/vástago se incrementó debido a una rápida inhibición del crecimiento de vástagos mientras que el crecimiento radical fue mantenido tal como observaron Albacete *et al.*, 2008 en tomate. Esos autores sugieren que tales alteraciones pudieron estar reguladas por cambios en las concentraciones hormonales de las plantas.

Se ha hipotetizado que la inhibición del crecimiento foliar por salinidad estaría regulada por hormonas y sus precursores, en situaciones de estrés salino, debido a que la reducida tasa de crecimiento foliar es independiente del suministro de carbohidratos, estado hídrico, deficiencia nutricional y toxicidad iónica (Munns y Tester, 2008). La plasticidad integrada en el desarrollo de la planta involucra, probablemente, una comunicación de larga distancia entre diferentes órganos, con las hormonas jugando un rol fundamental (Sachs, 2005; Hartig y Beck, 2006). Aunque la salinidad incrementa la concentración de ABA en todos los compartimentos de la planta (Wolf *et al.*, 1990; Kefu *et al.*, 1991), su rol en la regulación del crecimiento ha sido equívoco ya que diferentes estudios han sugerido que podría inhibir (Dodd y Davis, 1996) o mantener el crecimiento mediante la restricción de la evolución del etileno, otro potencial inhibidor del crecimiento (Sharp y LeNoble, 2002). En nuestro caso, la inhibición o no del crecimiento pudo determinarse mediante la cuantificación de las mermas en la materia seca por salinidad y en los cambios en la partición de la materia seca por este estrés (Figuras 2.3 y 2.9). Además, a partir de estas variables y de otras como lo fueron las TREP (que determinan la tolerancia a la salinidad frente al estrés primario de la misma) y teniendo en cuenta el nivel de daño en los tejidos (por determinación de cantidad de tejido foliar muerto o por daño en

membranas, Figuras 2.4 y 2.7 A) se estableció el ranking de tolerancia en líneas y en híbridos (Tablas 2.8 y 2.11). Como ya se dijo, no pudo determinarse una correlación entre tolerancia a largo plazo y concentración foliar de Na^+ . Con esto se refuta la hipótesis donde se planteaba una correlación entre la acumulación foliar de Na^+ y los efectos tardíos de la salinidad sobre el crecimiento (o lo que es lo mismo, que habrá correlación entre inclusión foliar de Na^+ y tolerancia), es decir que a mayor cantidad foliar de Na^+ debería haberse dado una menor tolerancia a largo plazo. La existencia de genotipos como HAR5 y ACA 885 que fueron los menos tolerantes en el ranking y que a su vez son, dentro del grupo de genotipos estudiados, poco incluyentes foliares de Na^+ , derriba esta hipótesis (b1 del Capítulo I).

Efectos de la salinidad sobre la estabilidad de membranas

El daño de membranas por estrés puede ser estimado a través de mediciones de pérdida de electrolitos desde las células (Blum y Ebercom, 1981). Las membranas celulares son unos de los primeros blancos de muchos estreses en vegetales y está generalmente aceptado que bajo condiciones de estrés hídrico, la estabilidad de membranas es uno de los componentes más importante de la tolerancia a la sequía en plantas (Bajji *et al.*, 2001). Bajo condiciones de salinidad, el crecimiento de las plantas es adversamente afectado de diversas maneras y la mayor influencia de la sal es sobre la función de las proteínas y las membranas celulares (Luttge, 1993). El daño de membranas inducido por el estrés salino en diferentes especies vegetales está correlacionado con el aumento en la producción de EROS (especies reactivas del Oxígeno) (Sairam *et al.*, 2005). Estas especies reactivas del Oxígeno producidas durante el estrés salino pueden causar daños en las membranas y otras macromoléculas como los pigmentos fotosintéticos, proteínas, ADN y lípidos (Gueta-Dahan *et al.*, 2007; Fahmy *et al.*, 1998; Hernandez *et al.*, 2000). Uno de los efectos predominantes de la salinidad es la peroxidación de lípidos y la pérdida de la integridad de las membranas debido a las EROS antes mencionadas (Hernandez *et al.*, 2000; Sairam *et al.*, 2002; Ashraf *et al.*, 2008). El nivel de daños de membranas puede ser fácilmente estimado a través de mediciones de pérdida de electrolitos por parte de las células (Bajji *et al.*, 2001).

En este trabajo se encontró variabilidad en daños de membrana producidos por salinidad en los genotipos híbridos estudiados (Figura 7 A). Los niveles de daño de membrana no correlacionaron con los niveles foliares de Na^+ (Figuras 7 B). Se encontraron niveles elevados en este parámetro tanto en híbridos con elevadas concentraciones de Na^+ como en aquellos con bajos niveles foliares de este ion (Figura 7 B).

El índice de Flint fue utilizado en este trabajo como un indicador del daño producido por la salinidad en las membranas celulares y su estabilidad. En este trabajo se encontró variabilidad para este parámetro, encontrándose híbridos con valores tan bajos como 5 (SMR779CL) y otros híbridos con valores tan altos como 35 (50 A 0) para el índice de Flint. Siguiendo con el caso de estudio de Shahbaz *et al.* (2011) donde se utilizó la metodología de daño de membranas desarrollada por Yang *et al.* (1996) se encontró que el estrés salino no afectó el daño de membranas en 8 híbridos de girasol estudiados. Además, las respuestas de todos los cultivares de girasol al estrés salino permaneció inalterada bajo condiciones de salinidad, con valores que sólo variaron entre 20 y 30 % de daño para todos los genotipos y tratamientos estudiados por Shahbaz *et al.* (2011). Por el contrario, en nuestros trabajos pudimos determinar diferentes respuestas en daño de membranas por salinidad según el genotipo analizado. Los menores valores de daño de membranas se encontraron en los híbridos 65A40 y DK4045 (7,53 y 3,92, respectivamente). Este último fue el que menor daño de membranas presentó. Estos bajos valores de daño de membrana en estos híbridos se dieron con concentraciones foliares de Na^+ de moderadas a elevadas, con disminuciones no significativas en las concentraciones de K^+ y con relaciones K^+/Na^+ , que aumentaron por efecto de la salinidad, pero no significativamente (0,055 vs. 0,1623 y 0,0206 vs. 0,202, respectivamente).

Muerte de hojas y acumulación foliar de Na⁺

La proporción de hojas muertas fue una de las variables utilizadas para clasificar las líneas según su tolerancia a la salinidad (Figura 2.4). La senescencia foliar es una respuesta común de las plantas expuestas a salinidad y se encuentra frecuentemente asociada a elevados niveles de Na⁺ en los tejidos (Munns y Tester, 2008). Pudo verse claramente que el genotipo HAR2 fue el que menos porcentaje de hojas muertas presentó (Figura 2.4), mientras que HAR1 tuvo una proporción similar de hojas muertas que en HAR5 y HA64, pero con una concentración foliar de Na⁺ mucho mayor (Figura 2.1. B), sugiriendo que esta línea tuvo una mayor tolerancia tisular al Na⁺. Entre los materiales híbridos, hubo genotipos que presentaron altas concentraciones foliares de Na⁺ con bajos niveles de daño de membrana, como lo fue el genotipo TRITÓN MAX y DK 4045 (Figura 7 B), evidenciando tolerancia tisular al Na⁺ como HAR1. Esta información puede ayudar a interpretar el por qué la exclusión foliar de Na⁺ no puede predecir la tolerancia a la salinidad en girasol. El “índice de tolerancia tisular al Na⁺” elaborado por Rajendram *et al.* (2009), basado en el producto entre el cociente la senescencia foliar y el área foliar total por la concentración tisular de Na⁺, no provee información adicional sobre esta cuestión. Esto indica muy baja tolerancia tisular al Na⁺ en HAR2, simplemente por su baja concentración foliar de Na⁺.

HAR2 fue el genotipo más tolerante, y a su vez fue el que menos cantidad de Na⁺ acumuló en hojas de las 11 líneas estudiadas (Figura 2.1 B). A corto plazo, fue el genotipo que mayor mantuvo sus TREPes en condiciones de salinidad (Tabla 2.5.) presentando por lo tanto, los tres mecanismos mencionados por Rajendram *et al.* (2009). El genotipo menos tolerante fue HAR 5 (Tabla 2.5 para TREPes y 2.8 para ranking general de tolerancia a corto y largo plazo). Este genotipo también fue uno de los que menos Na⁺ acumuló en hoja (Figura 2.1. B). Por otro lado, disminuyó en forma significativa sus TREPes en salinidad. Por lo anteriormente dicho se concluye que no hubo una correlación absoluta entre acumulación foliar de Na⁺ y tolerancia a la salinidad en sus tres mecanismos existentes

reconocidos hasta el momento (Rajendran *et al.*, 2009). La razón por la cual no hubo asociación entre acumulación foliar de Na^+ y tolerancia a la salinidad puede residir en que no solamente existe tolerancia osmótica o exclusión foliar de Na^+ como mecanismo de tolerancia, sino también que existen diversos grados o niveles de tolerancia tisular al Na^+ .

La exclusión relativa de Na^+ determina generalmente una relación K^+/Na^+ tisular relativamente mayor como se indicó para los híbridos en la Figura 2.6). Obsérvese que en esta figura, los híbridos de la izquierda que son los que menos Na^+ acumularon (figura 2.5 A) son lo que presentaron, por lo general, los mayores ratios K^+/Na^+ . Lo anterior ha sido sugerido como mecanismo de tolerancia a la salinidad en girasol (Di Caterina *et al.*, 2007). El cociente tiende, obviamente, a decrecer en condiciones salinas (Di Caterina *et al.*, 2007) (en la Figura 2.6 solo se ilustran los cocientes para los promedios de las plantas tratadas), pero estos valores no pueden inequívocamente estar asociados a la tolerancia a la salinidad, como puede ser deducido a partir de los datos reportados por Shahbaz *et al.* (2011).

A diferencia de nuestros resultados, todas las líneas estudiadas por Shahbaz acumularon elevados contenidos de Na^+ en hojas, con valores en el rango de 20 a 50 mg de Na^+ por gramo de peso seco. Llevando esos valores a las unidades utilizadas en este trabajo, estas líneas tuvieron concentraciones foliares de Na^+ entre 342 y 855 $\mu\text{mol}/\text{gramo}$ de peso seco. Esos valores superan al híbrido más incluyente en nuestros estudios (alrededor de 450 $\mu\text{mol}/\text{gPS}$ en la línea HA821 y el híbrido 50 A 0, Figuras 2.1 B y 2.5 A, respectivamente). De aquí se desprende que, a diferencia de otros trabajos, aquí pudimos encontrar mayor variabilidad en cuanto a acumulación foliar de Na^+ , así como daños de membranas por estrés salino. En los estudios reportados por Shahbaz *et al.* (2011) no se evaluó la relación entre daños de membrana y acumulación foliar de Na^+ , lo que hace aún más interesantes nuestros resultados y que se expresaron en la Figura 7 B. La existencia de híbridos que presentaron bajos contenidos foliares de Na^+ y elevados valores de daño de membranas podrían relacionarse con una baja tolerancia al Na^+ tisular, es decir, la ausencia del tercer mecanismo de tolerancia a la salinidad descrito por Munns y Tester (2008), a la

presencia de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) o a la incapacidad del genotipo para mantener un metabolismo protector del daño por toxicidad del Na^+ .

La compartimentalización del Na^+ dentro de vacuolas es un mecanismo general para evitar la toxicidad del Na^+ (Flowers y Läuchli, 1983), e involucra un costo metabólico elevado en los mecanismos de transporte de membranas y un balance osmótico intracelular provisto por la generación de solutos orgánicos (Tester y Davenport, 2003). La compartimentalización del Na^+ es una estrategia importante para evitar los efectos tóxicos del Na^+ y para ayudar a la realización de ajuste osmótico por parte de las plantas. Los mecanismos moleculares por los que las células excluyen Na^+ de su citosol están bastante bien dilucidados, además de ser el propio Na^+ un marcador químico que indica a las plantas la presencia de estrés salino (Zhu, 2003). Dentro de las células, el flujo de Na^+ hacia la vacuola puede ser mediado por transportadores de membrana como los de la familia de antiporters Na^+/H^+ SOS, descritos en detalle para *Arabidopsis thaliana* (Shi *et al.*, 2000), mientras que los antiporters NHX (Gaxiola *et al.*, 2002) participarían en la compartimentalización en la vacuola. En *Arabidopsis*, la familia de antiporters de Na^+/H^+ AtNHX son los encargados de la compartimentalización del Na^+ en vacuolas (Blumwald, 2000). Nada de esto ha sido investigado en girasol y podría proveer la clave para las diferentes concentraciones de Na^+ y K^+ registradas en las hojas de las líneas e híbridos estudiados, específicamente, algunos de estos mecanismos podrían ser los responsables del mantenimiento de bajos niveles de Na^+ en hoja como en HAR2. Los gradientes de protones generados por las H^+ pirofosfatasas y por las H^+ ATPasas contribuyen a mantener el gradiente de potencial membrana que son necesarios para el funcionamiento de los antiporters y su actividad ha sido reportada de ser estimulada por salinidad en girasol (Ballesteros *et al.*, 1995, 1997).

Elevadas concentraciones de Na^+ pueden ser observadas en vainas de plantas de trigo que presentan los genes de la familia Nax_1 , los cuales acumulan Na^+ en vaina, haciendo de barrera para evitar que la lámina, que es la parte de la hoja más activa en cuanto a fotosíntesis, no presente daños por fitotoxicidad por elevadas acumulaciones de

Na^+ (James *et al.*, 2006). El antiporter de plasmalema Na^+/K^+ SOS1 (Salt Overly Sensitive) es un posible sensor del Na^+ (Shi, 2000). La proteína SOS1 tiene de 10 a 12 dominios transmembrana y una larga cola (de más de 700 aminoácidos), la cual se supone que existe en el citoplasma (Shi, 2000). Así, SOS1 tiene una actividad intercambiadora Na^+/H^+ , y esta actividad transportadora es esencial para el eflujo de Na^+ desde las células de *Arabidopsis thaliana* (Qiu *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002). Sin embargo, la inusual cola citoplasmática de SOS1 sugiere que esta proteína puede ser no solamente un transportador de Na^+ , sino también un sensor de este ion. Muchos transportadores con largas colas citoplasmáticas o “loops” han sido demostrados como sensores (Zhu, 2003). El Na^+ entra a las células de las plantas a través de transportadores de K^+ de alta afinidad, denominados HKT1 (Rus *et al.*, 2001; Máser *et al.*, 2002) y a través de canales catiónicos no selectivos (Amtmann y Sanders, 1999). Estos canales no selectivos son parcialmente sensibles al Ca^{++} , esto correlaciona con la inhibición en la entrada de Na^+ dentro de las raíces por el Ca^{++} (Tester y Davenport, 2003). En girasol, los estudios a escala molecular son escasos. En un nivel a mayor escala y en relación al transporte de Na^+ , Benlloch *et al.* (1994) han reportado que la falta de K^+ puede incrementar la susceptibilidad de las plantas al estrés salino en girasol y en plantas de poroto, debido a que la raíz mostró una menor capacidad de discriminar entre el Na^+ y el K^+ , y esto contribuyó a una mayor acumulación de Na^+ en la parte de vástagos. También, Quintero *et al.* (2008), reportaron que las plantas con bajas concentraciones de K^+ incrementaron el flujo de agua al aplicárseles un estrés por calor. El aumento de la temperatura incrementó la absorción de Na^+ en plantas con contenidos bajos como con concentraciones normales de K^+ . Sin embargo, fue observado un efecto diferencial entre ambos tipos de plantas: mientras que en las plantas con deficiencia de K^+ la mayor demanda atmosférica favoreció la acumulación de Na^+ en las raíces de girasol del cultivar Sun-Gro 380, en las plantas con contenidos normales de K^+ , no hubo un efecto en la acumulación mayor de Na^+ por la mayor demanda evaporativa (Quintero *et al.*, 2008).

No sólo la acumulación foliar de Na^+ sino también que otros mecanismos pueden contribuir a los efectos diferenciales de los tratamientos salinos sobre la senescencia foliar. La aparición de este síntoma de senescencia puede estar vinculado al estrés hídrico que impone la salinidad, a la producción de especies reactivas del oxígeno (Hernández *et al.*,

1995), su control diferencial (Shalata y Tal, 1998), y a cambios hormonales, como lo discutieron Pérez-Alfocea *et al.* (2010). Tampoco debería descartarse la toxicidad provocada por el anion Cl^- , aspecto para el cual no existen estudios realizados sobre girasol.

En general, los híbridos que tuvieron bajas concentraciones de Na^+ en condiciones salinas, pudieron mantener elevados valores del ratio K^+/Na^+ (Figuras 2.5 A y 2.8). Para el caso de las líneas, los datos son menos consistentes (para mayor información, véase Anexo, figura A.45). La importante disminución del contenido de K^+ por efecto de la salinidad, sin alteración significativa de la relación K^+/Na^+ ni valores muy elevados de Na^+ tisular, parecería ser un factor determinante en la ocurrencia de elevados niveles de daño en membranas en plantas de girasol (Quintero *et al.*, 2007). En el presente trabajo no hubo correlación entre daño de membranas y concentración foliar de Na^+ , encontrándose genotipos con bajo y alto daño de membranas en ambos grupos (Figuras 2.7. A y B).

Se encontró tolerancia tisular a la salinidad y acumulación foliar de Na^+ , como en HAR1 donde, a pesar de contener elevadas concentraciones de Na^+ en hoja, pudo mantener relativamente bajos niveles de muerte de hojas por fitotoxicidad (Figura 5). Quintero *et al.* (2007) trabajando con plantas de girasol del genotipo Sungro 380 de Eurosemillas S.A. (Córdoba, España), encontraron que plantas con bajo contenido de K^+ fueron sensibles a la salinidad disminuyendo estadísticamente su peso seco, tanto de raíces como de vástagos. Las plantas con elevados contenidos de K^+ pudieron mantener mayores alturas. Además, las plantas con bajos contenidos de K^+ absorbieron mayores contenidos de Na^+ que plantas que tuvieron elevadas concentraciones de K^+ en sus tejidos por un elevado suministro artificial del mismo (2,5 mM de KCl durante 15 días de experimento) (Quinteros *et al.*, 2007).

Como ya se mencionó, se pudieron identificar genotipos que presentaron muy bajas concentraciones de Na^+ , tanto en distintas partes de la planta (Figura 1 A) como en láminas

foliares (Figuras 1 B y 5 A). Fisiológicamente, son varios los mecanismos que pueden haber provocado que estos genotipos mantuvieran bajas concentraciones de Na^+ en los tejidos. La exclusión del Na^+ de las células es catalizada por un antiporter de Na^+/H^+ de membrana, codificado por el gen SOS1. SOS1 sólo se activa en plantas estresadas (Qiu *et al.*, 2002). SOS1 tiene muchos roles: está encargado del eflujo o salida de Na^+ hacia el medio radical; segundo, gana tiempo para el almacenamiento de Na^+ en la vacuola bajando la acumulación de Na^+ en el citoplasma; y tercero, controlando el transporte de Na^+ a larga distancia entre las raíces y las hojas, cargando Na^+ dentro de células menos importantes a nivel metabólico y fotosintético (como células parenquimatosas de xilema) y descargando Na^+ del xilema y del floema. El rol de SOS1 en el transporte a larga distancia es importante para la coordinación entre el flujo transpiratorio de Na^+ y el secuestro vacuolar de Na^+ en las hojas. La expresión incrementada de SOS1 resulta en una tolerancia mejorada a la salinidad en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* (Shi *et al.*, 2003).

Con respecto al K^+ , los niveles en general, decrecieron y se observaron diferentes relaciones K^+/Na^+ (Figura 1 C, 5 B y 6). Una elevada relación citosólica K^+/Na^+ es importante para el mantenimiento del metabolismo celular y bajo estrés salino, el Na^+ compite con el K^+ en la absorción en las raíces. Los niveles de transcriptos de muchos genes de transportadores de K^+ son tanto aumentados como disminuidos por el estrés salino, reflejando probablemente las diferentes capacidades de las plantas de mantener la absorción de K^+ bajo estrés salino. En este trabajo hubo variabilidad intraespecífica para el mantenimiento de los valores de K^+ en condiciones salinas, comparándolos con condiciones no estresantes. El estrés salino incrementa los niveles de transcriptos de genes que codifican los transportadores de K^+ en raíces de *Arabidopsis thaliana* *AtKC1* (Pilot *et al.*, 2003). A partir de los estudios realizados en los diferentes experimentos, queda la posibilidad de continuar los estudios y evaluar como varían los niveles de algunos transcriptos como los mencionados anteriormente, en los genotipos que se estudiaron en cuanto a acumulación y concentraciones de Na^+ y K^+ .

En HA89, HAR3 (Figura 1 c), DK4065, SMR769, DK3810, DK3820 y DK3940 (Figura 5 B) la concentración de K^+ aumentó por efecto de la salinidad. A pesar de esto, solo en algunos genotipos (NTO2.0, NEON y SMR779CL) la relación K^+/Na^+ varió, según el genotipo, por salinidad (Figura 6 para los híbridos y A.45 del Anexo para las líneas). La homeostasis de la concentración intracelular de iones es fundamental para la fisiología de las células vivas (Zhu, 2003). Una apropiada regulación del flujo de iones es necesaria para las células, para mantener las concentraciones de iones tóxicos en niveles bajos y para acumular iones esenciales (Zhu, 2003). Las células de las plantas emplean un transporte activo primario, mediado por H^+ -ATPasas, y un transporte secundario, mediado por canales y co-transportadores, para mantener característicamente elevadas concentraciones de K^+ y bajas concentraciones de Na^+ en el citosol. La homeostasis intracelular del Na^+ y del K^+ es importante para las actividades de muchas enzimas citosólicas, y para el mantenimiento del potencial membrana y de un potencial osmótico adecuado para la regulación del volumen celular, de aquí la vital importancia del mantenimiento de una correcta regulación de los flujos de Na^+ y una adecuada relación K^+/Na^+ en condiciones de estrés salino (Zhu, 2003). Otros trabajos en girasol han reportado la importancia y el del K^+ en la tolerancia a salinidad en esta especie (Akram *et al.*, 2009; Quintero *et al.*, 2008). Trabajando con el genotipo SF-187 de Monsanto, Akram *et al.* (2009) mostraron que la reducción causada por la salinidad en el crecimiento y rendimiento de las plantas de girasol, fue disminuida con la aplicación foliar de potasio más azufre y de K_2SO_4 , además de mostrar estas plantas contenidos foliares más elevados y relaciones K^+/Na^+ mayores. Quinteros *et al.*, (2007) trabajando también con plantas de girasol demostraron que plantas bien aprovisionadas de K^+ mostraban menor susceptibilidad al daño por toxicidad por Na^+ , mayor relación K^+/Na^+ y en general, una mayor tolerancia de las plantas de girasol a la salinidad.

Concluyendo esta sección, se puede aseverar que hubo variabilidad intraespecífica para acumulación foliar de Na^+ bajo salinidad, tanto en las líneas endocriadas (Figura 2.1 A) como para los 18 híbridos comerciales estudiados (Figura 2.5 A). También se encontró variabilidad para tolerancia tisular al Na^+ dentro de las líneas (Figura 2.4) y variabilidad para daño de membranas bajo salinidad para los híbridos estudiados (Figura 2.7 A). Sin

embargo, no hubo correlación entre concentración tisular de Na^+ en los híbridos y daño en membranas (Figura 2.7 B) de ahí que se seleccionaron híbridos con mucho y poco daño de membrana dentro de cada grupo de inclusión foliar de Na^+ (Tabla 2.4). Por último puede afirmarse que se confirma la hipótesis a presentada en el capítulo I donde se afirmó que existirá variabilidad intraespecífica para acumulación foliar de Na^+ en diferentes genotipos de girasol, ya sean líneas endocriadas o híbridos comerciales.

CONCLUSIONES

Se corroboró la existencia de variabilidad para acumulación foliar de Na^+ , tanto en las 11 líneas endocriadas estudiadas, como en los 18 híbridos comerciales, encontrándose genotipos con escaso, y hasta nulo, contenido de Na^+ (como ACA 885) y genotipos como que presentaron altísimas concentraciones foliares de Na^+ (HAR1).

Se pudieron determinar diferentes mecanismos de tolerancia a la salinidad. Así se pudo observar tolerancia al estrés osmótico impuesto por la sal en los genotipos HA124 y HAR2 dentro de las líneas y ACA885 y SMR769 dentro de los híbridos; estos fueron los genotipos más tolerantes al estrés osmótico. La tolerancia al estrés osmótico o las respuestas primarias a la salinidad no estuvieron correlacionadas con la acumulación foliar de Na^+ .

En cuanto al segundo mecanismo de tolerancia que implica evitar la entrada de sal dentro de los tejidos vegetales, las líneas HA124, HA89, HAR2, HAR4 y HAR5 fueron las que menos acumularon Na^+ en láminas, mientras los híbridos ACA885 (único genotipo totalmente excluyente), SMR 779 CL, NTO2.0 y NEON fueron los que menos Na^+ foliar incluyeron.

Por último, en cuanto a la tolerancia tisular al Na^+ , el genotipo HAR1 parecería ser el más tolerante ya que si bien presentó elevada muerte de hojas, es el que más Na^+ acumuló y, comparativamente, sería el más tolerante por unidad de Na^+ tisular. En cuanto a los híbridos, TRITON MAX, DK4045 y SMR 779 CL fueron los que menor daño de membrana presentaron, si bien es de destacar que SMR 779 CL es poco incluyente foliar de Na^+ mientras que TRITON MAX Y DK4045 presentaron altas concentraciones foliares de Na^+ por lo que los dos últimos presentarían cierta tolerancia a la presencia del Na^+ en los tejidos.

Los estudios realizados sobre los híbridos y las líneas en cuanto a mecanismos de tolerancia a salinidad a largo plazo, sugieren que no hubo una correlación entre exclusión foliar de Na^+ y tolerancia a los efectos tardíos de la salinidad sobre el crecimiento. Se pudo determinar un ranking de tolerancia a la salinidad teniendo en cuenta mecanismos a corto y largo plazo tanto en las líneas endocriadas como en los híbridos analizados. Por último se evaluaron los mecanismos subyacentes de tolerancia a la salinidad (acumulación de iones, tolerancia al estrés osmótico, daño en membranas por efecto de la salinidad, entre otros). A partir de lo anterior y, teniendo en cuenta que existe una correlación entre expansión foliar en girasol y rendimiento en grano (Alkio *et al.*, 2003), en el siguiente capítulo se abordará la dinámica de la expansión foliar en genotipos de girasol y sus cambios por salinidad. Adicionalmente se estudiará si la inclusión foliar de Na^+ afecta la dinámica de la expansión foliar en forma diferencial.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Agren G. I. and Franklin O. 2003. Root: shoot ratios, optimization and nitrogen productivity. *Ann. Bot.* 92: 795-800.
- Akram M.S., Ashraf M. and Akram N. A. 2009. Effectiveness of potassium sulfate in mitigating salt-induced adverse effects on different physio-biochemical attributes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Flora* 204: 471-483.
- Amtmann A. and Sanders D. 1999. Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Adv. Bot. Res.* 29:75-112.
- Apse M.P., Aharon G. S., Snedden W.A. and Blumwald E. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258.
- Ashraf M. 2002. Salt tolerance of cotton. Some new advances. *Crit. Rev. Pl. Sci.* 21: 1-30.
- Ashraf M. and Ali Q. 2008. Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Environ. Exp. Bot.* 63: 266-273.
- Ashraf M., Akram N. A., Arteca R. N. and Foolad M. R. 2010. The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. *Crit. Rev. Pl. Sci.* 29: 162-190.
- Babu R.C., Pathan M. S., Blum A. and Nguyen H.T. 1999. Comparison of measurement methods of osmotic adjustment in rice cultivars. *Crop Sci.* 39: 150-158.
- Bajji M., Kinet J. M. and Lutts S. 2001. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Pl. Growth Regulation* 00: 1-10.
- Ballesteros E., Zingarelli L., Blumwald E. and Smith E. 1995. Tonoplast Na⁺/H⁺ antiport activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Pl. Physiol.* 109: 549-556.
- Ballesteros E., Blumwald E., Donaire J.P. and Belder A. 1997. Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress. *Physiol. Pl.* 99: 328-334.
- Barlow E.W.R. 1986. Water relations of expanding leaves. *Austral. J. Pl. Physiol.* 13: 45-58.
- Benlloch M., Moreno I. and Rodríguez-Navarro A. 1989. Two modes of rubidium uptake in sunflower plants. *Pl. Physiol.* 90: 939-42.
- Blum A. and Ebercon A. 1981. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci.* 21: 43-47.
- Blumwald E., Aharon G. S. and Apse M. P. 2000. Sodium transport in plant cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 140-151.
- Boyer J. S. 1967. Leaf water potentials measured with a pressure chamber. *Pl. Physiol.* 42: 133-137.
- Boyer J. S. 1974. Water transport in plants: mechanisms of apparent changes in resistance during absorption. *Planta* 117: 187-207.
- Boyer J. S., Cavalieri A.J. and Schulze E. D. 1985. Control of the rate of cell enlargement: excision, wall relaxation, and growing-induced water potentials. *Planta* 163: 527-543.

- Brown R.W. and Oosterhuis D.M. 1992. Measuring plant and soil water potentials with thermocouple sychrometers: Some concerns. *Agron. J.* 84:78–86.
- Céccoli G., Ramos J. C., Ortega L. I., Acosta J. M. and Perreta M. G. 2011. Salinity induced anatomical and morphological changes in *Chloris gayana* Kunth roots. *Biocell* 35: 9-17.
- Cosgrove D. J. 1993. Water uptake by growing cells: an assessment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake and hydraulic conductance. *Int. J. Pl. Sci.* 154: 10-21.
- Cosgrove D. J. 1998. Cell wall loosening by expansions. *Pl. Physiol.* 118: 333-339.
- Cottee N. S., Tan D. K.Y., Bange M. P. and Cheetan J. A. 2007. Simple electrolyte leakage protocols to detect cold tolerance in cotton genotypes. WCRC-4. Australia.
- Chimenti C. A. and Hall A. J. 1993. Genetic variation and changes with ontogeny of osmotic adjustment in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* 71: 201-210.
- Chimenti C. A. and Hall A. J. 1994. Responses to water stress of apoplastic water fraction and bulk modulus of elasticity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes of contrasting capacity for osmotic adjustment. *Pl. Soil* 166: 101-107.
- Chimenti C. A., Pearson J. and Hall A. J. 2002. Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. *Field Crops Res.* 75: 235–246.
- Cramer G. R. and Bowman D. C. 1991. Kinetics of maize leaf elongation 1. Increased yield threshold limits short-term, steady-state elongation rates after exposure to salinity. *J. Exp. Bot.* 25: 1417-1426.
- Dash M. and Panda S. K. 2001. Salt stress induced changes in growth and enzyme activities in germinating *Phaseolus mungo* seeds. *Biol. Pl.* 44: 587-589.
- Davenport R. J., Munoz-Mayor A., Jha D., Essah P. A., Rus A. N. A. and Tester M. 2007. The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in *Arabidopsis*. *Pl. Cell Environ.* 30: 497–507.
- Di Caterina R., Giuliani M. M., Rotunno T., De Caro A. and Flagella Z. 2007. Influence of salt stress on seed yield and oil quality of two sunflower hybrids. *Ann. Appl. Biol.* 151: 145-154.
- Dodd I. C. and Davies W. J. 1996. The relationship between leaf growth and ABA accumulation in the grass leaf elongation zone. *Pl. Cell Environ.* 19: 1047-1056.
- Draper H.H. and Hadley M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 186: 421-431.
- Duan J., Li J., Guo S. and Kang Y. 2008. Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances short-term salinity tolerance. *J. Pl. Physiol.* 165: 1620-1635.
- Fahmy A. S., Mohamed T. M., Mohamed S. A. and Saker M. M. 1998. Effect of salt stress on antioxidant activities in cell suspension cultures of cantaloupe (*Cucumis melo*). *Egypt. J. Physiol. Sci.* 22: 315-326.
- Flint H. L., Boyce B. R. and Beattie D. J. 1967. Index of injury-a useful expression of freezing injury to plant tissues as determined by the electrolytic method. *Can. J. Pl. Sci.* 47: 229-230.
- Flowers T. J. 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55: 307-319.
- Flowers T. J. and Läuchli A. 1983. Sodium Versus Potassium: Substitution and Compartmentation. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*. Läuchli A. and Bieleski R. L. (eds.) New Series, Springer Verlag, New York, pp. 651-681.
- Frensch J. 1997. Primary responses of root and leaf elongation to water deficits in the atmosphere and soil solution. *J. Exp. Bot.* 48: 985-999.

- Fricke W. 2002. Biophysical limitation of cell elongation in cereal leaves. *Ann. Bot.* 90: 157-167.
- Fricke W. and Peters W. S. 2002. The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley: a study at the cell level. *Pl. Physiol.* 129: 374-388.
- Garnier E., Shipley B., Roumet C. and Laurent G. 2001. A standardized protocol for the determination of specific leaf area and leaf dry matter content. *Funct. Ecol.* 15: 688-695.
- Gaxiola R. A., Fink G. R. and Hirschi K. D. 2002. Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. *Pl. Physiol.* 129: 967-73.
- Ghoulam C., Foursy A. and Fares K. 2002. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 47: 39-50.
- Granier C. and Tardieu F. 1998. Spatial and temporal analyses of expansion and cell cycles in sunflower leaves. *Pl. Physiol.* 116: 991-1001.
- Greenway H. and Munns R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Annu. Rev. Pl. Physiol.* 31: 149-190.
- Guetta-Dahan Y., Yaniv Z., Zilinskas B. A. and Ben-Hayyim G. 1997. Salt and oxidative stress, similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta* 203: 460-469.
- Hancock J. G. 1972. Changes in cell membrane permeability in sunflower hypocotyls infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pl. Physiol.* 49: 358-364.
- Hartig K. and Beck E. 2006. Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Pl. Biol.* 8: 389-396.
- Hernandez J. A., Olmos E., Corpas F. J., Sevilla F. and Delrio L. A. 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea-plants. *Pl. Sci.* 105: 151-167.
- Hernandez J. A., Jimenez A., Mullineaux P. and Sevilla F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum*) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Pl. Cell Environ.* 23: 853-862.
- Hoagland D. R. and Arnon D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experimental Station, Circular 347.
- Hsiao T. C., Frensch J. and Rojas-Lara B. A. 1998. The pressure-jump technique shows maize leaf growth to be enhanced by increases in turgor only when water status is not too high. *Pl. Cell Environ.* 21: 33-42.
- Hsiao T. C. and Xu L. K. 2000. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *J. Exp. Bot.* 51: 1595-1616.
- Hu Y., Burucs Z., von Tucher S. and Schmidhalter U. 2007. Shortterm effects of drought and salinity on mineral nutrient distribution along growing leaves of maize seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 60: 268-275.
- Huang J. and Redman R. E. 1995. Responses of growth, morphology, and anatomy to salinity and calcium supply in cultivated and wild barley. *Can. J. Bot.* 73: 1859-1866.
- Hurkman W. J. 1992. Effect of salt stress on germination expression: a review. *Pl. Soil* 146: 145-151.
- InfoStat. 2009. InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba. Argentina.
- James R. A., Davenport R. J. and Munns R. 2006. Physiological Characterization of Two Genes for Na⁺ Exclusion in Durum Wheat, Nax1 and Nax2. *Pl. Physiol.* 142: 1537-1547.

- Kalaji M. H. and Pietkiewicz S. 1993. Salinity effects on plant growth and other physiological processes. *Acta Physiol. Pl.* 15: 89-124.
- Kefu Z., Munns R. and King R. W. 1991. Abscisic-acid levels in NaCl-treated barley, cotton and saltbush. *Austral. J. Pl. Physiol.* 18: 17-24.
- Luttge U. 1993. Plant cell membranes and salinity: structural, biochemical and physiological changes. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 5: 217-224.
- Maser P., Eckelman B., Vaidyanathan R., Horie T., Fairbairn D. J., Kubo M., Yamagami M., Yamaguchi K., Nishimura M. and Uozumi N. 2002. Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. *FEBS Lett* 531:157-161.
- Møller I. S. and Tester M. 2007. Salinity tolerance of *Arabidopsis*: a good model for cereals? *Trends Pl. Sci.* 12: 534– 540.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Pl. Cell Environ.* 25: 239-250.
- Munns R. and Termaat A. 1986. Whole-plant responses to salinity. *Austral. J. Pl. Physiol.* 13: 143-160.
- Munns R. and Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Pl. Biol.* 59: 651-681.
- Niklas K. J. and Enquist B. J. 2002. On the vegetative biomass partitioning of seed, plant leaves, stems and roots. *Ann. Nat.* 159: 482-497.
- Nonami H., Wu Y. and Boyer J. S. 1997. Decreased growth-induced water potential. A primary cause of growth inhibition at low water potentials. *Pl. Physiol.* 114: 501-509.
- Passioura J. B. and Munns. R. 2000. Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Austral. J. Pl. Physiol.* 27: 941-948.
- Pereyra-Irujo G. A., Velazquez L., Lechner L. and Aguirrezábal L. A. N. 2008. Genetic variability for leaf growth rate and duration under water deficit in sunflower: analysis of responses at cell, organ, and plant level. *J. Exp. Bot.* 59: 2221-2232.
- Pérez-Alfocea F., Albacete A., Ghanem M. E. and Dodd I. C. 2010. Hormonal regulation of source sink relations to maintain crop productivity under salinity: a case study of root-to-shoot signalling in tomato. *Funct. Pl. Biol.* 37: 592-603.
- Perreta M. G. y Vegetti A. C. 2005. Patrones estructurales en las plantas vasculares: una revisión. *Gayana Botánica* 62: 9-19.
- Perreta M. G. and Vegetti A.C. 2006. Structure and development of the branching system in *Melica sarmentosa*. *Feddes Repertorium* 117: 264-271.
- Pilot G., Gaymard F., Mouline K., Cheral I. and Sentenac H. 2003. Regulated expression of *Arabidopsis* shaker K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant. *Pl. Mol. Biol.* 51:773-787.
- Porter H. and Nagel O. 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Austral. J. Pl. Physiol.* 27: 595-607.
- Quintero F. J., Ohta M., Shi H., Zhu J. K. and Pardo J. M. 2002. Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9061-9066.
- Quintero J. M., Fournier J. M. and Benlloch M. 2007. Na⁺ accumulation in shoot is related to water transport in K⁺-starved sunflower plants but not in plants with a normal K⁺ status. *J. Pl. Physiol.* 164:60–7.

- Quintero J. M., Fournier J. M., Benlloch M. and Rodríguez- Navarro A. 2008. Na⁺ accumulation in root sumplast of sunflower plants exposed to moderate salinity is transpiration-dependent. *J. Pl. Physiol.* 165: 1248-1254.
- Qiu Q. S., Guo Y., Dietrich M. A., Schumaker K. S. and Zhu J. K. 2002. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 8436-8441.
- Rajendran K., Tester M. and Roy S. J. 2009. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Pl. Cell Environ.* 32: 237-249.
- Ramos J., Perreta M., Tivano J. C. y Vegetti A. C. 2004. Variaciones anatómicas en la raíz de *Pappophorum philippianum* inducidas por la salinidad. *Phyton (USA)*: 103-109.
- Ribichich K. F. y Vegetti A. C. 2001. Fusariosis de la espiga de trigo: evaluación de caracteres exomorfológicos asociados a la resistencia. *Rev. Fac. Agron. La Plata* 104: 121-127.
- Rus A., Yokoi S., Sharkhuu A., Reddy M., Lee B. H., Matsumoto T. K., Koiwa H., Zhu J. K., Bressan R. A. and Hasegawa P.M. 2001. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:14150-14155.
- Rus A., Baxter I., Muthukumar B., Gustin J., Lahner B., Yakubova E. and Salt D. E. 2006. Natural variants of AtHKT1 enhance Na⁺ accumulation in two wild populations of *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 2, 1964–1973.
- Sachs T. 2005. Auxin's role as an example of the mechanisms of shoot/root relations. *Pl. Soil* 268: 13-19.
- Sairam R. K., Rao K. V. and Srivastava G. C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long-term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Pl. Sci.* 163: 1037-1046.
- Sairam R. K., Srivastava G. C., Agarwal S. and Meena R. C. 2005. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biol. Plant.* 49: 85-91.
- Sanderson M., Stair D. and Hussey M. 1997. Physiological and morphological responses of perennial forages to stress. *Adv. Agron.* 59: 171-224.
- Schroeder Murphy S., Huang B., King R. and Smucker A. 1990. Measuret of whole plant reponses to compacted and flooded soil environments in the teaching laboratory. *J. Agron. Educ.* 19: 171- 175.
- Shahbaz M., Ashraf M., Akram N. A., Hanif A., Hamedd S., Joham S. and Rehman R. 2011. Salt-induced modulation in growth, photosynthetic capacity, proline content and ion accumulation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Acta Physiol. Plant.* 33: 1113-1122.
- Shalata A. and Tal M. 1998. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiol. Plant.* 104: 169-174.
- Sharp R. and Le Noble M. E. 2002. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J. Exp. Bot.* 53: 33-37.
- Shi H., Ishitani M., Kim C. and Zhu J. K. 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 6896-6901.
- Shi H., Quintero F. J., Pardo J. M. and Zhu J.-K. 2002. The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long distance Na⁺ transport in plants. *Pl. Cell* 14: 465–477.

- Shi H., Lee B.-H., Wu S.-J. and Zhu J.-K. 2003. Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotech.* 21, 81–85.
- Servicio de manejo de Nutrición de plantas dependiente de la FAO. Publicado en Internet, disponible en <http://plantstress.com/Articles/index.asp>.
- Slafer G. A. and Rawson H. M. 1997. Phyllochron in Wheat as Affected by Photoperiod Under Two Temperature Regimes. *Austral. J. Pl. Physiol.* 24: 151 – 158.
- Sokal R. R. and Rohlf F. J. 1971. *Biometry*. 2nd. Ed. W. H. Freeman, San Francisco.
- Steudle E. 1993. Pressure probe techniques: basic principles and application to studies of water and solute relations at the cell, tissue and organ level. En: *Water deficits: plant responses from cell to community*. Smith J. A. C. and Griffith H., (eds). Oxford: Bios Scientific Publishers Ltd, pp. 5-36.
- Steudle E. and Peterson C. A. 1998. How does water get through roots? *J. Exp. Bot.* 49: 775-788.
- Sunarpri H. T., Motoda J., Kubo M., *et al.* 2005. Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na^+ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Pl. J.* 44: 928–938.
- Tester M. and Davenport R. 2003. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91: 503-527.
- Vegetti A. C. 2002. Caracterización de los sistemas de ramificación en especies de Oryzeae (Poaceae) *Candollea* 57: 251-260.
- Wang M., Zhou Q. and Ren L. 2009. Toxicological responses in wheat *Triticum aestivum* under joint stress of chlorimuron-ethyl and copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 2121–2129.
- Wolf O., Jeschke W. D. and Hartung W. 1990. Long-distance transport of abscisic-acid in NaCl-treated intact plants of *Lupinus albus*. *J. Exp. Bot.* 41: 593-600.
- Yang G., Rhodes G. and Joly R. J. 1996. Effects of high temperature on membrane stability and chlorophyll fluorescence in glycinebetaine-deficiency and glycinebetaine-containing maize lines. *Aust. J. Pl. Physiol.* 23, 437–443.
- Yeo A. R., Lee K. S., Izard P., Boursier P. J. and Flowers T. J. 1991. Short- and long- term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 42, 881-889.
- Zhu J. K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Pl. Biol.* 6: 441-445.

CAPÍTULO III

CAMBIOS EN LA DINÁMICA DE LA EXPANSIÓN FOLIAR EN GIRASOL POR SALINIDAD Y MECANISMOS CELULARES INVOLUCRADOS

INTRODUCCIÓN

El cultivo de girasol ha sido clasificado como moderadamente tolerante a la salinidad (Andrade *et al.*, 1993; Francois, 1996), y las mermas en rendimiento en tales condiciones han sido atribuidas a la disminución en el número de aquenios por capítulo (Francois, 1996). Por otra parte, se ha informado que las restricciones en la expansión foliar afectan el número de aquenios llenos por capítulo y el peso final de los mismos (Alkio *et al.*, 2003). En girasol, la tasa de expansión foliar se reduce en respuesta a la salinidad del medio (Rawson y Munns, 1984), y se sabe que la reducción en expansión foliar es una de las primeras respuestas de las plantas ante diversos tipos de estrés (Munns y Termaat, 1986). Estos antecedentes sugieren una vinculación entre la expansión foliar y el rendimiento bajo salinidad, por lo que **en este capítulo se estudiaron algunos de los mecanismos que, intervienen en el control de la expansión foliar en girasol bajo condiciones de salinidad.**

Se ha sugerido que las modificaciones iniciales en expansión la foliar por salinidad son atribuibles mayormente a déficit hídrico (Munns, 2002). Además, los análisis de transcriptoma en diversas especies indican una alta proporción de genes inducidos en forma común por estrés hídrico, salino y por ácido abscísico (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007), apoyando la existencia de respuestas comunes a nivel molecular ante estos tipos de estrés. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los componentes osmóticos y salinos de la salinidad tienen distinto efecto a nivel de la expansión celular y los mecanismos que controlan su aflojamiento (Rodríguez *et al.*, 2004), específicamente

sobre las especies activas de oxígeno apoplásticas (Rodríguez *et al.*, 2007). Por esto, **en este capítulo se estudió la dinámica de la expansión foliar en genotipos/líneas endocriadas de girasol previamente caracterizados por su crecimiento foliar bajo déficit hídrico (Pereyra-Irujo *et al.*, 2008).**

Durante el crecimiento de una hoja interviene, coordinadamente, un patrón de división celular y diferenciación progresiva del mesófilo (Scarpella *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2007). Las tasas de divisiones celulares alcanzan sus máximos valores en estadios muy tempranos de la ontogenia de la hoja y decrece rápidamente antes que la tasa relativa de expansión foliar comience a declinar (Pantin *et al.*, 2012). Por ejemplo, antes del 10 % del área foliar final, tomando un promedio de un amplio número de especies dicotiledóneas, con una progresión basípeta del ciclo celular, es decir, una diferenciación desde el ápice hacia la base (Granier y Tardieu, 2009; Kazama *et al.*, 2010; Andriankaja *et al.*, 2012). Por otro lado, se sabe que en el crecimiento foliar intervienen dos componentes: un incremento en volumen (el crecimiento en expansión) y un incremento en materia seca (el crecimiento estructural) (Pantin *et al.*, 2012). El crecimiento de una hoja, como de cualquier órgano, depende del crecimiento irreversible en el tamaño de las células de las hojas durante su expansión, provocado por un flujo masivo de agua dentro de las vacuolas (Hsiao *et al.*, 1970; Pantin *et al.*, 2012). También, esto demanda un suministro sustancial de esqueletos carbonados para construir nuevas estructuras (por ejemplo celulosa y hemicelulosa en las nuevas paredes celulares) y productos de la fotosíntesis adicionales para sostener los variados eventos que consumen energía. Ya que el área foliar final que alcanza una hoja se encuentra determinada por la expansión y división celulares, **en este capítulo se estudiaron las modificaciones en las tasas de expansión y división celulares en hojas de girasol bajo salinidad como moduladores y determinantes de la expansión foliar y el área foliar final.**

El desarrollo foliar en girasol consiste en dos fases de crecimiento exponencial seguidas de una tercera fase de crecimiento decreciente (Dosio *et al.*, 2003). Se ha descrito que la tasa y la duración de la primera fase exponencial es común a todos los fitómeros, condiciones de crecimiento y genotipos, pero que las hojas difieren en la tasa y la duración de la segunda fase exponencial de expansión (Dosio *et al.*, 2003.) Las diferencias en área

foliar final, alcanzada bajo distintas condiciones de crecimiento, se asocian a diferentes tasas de expansión durante esta segunda fase de expansión. La dinámica de la expansión foliar en girasol fue bien estudiada por Pereyra-Irujo *et al.* (2008), siguiendo el marco conceptual desarrollado por Dosio *et al.* (2003). Tomando como base los estudios desarrollados en estrés hídrico para girasol, en este capítulo se estudió la dinámica de la expansión foliar y los cambios en diferentes variables de la dinámica de la expansión foliar (área foliar final, materia seca foliar, área foliar específica, tiempo térmico a emergencia de hojas, duración de la expansión foliar y tasas máximas de expansión foliar) por efecto del estrés salino, con el fin de poner a prueba la hipótesis “c” presentada en el capítulo I, donde se afirmó que **“los efectos de la salinidad sobre los determinantes del área foliar (división, expansión celular, tasas máximas y duración de la expansión foliar) y los cambios en parámetros estomáticos, estarán influidos diferencialmente por la acumulación foliar de Na⁺”**.

Han sido numerosos los estudios sobre expansión foliar en girasol bajo diferentes tipos de estreses. Los mismos han reportado mermas en las tasas de expansión foliar por efectos de estrés abiótico, como lo son el estrés por compactación (Andrade *et al.*, 1993), déficit hídrico (Casadebaig *et al.*, 2008), deficiencia nitrogenada (Radin y Boyer, 1982; Palmer *et al.*, 1996), salinidad (Rawson y Munns, 1984) y por estrés hídrico (Sadras *et al.*, 1993). Sin embargo, no se han abordado estudios de expansión foliar en diversos genotipos de girasol bajo estrés salino. En este capítulo además de caracterizar los cambios en expansión foliar en girasol, también se evaluaron los efectos de la salinidad sobre hojas iniciadas antes, durante y luego de haber comenzado la aplicación del tratamiento salino, para determinar cómo afecta el momento de la ontogenia de la hoja en el cual se aplica el estrés salino sobre las variables de la dinámica de la expansión foliar. Se tomó la hoja 8 como la hoja iniciada durante la imposición del estrés y las hojas 4 y 12, como las iniciadas antes y después de la imposición del estrés, respectivamente. Teniendo en cuenta el trabajo realizado por Pereyra-Irujo *et al.* (2008), el momento en el que se comienza a imponer el estrés (hídrico o salino) coincide con la hoja 8. Esta hoja es la primera hoja que esta sometida totalmente a estrés durante toda su ontogenia. Por este motivo es que se toma la hoja 8 como referencias para realizar los análisis de la dinámica de la expansión foliar.

Los estomas son los poros por donde las plantas realizan el intercambio gaseoso y la transpiración. La estirpe estomática en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. es iniciada por divisiones asimétricas de células madres meristemoides indiferenciadas, para generar células de estirpe meristemoides y células base del linaje estomático (SLGCs, por sus siglas en inglés) (Gudeblast *et al.*, 2012). Los meristemoides se diferencian tanto en células guardas madre, que se dividen simétricamente y forman el estoma, o continúan dividiéndose fuertemente para producir más SLGCs. Las SLGCs dan lugar a células pavimentosas y nuevos meristemoides satélites a través de divisiones asimétricas. Todas estas divisiones requieren el factor de transcripción básico hélix-loop-helix SPEECHLESS, donde la transición de célula meristemoide a célula guarda madre y su subsecuente división simétrica involucra los factores de transcripción cercanamente relacionados bHLHs, MUTE y FAMA. Los brasinosteroides juegan un rol fundamental en la formación de los estomas (Gudeblast *et al.*, 2012). El grupo de trabajo de Gudeblast *et al.* (2012), ha estudiado mutantes de *Arabidopsis* incapaces de sintetizar brasinosteroides y mutantes sin los receptores de los brasinosteroides, y encontraron que, en ambos mutantes, el número de estomas en los hipocótilos y el índice estomático fueron fuertemente reducido (Gudeblast *et al.*, 2012). En general, se sabe que los incrementos en temperatura disminuyen el índice estomático en hojas de *Quercus robur* L. (Beerling y Chaloner, 1993). Esto puede deberse a que las plantas se adaptan a escenarios más cálidos disminuyendo la tasa transpiratoria mediante este mecanismo (disminución en el índice estomático). Por otro lado se, sabe que una disminución en el índice estomático en frutilla, ayuda a que esta especie mejore su tolerancia a salinidad (Orsini *et al.*, 2012). Esta información no se encuentra disponible hasta la fecha para girasol y bajo condiciones de salinidad. Es por eso que **en este trabajo se evaluaron los cambios en el índice estomático en hojas de girasol sometidas a salinidad y se cuantificaron los cambios en dos genotipos contrastantes en inclusión foliar de Na⁺ para saber si esta última característica modifica las respuestas en el índice estomático de esta especie bajo salinidad.**

MATERIALES Y MÉTODOS

En la tabla 3.1 se detallan los experimentos, materiales utilizados y las variables respuestas obtenidas para el logro de este capítulo de tesis.

Tabla 3.1. Localización, condiciones de cultivo, genotipos utilizados y variables medidas en los ensayos a-f detallados en este capítulo para variables respuestas de la dinámica de la expansión foliar. I: invernadero. CC: cámara de crecimiento.

Variables respuesta		Experimentos					
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)
		11 líneas (I, Cb)	4 líneas (CC, E)	5 líneas (I, B)	18 híbridos (CC, E)	2 líneas (CC, E.)	4 híbridos (CC, E)
Parámetros foliares	Área foliar real por hoja		X		X		
	Materia seca por hoja		X				
	Área foliar específica (AFE)		X				
	Área foliar por planta		X		X		
Análisis de la dinámica de la expansión foliar	Área foliar por hoja estimada	X	X	X		X	X
	Tasas absolutas de expansión foliar	X	X	X			X
	Tasas relativas de expansión foliar	X	X	X			X
	Duración de la expansión	X	X	X			X
	°Cd a emergencia foliar	X	X	X			X
	°Cd a máxima tasa absoluta de expansión foliar		X				
	Contribución de la tasa y la duración de la expansión al área foliar final		X				

Tabla 3.1. Localización, condiciones de cultivo, genotipos utilizados y variables medidas en los ensayos a-f detallados en este capítulo para variables respuestas de la dinámica de la expansión foliar. (Continuacion).

Variables respuesta		Experimentos					
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)
		11 líneas (I, Cb)	4 líneas (CC, E)	5 líneas (I, B)	18 híbridos (CC, E.)	2 líneas (CC, E.)	4 híbridos (CC, E.)
Parámetros epidérmicos- celulares	Área celular					X	
	Número de células por hoja					X	
	Tasas de división celular					X	
	Tasas de expansión celular					X	
	Densidad estomática					X	
	Densidad de células epidérmicas					X	
	Índice estomático					X	

I: invernadero. CC: cámara de crecimiento. Cb: Córdoba. B: Balcarce. E: Esperanza.

Materiales utilizados

Los materiales vegetales utilizados en este capítulo fueron los seleccionados a partir de los análisis de inclusión foliar de Na^+ en las líneas endocriadas: así en esta sección se utilizaron los genotipos HAR5 y HAR2, tomándolos como los que menos Na^+ incluyeron en sus láminas y los genotipos HAR1 y HA64, que fueron los genotipos más incluyentes. Luego para el análisis de la dinámica de la expansión y división celular y las variables estomáticas se tomaron los dos genotipos más contrastantes en inclusión foliar de Na^+ : HAR2 y HAR1. Los experimentos y condiciones de crecimiento son los mismos especificados en el Capítulo II.

Parámetros y variables medidas, calculadas y/o estimadas

Relaciones alométricas-Área foliar específica

Se midió la materia seca foliar de las hojas 1 a 20 y el área foliar utilizando un areafoliómetro portátil de la marca Li-Cor, modelo LI-3000®. El área foliar específica se determinó según lo recomendado por Garnier *et al.* (2001), realizando el cociente entre el área foliar y la materia seca foliar.

Área foliar final real por hoja y total por planta

El área foliar final real para los genotipos HAR5, HAR2, HAR1 y HA64 se realizó utilizando un areafoliómetro portátil de la marca Li-Cor, modelo LI-3000®. Dicha medición se realizó al finalizar el experimento en el total de las hojas. El experimento con estas cuatro líneas finalizó a los 918 °Cd desde la emergencia de las plántulas (experimento “b”, Tabla 2.1)

Análisis de la dinámica de la expansión foliar

Para el análisis de la dinámica de la expansión foliar, se utilizó el protocolo propuesto por Dosio *et al.* (2003) y por Pereyra-Irujo *et al.* (2008). Se realizaron mediciones no destructivas de largo y ancho de la hoja 1 a la 20 (para el experimento 3) en los genotipos HAR5, HAR2, HAR1 y HA64. En el caso del experimento 4, realizado en Balcarce, se siguió la expansión foliar de la hoja 2, 4, 6, 8, 10 y 12 en los cinco genotipos estudiados (HAR2, HAR3, HA64, HA89 y ND761) y en la hoja 8 para el resto de los experimentos. Las mediciones de área foliar se realizaron cada dos días, desde la emergencia de la hoja hasta la finalización de la expansión. Pereyra Irujo *et al.* (2008) afirmaron que hubo una correlación lineal altamente significativa ($R^2 > 0,99$; $n=1755$; $P < 0,0001$) entre largo y ancho y el área foliar, lo que se pudo aplicar para cualquier hoja, independientemente del número de

fitómero, edad de la hoja, genotipo y tratamiento (Pereyra-Irujo *et al.*, 2008). La relación alométrica hallada para estimar el área foliar a partir de la medición de largo por ancho fue la siguiente (Ec. 3.1):

$$\text{Área foliar} = L \times Ah \times 0,65 \quad (\text{Ec. 3.1})$$

Donde L es el largo de la lámina y Ah, el ancho de la misma.

Las tasas absolutas de expansión foliar, fueron calculadas como las pendientes de la función lineal de regresión entre el área foliar y el tiempo termal entre dos mediciones consecutivas, para todo el tiempo en estudio.

La tasa relativa de expansión foliar fue calculada como la pendiente de la curva de regresión entre el logaritmo natural del área foliar en función del tiempo termal.

Para el análisis de la dinámica de la expansión foliar se ajustaron curvas de tipo sigmoideas con tres parámetros: a, b y x0.

La función sigmoidea utilizada fue la siguiente (Ec. 3.2):

$$y = a / (1 + \exp \{ - [(x - x_0) / b] \}) \quad (\text{Ec. 3.2})$$

El área foliar final fue calculada como la asíntota superior (a) de la curva sigmoidea. La duración de la expansión foliar fue calculada como el tiempo comprendido entre la emergencia de la hoja y el momento en que la misma alcanzó el 95 % de su área final como se calculó de la curva ajustada.

Significado de los parámetros de la curva sigmoidea: a, como ya se dijo, expresa el 95 % del área foliar final (se lo toma como valor donde ya finalizó la expansión foliar), b indica el grado de curvatura de la curva y finalmente, x_0 es el tiempo termal, es decir, el valor de x en el cual la hoja alcanza el 50% de su área foliar final.

Duración de la expansión: La duración de la expansión fue calculada como la sustracción entre el tiempo termal en el cual finaliza la expansión y el tiempo termal de aparición de la hoja. Con aparición, se hace referencia al momento en que la hoja se hace visible.

V_{max}: El valor de velocidad máxima de expansión se calculó utilizando los parámetros de la curva de ajuste sigmoidea de tres parámetros. V_{max} se calculó de la siguiente manera (Ec. 3.3):

$$V_{max} = [a * (1/b)] / 4 \quad (\text{Ec. 3.3})$$

Contribución relativa de la duración de la expansión y la tasa de expansión sobre el área foliar final: Se evaluó la contribución relativa de la intensidad (tasa) y la duración de la expansión sobre la disminución del área foliar final por efecto de la salinidad.

Algebraicamente, los cálculos se realizaron como se detalla a continuación (Ec. 3.4-3.8):

$$\text{Efecto tasa (et) (sobre el área foliar final)} = (Z_{sal} - Z_t) / Z_t \quad (\text{Ec. 3.4})$$

$$\text{Efecto duración (sobre el área foliar final)} = (a_s - a_t) / a_t - e_t \quad (\text{Ec. 3.5})$$

$$\text{Efecto del tratamiento (sobre el área foliar final)} = (a_s - a_t) / a_t \quad (\text{Ec. 3.6})$$

$$Z_{sal} = a_s / (1 + \exp \{ - [Fec - x_{0sal}] / b_{sal} \}) \quad (\text{Ec. 3.7})$$

$$Fec = x_0 - (b * \ln \{ [1 / 0,95] - 1 \}) \quad (\text{Ec. 3.8})$$

Donde:

Z_{sal} es el área foliar de las plantas salinizadas al momento en el que las plantas controles finalizan su expansión foliar.

Z_t es el valor de área foliar cuando finaliza la expansión en las plantas controles (95 % del parámetro a de la curva sigmoidea).

a_s es el parámetro “ a ” de la curva sigmoidea de las plantas salinizadas (área foliar final)

a_t es el parámetro “ a ” de la curva sigmoidea de las plantas controles (área foliar final)

Fec es el valor en °Cd en el cual finaliza la expansión foliar en las plantas controles.

“ a ”, “ b ” y “ x_0 ” son los parámetros de la curva sigmoidea respectivamente, descritos en la sección “Expansión foliar y sus parámetros (a , b y x_0)”

Determinación de tamaño y número de células epidérmicas por hoja e índice estomático

Cuantificación de las tasas de división y expansión celular que subyacen en la disminución de la expansión foliar en híbridos contrastantes en inclusión foliar de Na^+ :

Estimativamente, una vez iniciada la hoja 8, se hicieron cosechas cada 2-3 días cuando la hoja aun no emergió visiblemente y cada 6-8 días una vez emergida en el ápice, ya que las variedades utilizadas en experimentos anteriores demoraron alrededor de 25 días para expandir totalmente la hoja 8. Debido a que las cosechas fueron desde iniciación de la hoja 8, el período total de muestreo fue de aproximadamente 30-35 días. Las primeras tres cosechas se realizaron cuando la hoja recién se inicio, a los dos días la segunda cosecha y previo a la

aparición de la hoja, la tercera cosecha. La cuarta cosecha se realizó cuando la hoja estaba en plena expansión y la quinta cosecha cuando la hoja 8 estuvo totalmente expandida.

Por último se midió el área foliar ($L \times A \times 0.65$) en cada cosecha, exceptuando en las tres primeras, donde la hoja se encontraba previa a la fase de emergencia o recién emergida. En estos tres casos se cosechó la hoja entera y se determinó área foliar total de hoja con analizador de imágenes utilizando lupa, junto con la determinación de número y tamaño celular.

La cantidad de zonas a medir se determinó de acuerdo al estadio de desarrollo de la hoja, midiendo en una zona en los primeros muestreos y tomando en los últimos muestreos en tres zonas de las láminas foliares (ápice, medio y base de lámina). Se midieron 25 células en tres zonas de la lámina denominadas de aquí en más como ápice (A), zona media (M) y base (B) en las cosechas cuarta y quinta. Las muestras fueron fijadas en FAA por 48 horas y luego se conservaron en etanol 70 % hasta su medición en CIAP (Córdoba).

Área celular: Se determinó el área celular utilizando imágenes tomadas con microscopio confocal Nikon. Las imágenes previamente calibradas fueron utilizadas para medir el área de 25 células por muestra utilizando el programa Image J®.

Área foliar: El área foliar se midió utilizando el mismo programa mencionado anteriormente (Image J) mediante fotografías utilizando lupas (para las primeras tres cosechas) y luego con fotografías convencionales para la cuarta y quinta cosecha.

Número de células por hoja: Para determinar el número de células por hoja se dividió el área foliar por el área celular promedio por hoja para las primeras tres cosechas. Para las cosechas 4 y 5 se tomaron áreas foliares en tres zonas de la hoja (ápice, medio y base) y para el cálculo total del número de células por hoja se sumaron el número de células para cada área de cada

transecta. El número de células por transecta se cálculo de la misma manera que para el número de células por hojas para las hojas de las primeras tres cosechas. Para el número total de células epidérmicas se tuvieron en cuenta las células oclusivas.

Tasas de división celular: Para calcular la tasa promedio de división celular (TPDC) entre dos cosechas consecutivas se realizó el cociente entre la diferencia entre el número de células sobre la diferencia en tiempo termal entre dos mediciones consecutivas (Ec. 2.9)

$$TPDC = (dn/dt) \quad (\text{Ec. 2.9})$$

donde d es el número de células por hoja y t es el tiempo termal.

Tasas de expansión celular: El cálculo de las tasas de expansión celular, en un intervalo entre dos mediciones, se realizó mediante el cociente entre la diferencia entre dos mediciones consecutivas sobre la diferencia entre dos tiempos termales consecutivos.

Según Pereyra-Irujo *et al.* (2008), la tasa de expansión celular relativa (TECR) se calculo como la pendiente entre el cociente entre el logaritmo del área celular (A) y el tiempo termal (t) en dos mediciones consecutivas (Ec. 2.10):

$$TECR = [d (\ln A) / dt] \quad (\text{Ec. 2.10})$$

Densidad e índice estomático: Las determinaciones de densidad e índice estomático se realizaron siguiendo el protocolo indicado por Beerling y Chaloner (1993). Brevemente, se utilizaron las mismas muestras e imágenes obtenidas con microscopia confocal y se contabilizaron para un área aproximada de 100-200 μm^2 el número de estomas y el número de células totales en esa unidad de superficie. Realizando el cociente entre el numero de estomas en esa unidad de superficie por la superficie considerada, se obtuvo la densidad estomática en

n° estomas / μm^2 . Luego realizando el cociente entre densidad estomática y el número total de células en el área seleccionada se determinó el índice estomático (n°estomas/n°células). Las determinaciones se realizaron para los mismos genotipos o líneas utilizados en el experimento 7 (HAR2 y HAR1), variedades que contrastan en su inclusión foliar de Na^+ y en la zona media de hojas totalmente expandidas (quinta cosecha del experimento 6).

Análisis estadístico

Programa estadístico utilizado: Todos los datos fueron estadísticamente analizados utilizando el programa InfoStat (2009).

Test estadísticos: Se realizaron las ANAVAS correspondientes y se utilizó el test de diferencias mínimas significativas entre medias por genotipo y tratamiento (LSD, por sus siglas en inglés) según como fue descrito por Sokal y Rohlf (1971). Se utilizó un nivel de significancia del 5 % y del 1% donde correspondiese. Se verificaron las hipótesis del análisis de la varianza donde los errores debieron presentar una distribución normal. Esto se hizo a través del test de Shapiro-Wilks. También se realizó el test de homocedasticidad y homogeneidad de varianza a través del test de Levene.

RESULTADOS

Dinámica de la expansión foliar

Experimentos en cámara de crecimiento

Efecto de la salinidad sobre el área foliar y la materia seca de hojas sucesivas

En la Figura 3.1 están graficadas las variables: área foliar por hoja, materia seca por hoja y el área foliar específica para las hoja 1 a 20, en los cuatro genotipos estudiados (HAR 5, HAR2, HAR1 y HA64). En condiciones control, el genotipo HAR5 fue el que mayor tamaño de hojas presentó en esta zona de la planta (hojas 1 a 20) mientras que HA64 fue el que presentó las hojas más pequeñas. Los genotipos HAR2 y HAR1 presentaron áreas foliares finales por hoja intermedias (Figura 3.1). En los cuatro genotipos, la salinidad redujo significativamente las áreas foliares de casi todas las hojas, independientemente de la posición fitomeral. Asimismo, disminuyó significativamente la biomasa de todas las hojas en los cuatro genotipos. Las diferencias entre genotipos radicaron en el área foliar específica. Los genotipos con más elevada inclusión foliar de Na^+ (HAR1 y HA64) fueron los más afectados en su área foliar específica (AFE), mientras que los genotipos menos incluyentes (HAR5 y HAR2) no variaron significativamente su AFE por efecto de la salinidad.

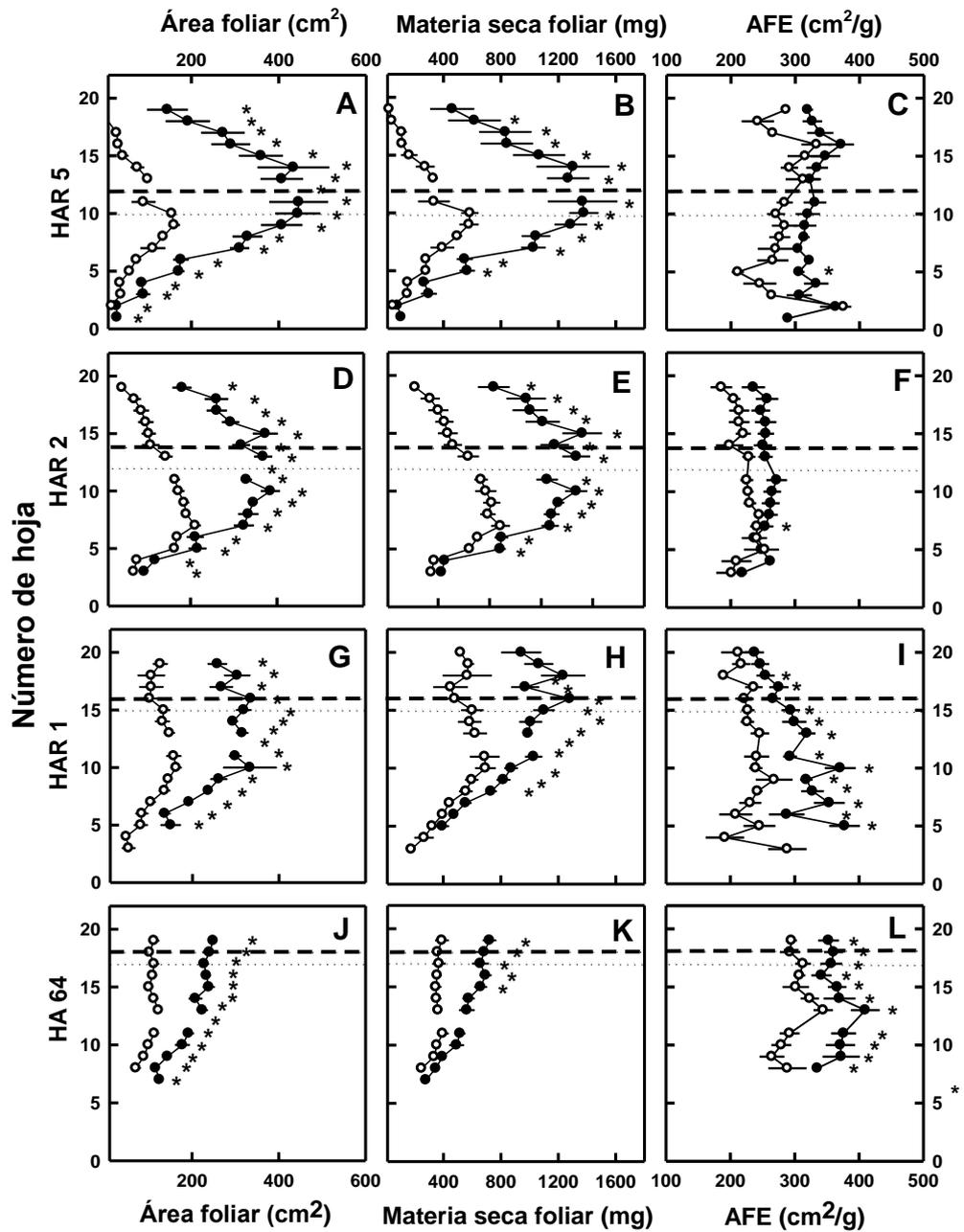


Fig. 3.1. Efecto de la salinidad (130mM) sobre el perfil de área foliar de toda la planta (hoja 1 a 20, Figuras A, D, G y J), sobre la materia seca por hoja (Figuras B, E, H y K) y sobre el área foliar específica (Figuras C, F, I y L). Símbolos rellenos (●) indican plantas control. Símbolos vacíos (○) indican los valores para plantas salinizadas. Las líneas horizontales discontinuas indican la ultima hoja totalmente expandida en condiciones control y las punteadas, la última totalmente expandida en condiciones salinas. Líneas horizontales cruzando los símbolos indican el error estándar. El experimento se condujo en cámara de crecimiento durante 918 °Cd desde la emergencia de las plántulas. (n= 5-9).

Dinámica de la expansión foliar en hojas iniciadas antes, durante y después del comienzo de la salinización

En la Figura 3.2 se graficaron, a modo de ejemplo y para el genotipo HAR2 (Figuras 3.2 A, B y C) y para su posterior análisis en los otros genotipos y otras hojas, las curvas de expansión foliar, de las tasas absolutas de expansión foliar y de las tasas relativas de expansión de la hoja 8 en función del tiempo térmico transcurrido desde la emergencia de las plantas,. El análisis de la dinámica de expansión foliar utilizando la herramienta matemática descrita por Pereyra-Irujo *et al.* (2008), permitió determinar los parámetros mostrados en la Figura 3.3, como son las áreas foliares finales (parámetro “a”), los °Cd a emergencia foliar desde emergencia de plántulas, la duración de la expansión foliar, las tasas absolutas máximas y el momento en que ocurre esa máxima tasa absoluta (medido el tiempo como acumulación térmica, es decir, en °Cd y no en tiempo cronológico). Utilizando este tipo de análisis se pudieron determinar y resumir los cambios por salinidad en estos parámetros. La Figura 3.3 resume estas variables de la dinámica de la expansión foliar en hojas iniciadas antes (hoja 4), durante (hoja 8) y después (hoja 12) de la imposición del estrés salino, en las cuatro líneas estudiadas en este punto.

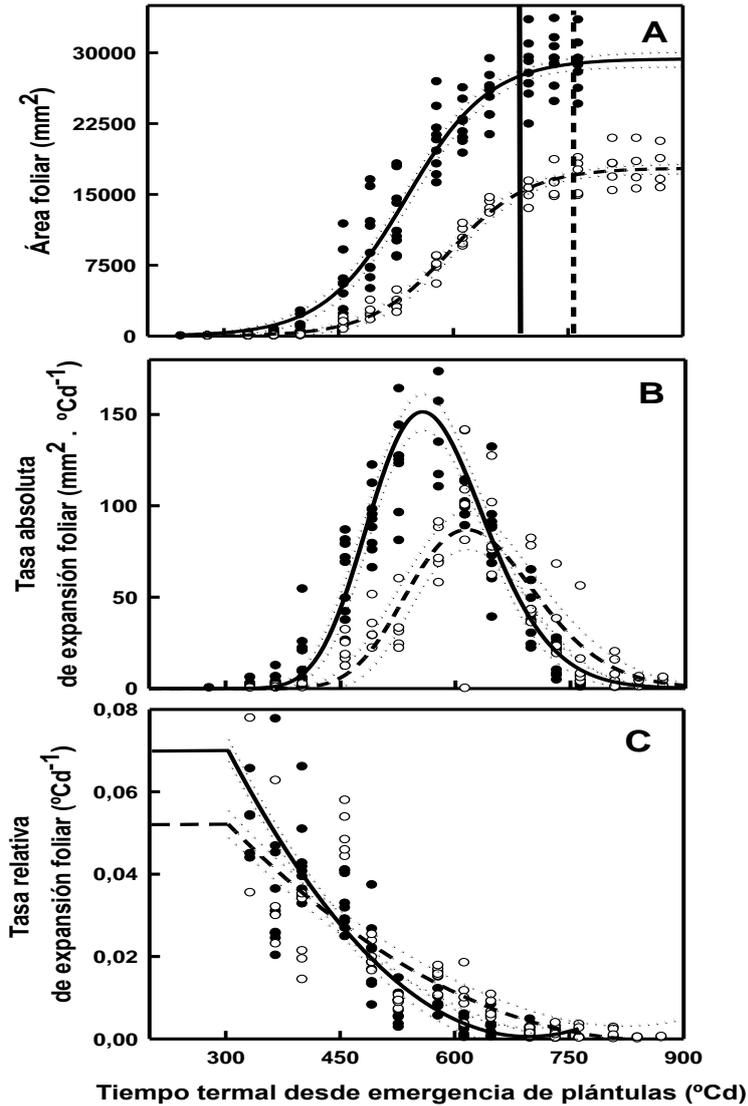


Fig. 3.2. A: área foliar (mm²); B: tasa absoluta de expansión foliar (mm² · °Cd⁻¹) y C: tasas relativas de expansión foliar a través del tiempo en la hoja 8 del genotipo HAR 2 en condiciones control (líneas continuas) y sometidas a 130 mM de NaCl en condiciones controladas en cámara de crecimiento (líneas discontinuas). Las líneas verticales continuas y discontinuas en A indican el momento de finalización de la expansión foliar en plantas control y salinas, respectivamente. El experimento se llevó a cabo durante 918 °Cd desde la emergencia de las plántulas. (n=5).

El área foliar final disminuyó significativamente en los cuatro genotipos y en las tres hojas analizadas (hojas 4, 8 y 12). Las diferencias en área foliar final por la aplicación del estrés salino, fueron más acentuadas en la hoja 12, en todos los genotipos (Figura 3.3). Esto pudo deberse a que esta hoja estuvo sometida al estrés salino desde que se inició en el meristema apical, o sea, desde su iniciación.

En condiciones control, los genotipos HAR5 y HAR2 presentaron áreas foliares mayores comparados con los genotipos HAR1 y HA64 (Figura 3.3). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas, encontrándose las mayores áreas foliares para HAR5, luego HAR2, HAR1 y por último HA64. Como consecuencia, las tasas absolutas de expansión fueron mayores en los dos primeros genotipos (HAR5 y HAR2) (Figura 3.3). Estas diferencias también fueron estadísticamente significativas entre los dos grupos antes mencionados (HAR5 y HAR2 vs. HAR1 y HA64). Por otra parte, las tasas relativas tuvieron valores iniciales más elevados en los genotipos HAR5 y HA64, presentando un ajuste más asintótico hacia el eje de abscisas en los genotipos HAR2 y HAR1. Las tasas relativas no tuvieron grandes diferencias entre tratamientos entre genotipos y tratamientos (Anexo, Figuras A.12, A.13 y A. 14).

En cuanto a al tiempo en que aparecieron las hojas 4, 8 y 12 (tomando el parámetro °Cd a emergencia foliar desde emergencia de plántulas), como resulta lógico, la hoja 4 fue la primera en aparecer y luego las hojas 8 y 12 (Figura 3.3). La salinidad no aumentó el momento de emergencia de las hojas, salvo en la hoja 12 en los genotipos HAR1 y HAR2 (Figura 3.3). Si bien desde el punto de vista estadístico se arrojaron valores no significativos, se puede observar en la figura un leve retraso en el momento de aparición de las hojas por efecto del estrés salino.

A diferencia del parámetro analizado en el párrafo anterior, la duración de la expansión foliar no parecería variar, teniendo en cuenta el número de hoja. Es decir, tanto las hojas 4, 8 y 12 tuvieron la misma duración, independientemente del genotipo analizado

(Figura 3.3). La salinidad prolongó la duración de la expansión solamente en los genotipos HAR2 y HAR5 y solamente en las hojas 4 y 8 (Figura 3.3). Era de esperar que fuera la hoja 12 la que presentara mayores respuestas frente a este estrés ya que estuvo expuesta al mismo desde su inicio. Sin embargo, la hoja 12 no presentó diferencias estadísticamente significativas en alguno de los genotipos estudiados (Figura 3.3).

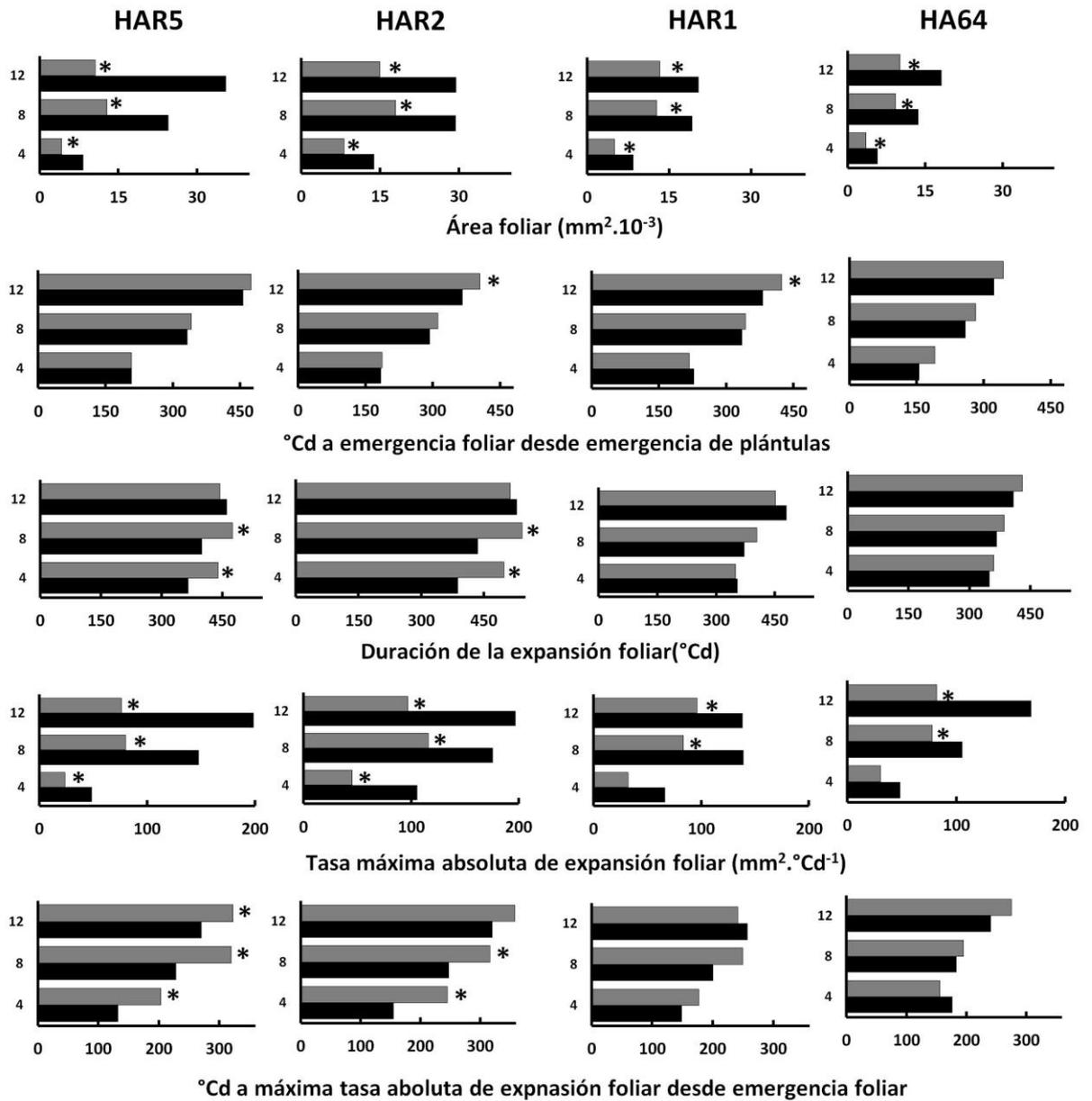


Fig. 3.3. Área foliar (mm^2), $^{\circ}\text{Cd}$ a emergencia foliar desde emergencia de plántulas, duración de la expansión foliar ($^{\circ}\text{Cd}$), tasa máxima absoluta de expansión foliar ($\text{mm}^2 \cdot ^{\circ}\text{Cd}^{-1}$) y $^{\circ}\text{Cd}$ a máxima tasa absoluta de expansión foliar desde emergencia foliar en 4 líneas endocriadas de girasol sometidas a 130 mM de NaCl. Barras negras y grises indican valores para plantas control y tratadas, respectivamente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ANAVA, $p < 0,05$). No se muestran las letras que surgen del análisis estadístico para no recargar la figura. El experimento se llevó a cabo durante 918 $^{\circ}\text{Cd}$ desde la emergencia de plántulas en cámara de crecimiento. ($n=5-9$).

Las máximas tasas absolutas de expansión foliar se encuentran graficadas en la cuarta fila de la figura 3.3. Se encontraron mayores valores para este parámetro en la hoja 12, valores intermedios en la hoja 8 y los menores valores en la hoja 4. La salinidad disminuyó significativamente las tasas absolutas de expansión foliar en la mayoría de los casos (Figura 3.3). Solamente la hoja 4 de los genotipos HAR1 y HA64 no presentó diferencias estadísticamente significativas. Al igual que lo observado para los valores de las plantas control, las máximas tasas en las plantas salinizadas fueron mayores en las hojas de más arriba (hoja12) y los menores valores se dieron en la parte inferior de la planta. A su vez, si bien las diferencias fueron estadísticamente significativas en la mayoría de los casos, puede observarse mayores diferencias en la hoja 12 de todos los genotipos.

El momento en que se produjo la máxima tasa absoluta de expansión foliar ($^{\circ}\text{Cd}$ a máxima tasa absoluta de expansión foliar desde emergencia de plántulas, Figura 3.3) aumentó con la posición de la hoja, es decir, la hoja 4 fue la primera en presentar la máxima tasa, luego la 8 y por último la 12 en los 4 genotipos. Hubo una prolongación estadísticamente significativa de este parámetro en los genotipos HAR2 y HAR5, al igual que lo acontecido para el parámetro duración de la expansión foliar. Los genotipos HAR 1 y HA64 no presentaron diferencias en esta variable.

Efectos de la tasa de expansión foliar y de su duración sobre el área foliar final

En la Figura 3.4 se graficaron la contribución de la duración de la expansión foliar y la tasa de expansión foliar sobre la disminución foliar final por estrés salino. En el modelo propuesto por Pereyra-Irujo *et al.* (2008), se presentan dos respuestas genotípicas contrastantes: una donde hay cierta compensación de la disminución de la tasa con un aumento de la duración de la expansión foliar (genotipo HAR2) y otra donde no lo hubo (genotipo HA64). En nuestro caso de estudio, si bien en la Figura 3.3 se muestran diferencias significativas en la duración de la expansión entre condiciones control y salinizadas en el genotipo HAR2 y HAR5 para la hoja 4 y 8 solamente, estas diferencias no contribuyeron a moderar las altamente significativas disminuciones finales en las tasas de expansión foliar (compárese las tasas absolutas de expansión foliar en control y salinidad en HAR2 y HAR5 en la figura 3.3). El efecto del aumento de la duración de la expansión foliar sobre la disminución del área foliar final no varió grandemente entre genotipos (Figura 3.4), pudiéndose observar solo un gradiente de la variable efecto prolongación de la expansión foliar sobre el área foliar final decreciente entre HAR5, luego HAR2, HAR1 y con los menores valores para HA64. Las contribuciones sobre la morigeración de la disminución del área foliar final por salinidad estuvieron en el rango del 7 al 13 %, evidenciando falta de contraste marcado entre genotipos (Figura 3.4), contrariamente a los observado por Pereyra-Irujo *et al.* (2008) bajo condiciones de déficit hídrico. Puede afirmarse que no hubo marcada variabilidad intraespecífica para estas respuestas en las líneas estudiadas bajo estrés salino.

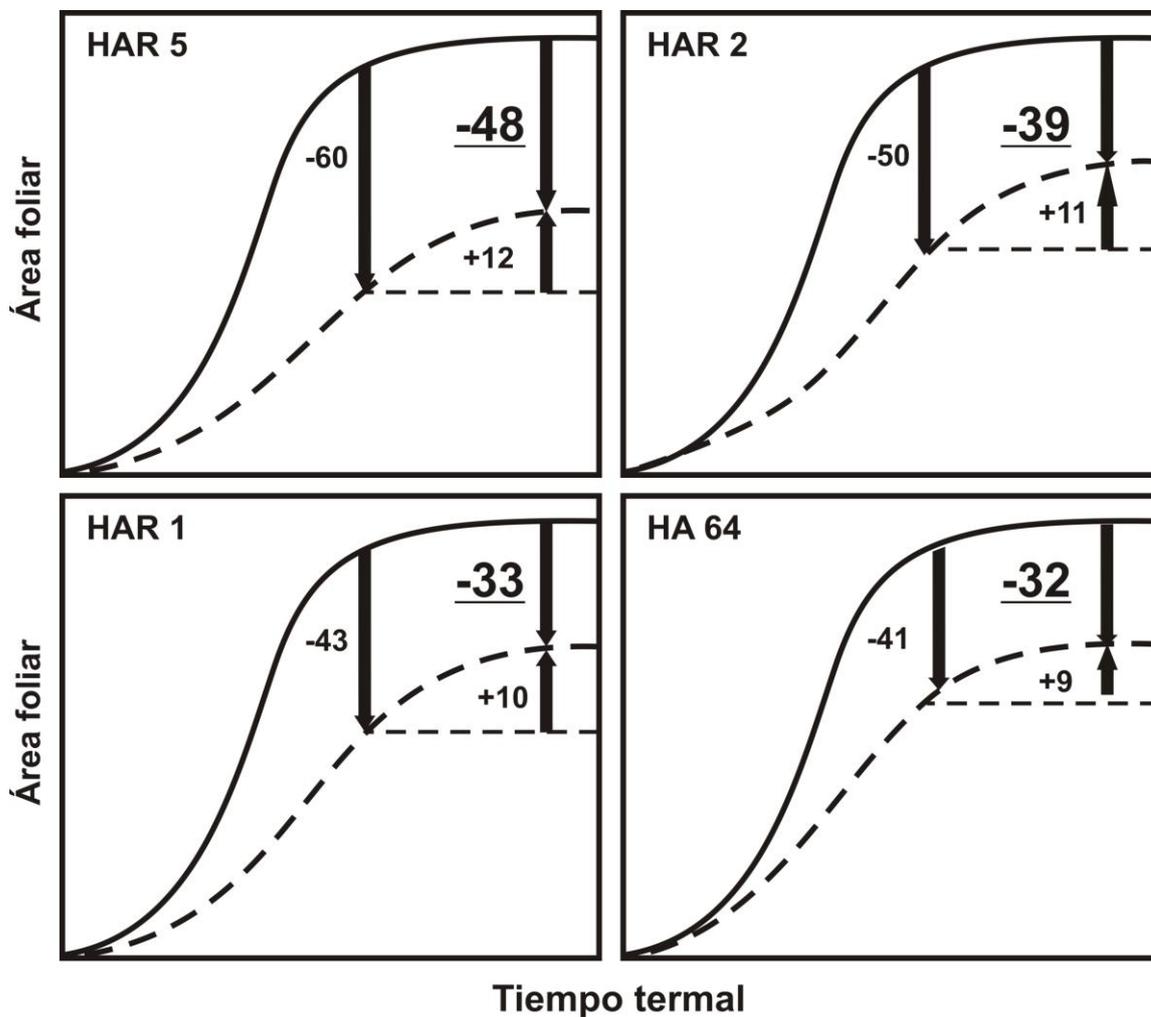


Fig. 3.4. Efecto de la tasa de expansión foliar (flechas descendentes a la izquierda de cada figura) y de la prolongación de la duración (flechas ascendentes a la derecha de cada figura) por efecto de la salinidad (130mM, condiciones de cámara de crecimiento) sobre la reducción del área foliar final (flecha descendente a la derecha y valores porcentuales subrayados) en líneas endocriadas contrastantes en inclusión foliar de Na^+ . HAR5 y HAR2 son los genotipos que menos Na^+ acumularon en sus láminas, mientras que HAR1 y HA64, los que presentaron las mayores concentraciones foliares de Na^+ . (n=5-9).

Experimentos en invernadero

Los experimentos en invernadero se realizaron en la Unidad Integrada Balcarce (37° 45' 55" S, 58° 18' 15" O), INTA-Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Buenos Aires, Argentina. Los genotipos utilizados fueron: HA64, ND761, HAR2, HA89 y HAR3. Los genotipos HAR2 y HA64 fueron los mismos que en el experimento en cámara de crecimiento. ND761 y HAR3 acumularon la misma cantidad de Na^+ en hojas, siendo similares a HAR1, es decir, son altamente incluyentes foliares de Na^+ ; mientras que HA89 es similar a HAR5 y a HAR2 en cuanto a una muy baja inclusión de Na^+ . Como ya se mencionó en la sección de materiales y métodos, el experimento en invernadero se realizó en simultáneo con un experimento de estrés hídrico. En la Figura 3.5 se encuentran resumidos los valores para cada genotipo y tratamiento de las siguientes variables: área foliar final, °Cd a emergencia foliar desde emergencia de plántulas, duración de la expansión foliar, máxima tasa absoluta de expansión foliar y °Cd a máxima tasa absoluta de expansión foliar desde emergencia folia (Figura 3.5). Cabe destacar que esta figura presenta los mismos parámetros que la Figura 3.3 para poder realizar una comparación de los resultados obtenidos en cámara de crecimiento y en invernadero. Los demás parámetros y variables estudiados en este apartado se encuentran en el Anexo (Figuras A.21 a A.41), así como su comparación con los mismos parámetros obtenidos simultáneamente sobre los mismos genotipos en un experimento con estrés hídrico (Figuras A.21 a A.41). Debido a que las condiciones en cámara se encontraban controladas y en invernadero solo se controló la no ocurrencia de heladas mediante calefacción matutina, fue de esperar que los valores de área foliar y de tasas absolutas de expansión foliar fueran mayores en cámara de crecimiento, ya que las condiciones son óptimas para el mismo, lo cual se cumplió (compárese Figuras 3.3 y 3.5). Por lo tanto fue de esperar que las diferencias en algunas de estas variables fueran más acentuadas en cámaras de crecimiento que en invernadero, al obtenerse mayores valores de las plantas control en las primeras condiciones que en la segunda (cámaras e invernadero, respectivamente). Por otro lado, en esta figura se representan las hojas 2, 4, 6, 8 y 10 en vez de las hojas 4, 8 y 12 (Figura 3.3).

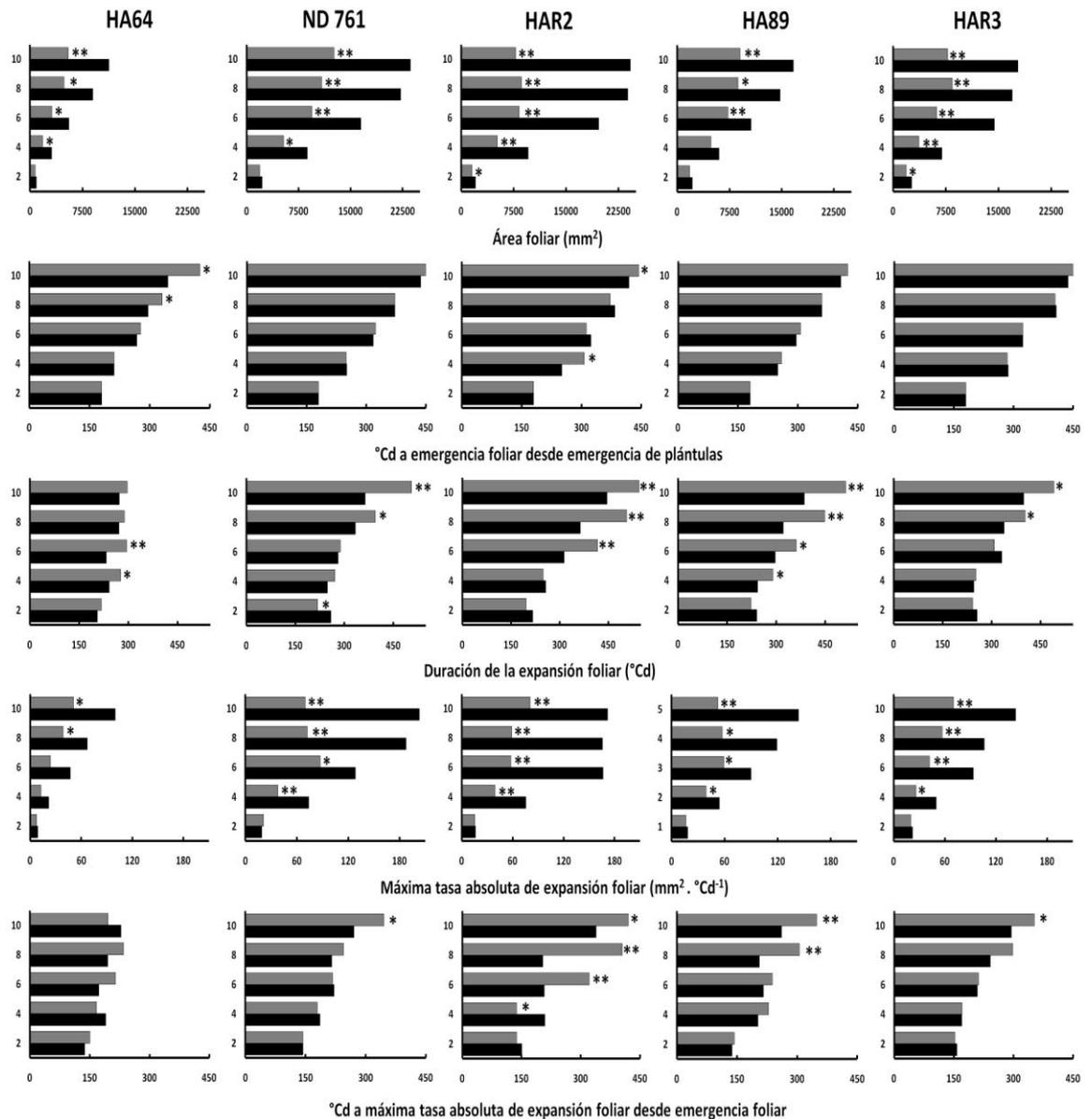


Fig. 3.5. Área foliar (mm²), °Cd a emergencia foliar desde emergencia de plántulas, duración de la expansión foliar (°Cd), tasa máxima absoluta de expansión foliar (mm² · °Cd⁻¹) y °Cd a máxima tasa absoluta de expansión foliar desde emergencia de foliar en 5 líneas endocriadas de girasol sometidas a 130 mM de NaCl (en invernadero en Balcarce, provincia de Buenos Aires). Barras negras y grises indican valores para plantas control y tratadas, respectivamente. Los asteriscos simples (*) y dobles (***) indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, con valores de p<0,05 y p<0,01, respectivamente (ANOVA). (n=4).

Hubo diferencias significativas en el área foliar final alcanzada para cada hoja en todos los genotipos (Figura 3.4). Las diferencias fueron mayores en las hojas superiores (hojas 8 y 10) y en los genotipos ND761, HAR2 y HAR3. Los resultados fueron similares a los hallados en invernadero para los genotipos HAR2 y HA64. ND761 y HAR3 tuvieron disminuciones en área foliar por salinidad similares a HAR2 y fueron muy afectados por este estrés. Esto coincide con que estos genotipos presentan las mismas concentraciones foliares de Na^+ en salinidad. HA89 tuvo disminuciones en área foliar intermedias a los anteriores genotipos, similares a las encontradas en el genotipo HAR1 en cámara de crecimiento, con la diferencia que HA89 presenta muy bajas concentraciones foliares de Na^+ y HAR1 es altamente incluyente foliar de Na^+ .

No hubo diferencias en los $^{\circ}\text{Cd}$ a emergencia foliar desde emergencia de plántulas por efectos de la salinidad, tanto en invernadero como en cámara de crecimiento (Figuras 3.3 y 3.5). Esta variable aumentó a medida que aumentó el número de hoja considerado, obteniéndose los mayores valores en las hojas superiores (8 y 10) y los menores valores en las inferiores (hojas 2 y 4). Solo hubo diferencias estadísticamente significativas en esta variable en las hojas 8 y 10 en HA64 y en las hojas 4 y 10 en HAR2 (Figura 3.5).

La duración de la expansión foliar fue prolongada en hojas superiores, como en las hojas 6, 8 y 10 en HAR2 y en las hojas 4, 6, 8 y 10, en HA89 (Figura 3.5). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en HAR2 en cámara de crecimiento. Además estos resultados se correlacionan con la poca inclusión foliar de Na^+ que poseyeron estos genotipos (HAR2 y HA89). Las disminuciones en las máximas tasas absolutas de expansión foliar fueron más acentuadas en los genotipos HAR2 y HA89. Los resultados reportados para HAR2 concuerdan con los obtenidos en cámara de crecimiento (Figuras 3.3 y 3.5). HA64 vio poco afectada sus tasas absolutas de expansión foliar tanto en cámara de crecimiento como en invernadero (Figuras 3.3 y 3.5).

En cuanto al retraso producido por salinidad en la ocurrencia de la máxima tasa absoluta de expansión foliar (desde emergencia de hojas) se puede concluir que lo reportado en cámaras de crecimiento coincidió con lo reportado en invernadero. HAR2, HA89 y HAR3 fueron los genotipos más afectados en invernadero (Figura 3.5) al igual que HAR2 y HAR5 en cámara de crecimiento (Figura 3.3).

Efecto de la salinidad sobre las tasas de división y expansión celular y su influencia en las mermas en área foliar

A partir de los estudios realizados con los cuatro genotipos contrastantes en inclusión foliar de Na^+ (HAR5, HAR2, HAR1 y H64), se tomaron los dos genotipos más contrastantes en inclusión foliar de Na^+ (HAR2 con muy bajas concentraciones foliares de este ion y HAR1, netamente incluyente) para evaluar los cambios en tasas de divisiones celulares y expansiones celulares por efecto de la salinidad. De esta manera se exploraron los mecanismos subyacentes en las mermas en área foliar producida por salinidad y la influencia que tuvo la acumulación foliar de Na^+ sobre las mismas.

Para determinar los parámetros de la figura 3.7 se tomaron 5 muestras por genotipo y tratamiento en cinco momentos diferentes en la ontogenia de la hoja. Las tres primeras cosechas corresponden a los primordios foliares previa a emergencia, la cuarta a hojas en plena expansión y la quinta a hojas totalmente expandidas. HAR2 tuvo hojas más grandes en ambas condiciones que HAR1 (Tabla 3.2). La salinidad afectó negativamente el área foliar en ambos genotipos (Figura 3.6., Tabla 3.2.). Como puede observarse en esta figura, la disminución en área foliar final fue mayor en HAR1 que en HAR2, del orden de 76 % para HAR1 y del 71 % en HAR2. Si se toman los promedio de área foliar de las muestras de hojas realizadas para determinar el tamaño y número de células, se podrá observar que las diferencias fueron aun mayores entre genotipos, del orden del 68 % para HAR2 y del 76 % para HAR1 (Tabla 3.2). Las curvas de expansión foliar fueron tomadas dejando crecer 5 plantas por tratamiento y genotipo hasta la finalización de la expansión de hoja 8.

En este caso, los valores obtenidos fueron calculados por la metodología propuesta por Dosio *et al.* (2003) realizando el cálculo mediante la medición del largo y ancho de hojas. Estos valores difieren ligeramente de los expresados en la Tabla 3.2, donde las disminuciones en área foliar fueron del 76 % para HAR1 y del 68 % para HAR2.

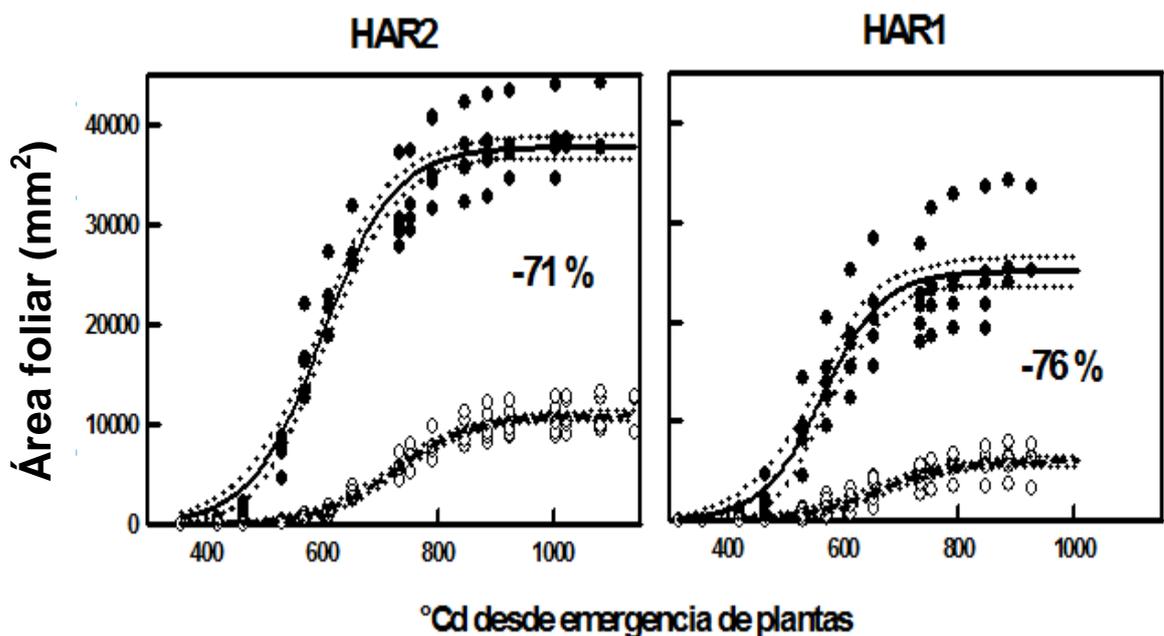


Fig. 3.6. Efecto de la salinidad (130 mM, condiciones de cámara de crecimiento) sobre la expansión foliar en dos genotipos contrastantes en inclusión foliar de Na^+ . El experimento se llevó a cabo en cámaras de crecimiento durante 1141,13 °Cd en condiciones controladas de radiación y temperatura. Líneas continuas indican el ajuste sigmoideo para plantas control y líneas discontinuas, para plantas salinizadas. Las curvas se obtuvieron a partir de un ajuste sigmoideo para cada genotipo y tratamiento. Se dejaron 20 plantas en el experimento y se midió la expansión foliar desde emergencia de la hoja 8 hasta la finalización de la expansión, que coincidió con la finalización del experimento. (n=5).

El área celular final promedio fue afectada en igual intensidad por salinidad (quinta cosecha, Tabla 3.2 y Figuras 3.7 A y B). Tanto en HAR2 como en HAR1 la disminución del área celular promedió el 46 % en células totalmente expandidas. Por lo tanto, las diferencias en área foliar estuvieron dadas por una disminución mayor del número de células por hoja en HAR1 que en HAR2 (-56 % y -42 % para HAR1 y HAR2, respectivamente, Tabla 3.2). Esto se muestra a continuación en la figura 3.7.

Tabla 3.2. Efecto de la salinidad (130 mM, condiciones de cámara de crecimiento) sobre el área celular, el número final de células por hoja y el área foliar en dos genotipos contrastantes en inclusión foliar de Na⁺. (n=5).

	HAR2		HAR1	
	C	S	C	S
Área celular final (µm ²) (a)	1.165,6 b	630,6 a	1.472,2 c	792,5 a
Disminución (%)		-45,9		-46,2
N° células por hoja (x10 ⁶) (b)	25,6 c	14,9 b	15,3 b	6,8 a
Disminución (%)		-41,5		-55,6
Área foliar (cm ²) (c)	296,8 c	94,4 a	217,6 b	52,2 a
Disminución (%)		-68,2		-76,1

C: medias de plantas control, S: valores para plantas salinizadas.

En la Figura 3.7 se graficaron las siguientes variables: área celular (A y B), número de células por hoja (C y D), tasas relativas de expansión celular (E y F) y tasas relativas de división celular (G y H) en función de tiempo térmico desde el inicio de la hoja. Las áreas celulares aumentaron considerablemente su tamaño a partir de la tercera cosecha (Figuras 3.7 A y B).

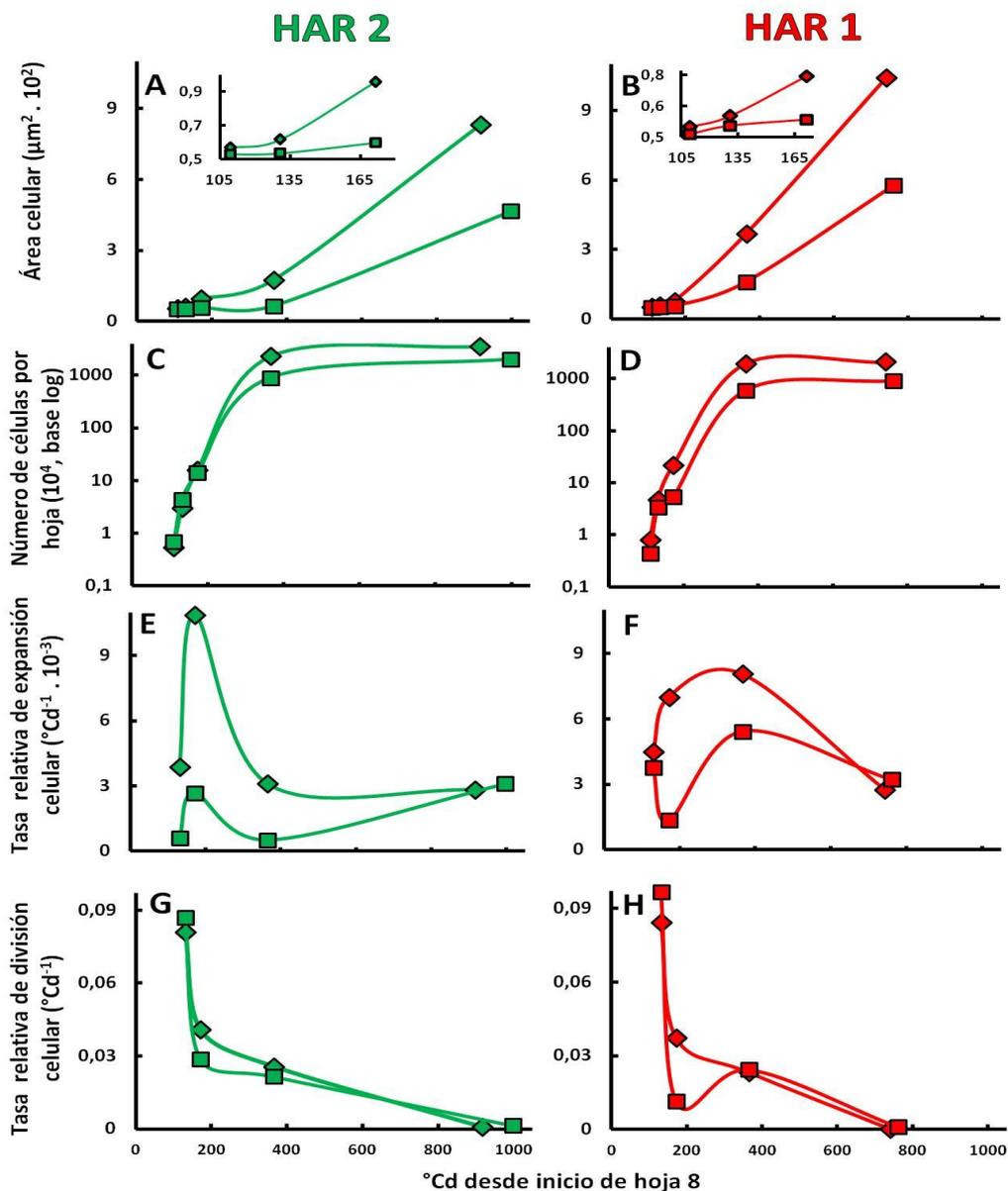
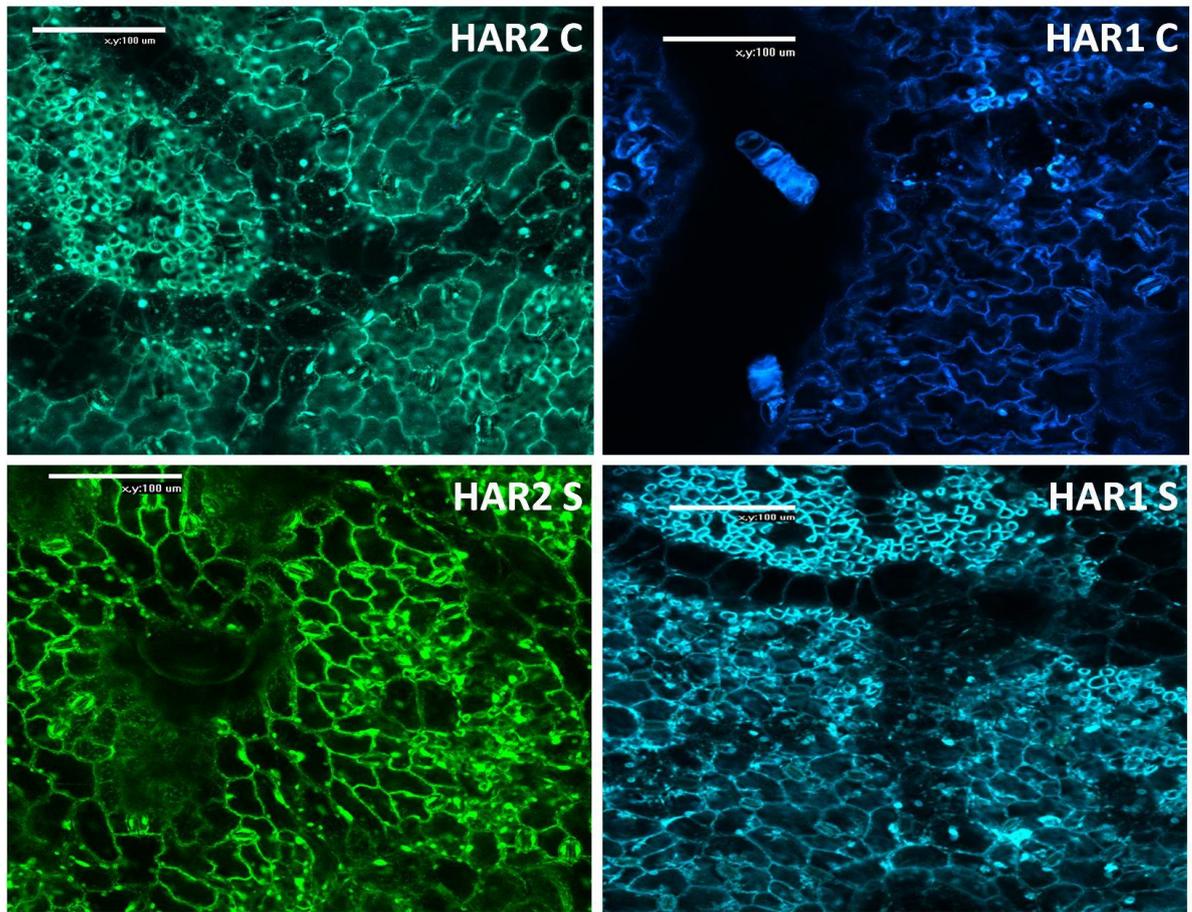


Fig. 3.7. Efecto de la salinidad (130 mM) sobre el área celular (A y B), número de células por hoja (C y D), tasas relativas de expansión celular (E y F) y tasas relativas de división celular (G y H) en función de tiempo térmico desde el inicio de la hoja 8. El experimento se llevó a cabo en cámaras de crecimiento durante 1141,13 $^{\circ}\text{Cd}$ en condiciones controladas de radiación y temperatura. Los rombos indican los promedios para cada fecha de muestreo y para plantas control. Los cuadrados indican los promedios para cada fecha y cada genotipo en condiciones salinas. Se ilustra el genotipo HAR2 en verde y HAR1 en rojo para con mayor facilidad en la detección del genotipo poco incluyente foliar de Na^+ (HAR2, en verde) y el netamente incluyente foliar de Na^+ (HAR1, en rojo). (n=5).

El número de células por hoja se graficó en escala logarítmica ya que los valores fueron muy disímiles, pasando de unos pocos miles (en la primera cosecha) a más de 50 millones de células por hojas (al finalizar la expansión foliar) (Figura 3.7. C y D). A partir de la dinámica de las expansiones celulares y las variaciones en el número de células (divisiones celulares) se determinaron las tasas relativas de expansión y de división celular (Figuras 3.7 E, F, G y H). Los efectos de la salinidad sobre las tasas de división y expansión celular fueron más notorios antes de la emergencia de la hoja (Figuras 3.7 E, F, G y H). Las tasas relativas de expansión celular se afectaron igualmente en ambos genotipos (Figuras 3.7 E y F). Las tasas relativas de división celular disminuyeron más en etapas tempranas de la ontogenia de la hoja y en mayor medida en HAR1 que en HAR2 (Figuras 3.7 G y H). Las mayores reducciones en las tasas de división celular en HAR1 parecerían haber sido las determinantes de las mayores disminuciones en área foliar en el genotipo incluyente (HAR1, -76 % de disminución en área foliar final) que en aquel con muy poca acumulación foliar de Na⁺ (HAR2, -68 % de disminución en área foliar final).

Por último, en la Figura 3.8 se ilustran cuatro ejemplos de fotomicrografía obtenidas con microscopía confocal en hojas 8 al final de la expansión, en plantas control y salinizadas para cada genotipo, respectivamente. Nótese que la salinidad no sólo afectó el tamaño celular en los genotipos HAR2 y HAR1, sino también se evidenció un notable cambio en la configuración y forma de las células. Las células de plantas controles presentaron mayor cantidad de paredes anticlinales con amplias sinuosidades, mientras que las células maduras de las hojas de plantas salinizadas tuvieron paredes anticlinales de sus células epidérmicas propiamente dichas mucho más redondeadas.



C: plantas control, S: plantas salinizadas.

Fig.3.8. Fotomicrografía electrónica confocal de células epidérmicas maduras correspondientes a secciones medias de hojas totalmente expandidas. Cada barra indica 100 µm. Las plantas S (salinizadas) fueron tratadas con 130 mM de NaCl en condiciones de cámara de crecimiento.

Modificaciones en las densidades de células epidérmicas y estomáticas y en el índice estomático por salinidad

En la Tabla 3.3 se muestra el análisis estadístico realizado para las variables densidad estomática (entendida ésta como número de estomas por unidad de superficie), el número de células epidérmicas por unidad de superficie y el índice estomático que es el número de estomas en relación al número total de células epidérmicas (incluidos los estomas) (Tabla 3.3). La salinidad no modificó la densidad estomática en HAR2 y, contrariamente, la aumentó significativamente en HAR1. Por otro lado la densidad de células epidérmicas aumentó en ambos genotipos, pero solo significativamente en HAR2 (+153% y +119% de aumento para HAR2 y HAR1, respectivamente). El aumento de la densidad de células en HAR2 por salinidad sin haber variado la densidad estomática, provocó una disminución estadísticamente significativa del índice estomático por efecto de este estrés de un valor de 0,25 a 0,21, mientras que en HAR1 el aumento de la densidad estomática fue mayor que el aumento de la densidad de células epidérmicas provocando un aumento estadísticamente significativo del índice estomático del orden del 17 % (0,23 vs 0,27 en condiciones control y salinizadas, respectivamente). La falta de adaptación del genotipo HAR1 en cuanto a no disminuir el índice estomático por salinidad (sin tener en cuenta el tamaño y apertura de los estomas) podría aumentar el flujo transpiratorio y de esta forma aumentar la cantidad de sales que se irían concentrando en los tejidos foliares, haciendo que este genotipo incluya mucho más Na^+ en hoja que HAR2 que disminuyó su índice estomático por salinidad.

Tabla 3.3. Efecto de la salinidad (130 mM, condiciones de cámara de crecimiento) sobre la densidad estomática (estomas/mm²), el número de células epidérmicas (células/mm²) y el índice estomático. Se realizó un ANOVA utilizando el test de diferencias mínimas significativas (LSD de Fisher por sus siglas en ingles). Letras diferentes para cada variable indica diferencias estadísticamente significativas con p<0,05. C: valores promedio para plantas control, S: valores para plantas salinizadas. (n=5).

	HAR2		HAR1	
	C	S	C	S
Densidad estomática (estomas/mm ²) (a)	225,2ab	292,4b	196,2a	267,1b
Densidad células epidérmicas (células/mm ²) (b)	920,4a	1407,9b	843,9a	1001,8a
Índice estomático (c)	0,25 bc	0,21 a	0,23 ab	0,27 c

DMS a: 69,9; b: 271,2; c: 0,03

DISCUSIÓN

Efectos de la salinidad sobre el área foliar y la materia seca por hoja y el área foliar específica

Numerosos han sido los estudios donde se evalúan los cambios en el área foliar específica y sobre todo, si esta variable es independiente o no de la expansión foliar (Tardieu *et al.*, 1999). En este trabajo de revisión, los autores proponen que el área foliar específica decrece cuando la expansión foliar es más afectada que el suministro de cadenas carbonadas (Tardieu *et al.*, 1999). En nuestros experimentos, no solo fue afectada la expansión foliar bajo salinidad, sino también, como ya se vio en el capítulo II, se modificó en forma diferencial, dependiendo del genotipo, la acumulación de biomasa. Así, en HAR2 y HAR5, las disminuciones en área foliar y en materia seca fueron de similar magnitud, mientras que en HA64 y HAR1 las disminuciones porcentuales en área foliar fueron superiores a las disminuciones en materia seca foliar (Figura 3.1), por lo que el AFE fue mucho reducido en estos genotipos incluyentes. Esto implica una menor capacidad de explorar el recurso radiación frente a una misma cantidad de cadena carbonadas (menos cm^2 desarrollados frente a un mismo gramaje de materia seca). Andrade *et al.* (1993), trabajando en expansión foliar en girasol bajo compactación, reportaron que, cuando se produce estrés hídrico por efecto de la compactación, se induce una disminución del área foliar específica. Estos datos concuerdan con los reportados por nosotros para genotipos incluyentes de Na^+ foliar como HAR1 y HA64 (Figura 3.1). Tardieu *et al.* (1999) trabajando con déficit hídrico en girasol, reportaron una disminución en el área foliar específica de la hoja 8 de alrededor del 35% por efecto del estrés hídrico, indicando que esta disminución sería desventajosa para la captación de la radiación solar por parte de las plantas. Contrariamente a lo observado en HAR1 y HA64, la salinidad no afectó el área foliar específica en HAR5 y HAR2, dándonos indicios de cierta tolerancia de los genotipos excluyentes en cuanto a esta variable se refiere, ya que las mermas en el área foliar específica comprometen más cadenas carbonadas para una misma área foliar, haciendo ineficiente el uso de este recurso. Coincidiendo con lo aquí reportado para los genotipos poco incluyentes foliares de Na^+ (HAR5 y HAR2), Muller *et al.* (1998), trabajando con

hojas de maíz bajo déficit hídrico, reportaron que las hojas de plantas estresadas no modificaron su área foliar específica, logrando mantener un uso eficiente de los fotoasimilados para la producción de área foliar fotosintéticamente activa.

Cambios en la dinámica de la expansión foliar de girasol por salinidad

La disponibilidad de agua y carbono han sido siempre considerados como las principales limitaciones del crecimiento foliar, clásicamente referido como el control hidráulico y metabólico, respectivamente (Kriedeman, 1986; Dale, 1988; Walter *et al.*, 2009). Estos puntos de vistas son validados por evidencia experimental y modelos de simulación (Walter *et al.*, 2009). La competencia de los órganos destino para la captación de carbono bajo salinidad, afecta la distribución de la materia seca y, consecuentemente, el rendimiento (Munns y Termaat, 1986). En las etapas iniciales de su desarrollo, las láminas foliares también son órganos destino (sumideros de carbohidratos). La importancia del estudio de la expansión foliar como determinante del rendimiento radica en que el rendimiento en grano en girasol está mayormente limitado por fuente que por destino (Alkio *et al.*, 2003), a diferencia de lo reportado por Fricke (2002) para cereales, donde afirma una limitación por destino más que por fuente. Para los cultivos de grano en general, está ampliamente aceptado que el llenado de granos o semillas es más limitado por destino que por fuente (Patrick, 1988). Sin embargo, soportes experimentales para esta conclusión provienen de otras especies diferentes a girasol. Así, resultados obtenidos en estudios sobre girasol pueden indicar una limitación por fuente, incluso aunque la relación fuente–destino no haya sido cuantificada: cultivos más densos durante el llenado de granos incrementan el número de aquenios llenos y materia seca por aquenios, donde el sombreado tiene el efecto opuesto (Andrade y Ferreiro, 1996; Dosio *et al.*, 2000). En estos experimentos, el efecto principal puede ser atribuido a cambios en la radiación fotosintéticamente activa interceptada, lo cual está relacionada con la fotosíntesis y el suministro de fotoasimilados (Alkio *et al.*, 2003). A partir de las mermas en acumulación de materia seca producidas por salinidad y estudiadas en el capítulo anterior, se evalúa la relación que hubo entre estas disminuciones y como se afectó la expansión foliar. También

se relacionó como la inclusión foliar de Na^+ , que en el Capítulo II de afectó diversos parámetros vegetativos, influyó en los cambios en expansión foliar bajo salinidad.

Las disminuciones en expansión foliar están directamente correlacionadas con mermas en el rendimiento en grano en girasol (Alkio *et al.*, 2003). Andrade *et al.* (2002) mostraron que el incremento en rendimiento en girasol, analizado por una optimización en la geometría de plantación, se correlacionó con el aumento de la radiación interceptada. Se ha informado repetidamente que la defoliación disminuye el número y/o el llenado de granos (Johnson, 1972; Rodrigues Pereira, 1978; Schneiter *et al.*, 1987; Saranga *et al.*, 1996). En girasol, la tasa de expansión foliar se reduce en respuesta a la salinidad del medio (Rawson y Munns, 1984), y se sabe que la reducción en expansión foliar es una de las primeras respuestas de las plantas ante diversos tipos de estrés (Munns y Termaat, 1986). En déficit hídrico, la extensión de la reducción del área foliar es muy importante en la determinación de la adaptación de ciertos cultivos ante un escenario de cambio climático. En un escenario donde sean esperados períodos de sequía prolongados, un genotipo que reduzca su crecimiento foliar es esperable que llegue a la madurez con una cierta cantidad de agua disponible (Pereyra-Irujo *et al.*, 2008). Por otro lado, en un escenario donde son esperados solamente cortos episodios de sequía, un genotipo que mantenga el crecimiento foliar es esperable que tenga mayores rendimientos (Reymond *et al.*, 2003). En nuestro trabajo, se encontraron diferentes respuestas en las disminuciones del área foliar final por efecto del estrés salino (Figura 3.3). Así los genotipos que acumularon bajas concentraciones foliares de Na^+ (HAR5 y HAR2) parecerían haber sido los más afectados en las disminuciones del área foliar final por este estrés. Estas respuestas contrastan con las mencionadas en el capítulo 2, donde se discutió el ranking de tolerancia a salinidad en los cuatro genotipos de girasol. Así, el genotipo HAR2 que presentó la mayor tolerancia tanto en el corto como en el largo plazo, fue uno de los más afectados en disminución del área foliar por salinidad, tanto en las hojas iniciadas antes, durante y después de la imposición de la salinidad. Las disminuciones en el área foliar de las hojas 4, 8 y 12 producidas en mayor medida en HAR5 y HAR2 comparativamente superiores a las ocurridas con las disminuciones por salinidad en los genotipos HAR1 y HA64 concuerdan parcialmente con las disminuciones en área foliar total por planta ya reportadas en el

Capítulo II (Tabla 2.2). Si bien el área foliar final de las hojas iniciadas antes, durante y después de la salinización son de importancia, ya que se disminuye la capacidad de captar radiación fotosintéticamente activa, determinamos que al momento de evaluar la tolerancia a salinidad, y al tomar una mayor cantidad de variables para realizar el ranking mostrado en la tabla 2.4 del capítulo anterior, queda demostrado que no siempre aquellos genotipos que son los que menos disminuyen el área foliar por salinidad (como HAR1 y HA64), serán aquellos más tolerantes. Así HAR2 que fue el que mayor valor obtuvo para el ranking de tolerancia a salinidad, no fue el que menos disminuyó el área foliar por salinidad en las hojas 4, 8 y 12 y, HA64, que presentó las menores disminuciones porcentuales en área foliar final en las hojas 4, 8 y 12 (Figuras 3.3 y 3.5) fue el genotipo que quedó por detrás de HAR2 en el ranking de tolerancia a salinidad a corto y largo plazo (Tabla 2.4, Capítulo II).

Por otro lado, los resultados obtenidos para las variables área foliar final, °Cd a emergencia foliar desde emergencia de plántulas, duración de la expansión foliar, máximas tasas absolutas de expansión foliar y el momento de ocurrencia de la máxima tasa absoluta de expansión foliar fueron corroborados en experimentos en invernadero (Figura 3.5) donde el genotipo HAR2 fue uno de los más afectados, junto con el genotipo ND761 (Figura 3.5). Resalta de la observación que estos genotipos, que fueron los más susceptibles en disminución de área foliar final por efecto de la salinidad en el perfil de toda la planta, sean genotipos contrastantes en inclusión foliar de Na^+ (HAR2 incluye poco Na^+ en hojas y ND761 es incluyente foliar de Na^+ , con valores similares a HAR1). El hecho de haber encontrado genotipos con elevadas disminuciones en área foliar entre aquéllos que son incluyentes como poco incluyentes, sumado al hecho que los genotipos tolerantes a corto y largo plazo a la salinidad encontrados en el Capítulo II, que disminuyeron en gran medida su área foliar en salinidad (HAR2), nos lleva a la conclusión de que no existiría correlación entre la inclusión foliar de Na^+ y las respuestas en disminuciones en área foliar por efecto de la salinidad, al menos al comparar los cuatro genotipos estudiados (HAR5, HAR2, HAR1 y HA64). Pero si solamente se analiza el área foliar total (Tabla 2.2, capítulo II), es de destacar que en el ranking obtenido en la tabla 2.4 del capítulo anterior (HAR2>HAR1>HA64>HAR5) concuerda parcialmente con los

valores porcentuales de área foliar total por planta obtenidos de la tabla 2.2 del mismo capítulo, donde HAR2 tuvo un área foliar del 44 % respecto al control y HA64, HAR1 y HAR5 tuvieron áreas foliares en condiciones salinas con respecto a las control del 38, 37 y 22 %. Por lo tanto, los datos obtenidos al realizar el análisis en hojas individuales, no siempre concuerda con el análisis que se realiza a nivel de planta entera. Así las diferencias en disminuciones en área foliar final por hoja y por planta pueden deberse, entre otros motivos, a diferencias en el número de hojas por planta. Es decir, las plantas con mayor reducción en el área foliar final en las hojas 4, 8 y 12 podrían compensar esta disminución con un mayor número de hojas.

La salinidad afectó en forma diferencial las hojas iniciadas antes, durante y después de la imposición del estrés. Así, si bien se desprende de la Figura 3.3 que el área foliar final fue afectada en todos los genotipos y en todas las posiciones de la hoja, las hojas 8 y, especialmente, la hoja 12, presentaron mayores diferencias en área foliar final entre plantas control y salinizadas. La tasa máxima absoluta también fue afectada en mayor medida en las hojas que estuvieron sometidas a salinidad desde sus inicios, como lo son la hoja 12 (Figura 3.3) y la hoja 10 (Figura 3.5). Los trabajos en girasol bajo estrés hídrico mostraron las mismas respuestas en área foliar final y máximas tasas de expansión foliar bajo estrés hídrico (Pereyra-Irujo *et al.*, 2008). Las hojas 8 en adelante (hojas 10, 12, 14 y 16) tuvieron mayores diferencias en estas variables que las hojas 2, 4 y 6. En este caso, el estudio fue realizado solamente para los genotipos HAR2 y HA64, mostrando mayores diferencias en las variables estudiadas en el genotipo HAR2 que en el genotipo HA64 (Pereyra-Irujo *et al.*, 2008). Sadras *et al.* (1993) trabajando con el híbrido de girasol Sungro 380, estudió los cambios en tasas relativas de expansión foliar por déficit hídrico y calculó una tasa relativa promedio de 5 hojas tomadas en toda la planta, a diferencia de nuestro trabajo en donde los análisis fueron realizados hoja por hoja. Además, cabe destacar que en el trabajo de Sadras, la imposición del estrés fue cuando se inicio la hoja 16, es decir, en un estado fenológico muy avanzado del cultivo. Las hojas estudiadas por ellos seguramente estuvieron parcialmente sometidas a estrés hídrico. Por otra parte, Andrade *et al.* (1993), trabajando con el efecto de la compactación del suelo sobre la expansión foliar, las tasas relativas de expansión y las relaciones hídricas en el cultivar Arlessa, mencionan un

parámetro que ellos denominan tasa de expansión foliar de toda la planta, que no es más que un promedio de las tasas de todas las hojas, perdiendo así capacidad analítica. La mayor sensibilidad de las hojas 12 y 8 en comparación con la 4 radica en que los primeros estadios de las hojas serían los determinantes del tamaño foliar final, ya que según Granier y Tardieu (1998), el tamaño de la hoja queda determinado tempranamente y tanto en girasol (Granier y Tardieu, 1998) como en *Arabidopsis* (Cookson *et al.*, 2005) el tamaño final fue correlacionado con la máxima tasa de expansión foliar y el número de células. Consecuentemente, los determinantes de los cambios en el resto de las variables estudiadas de la dinámica de la expansión foliar (duración de la expansión foliar, momento de emergencia de la hoja, máximas tasas absolutas de expansión foliar) se vieron afectadas en diferente medida según el momento de la ontogenia de la hoja en el cual se aplicó el estrés salino.

Para finalizar esta sección, en esta tesis también se estudiaron las dos variables que regulan las mermas en área foliar final por estrés salino: el efecto de la tasa de expansión foliar, que al disminuir, determina una menor área foliar, y el efecto de la prolongación de la duración de la expansión foliar, que puede compensar la disminución del efecto tasa y hacer que las mermas producidas por las menores tasas de expansión foliar, sean morigeradas por un aumento en el tiempo de expansión. Sin embargo, en este trabajo, no se detectaron diferencias entre genotipos en la variable “efecto prolongación de la duración sobre el área foliar final”. Esto causó que aquellos genotipos que más disminuyeron sus tasas de expansión, fueran los que más disminuyeron el área foliar final (Figuras 3.3, 3.4 y 3.5). Estos resultados contrastan con los encontrados por Pereryra-Irujo *et al.* (2008) bajo déficit hídrico. En estrés hídrico el genotipo HAR2 tuvo un efecto prolongación de la duración de la expansión, según el experimento, de entre un 15 y un 20 % mientras que HA64 solamente lo tuvo en un rango de valores de 5-7 %. Pueden ser varios los mecanismos que determinaron que estos genotipos tuviesen distinta respuesta ante estrés hídrico y en salinidad. Es posible que la componente tóxica presente en salinidad, sume un efecto negativo adicional al estrés hídrico y sea responsable de esta diferencia.

División y expansión celular en salinidad

Los factores determinantes del crecimiento foliar y su coordinación han sido revisados y explicados holísticamente por Pantin *et al.* (2012). Las relaciones hídricas, el suministro de cadenas carbonadas por parte de las fuentes, el ajuste osmótico, las señales hormonales, entre otras, controlan la expansión foliar. En nuestro trabajo se pudo determinar cómo los cambios en las tasas de división celular y expansión celular afectaron de modo diferencial la expansión foliar en genotipos de girasol contrastantes en inclusión foliar de Na⁺ bajo estrés salino (Tabla 3.2).

Numerosos trabajos han abordado la temática de la expansión foliar y las tasas de división y expansión celular, y cómo son afectadas ante condiciones estresantes del medio. Los mecanismos celulares que intervienen en el control de la expansión foliar han sido estudiados intensivamente, y fueron resumidos por Volkenburgh (1999). El crecimiento en expansión depende de: 1) la capacidad de captar agua por parte del tejido (asociada a su capacidad de generar diferencias de potencial hídrico con la fuente de agua, y a permitir el ingreso de la misma), 2) las propiedades reológicas de sus paredes (Ray, 1987). Las limitantes mecánicas e hidráulicas al crecimiento foliar en salinidad han sido analizadas por Fricke (2002) quien destaca el rol del suministro de solutos a la zona en expansión en cereales para el mantenimiento del crecimiento y sugiere limitaciones por destino, más que por fuente, a la expansión foliar. El tamaño foliar es importante desde que éste impacta en la eficiencia fotosintética y la acumulación de biomasa (Marcotrigiano *et al.*, 2010). El tamaño final que una hoja alcanza está determinado por una combinación del número de células, tamaño celular, y de espacios intercelulares (Marcotrigiano *et al.*, 2010). No existe consenso en cuanto a si es el órgano el que determina el número o tamaño celular o viceversa. La visión “purista” es aquella que sostiene la “teoría organismal” (Kaplan y Hagemann, 1991), relegando las células a llenar un “espacio de desarrollo” para un órgano cuyo tamaño y forma están regulados a un nivel mayor. Es decir, el número y tamaño de las células lo “deciden” el tamaño que tendrán las hojas. Para Kaplan (2001), la división celular se desprende de la morfogénesis. Opuestamente y contrariamente, los postulantes

de una “teoría celular” (revisado por Kaplan, 1992) otorgan a las células individuales “la toma de decisión” desde que son ellas las que construyen un órgano por medio de la proliferación celular. La evidencia experimental sugiere que el control del tamaño y forma del órgano tiene componentes de ambas teorías (Meyerowitz, 1996; Marcotrigiano, 2001; Tsukaya, 2002; Fleming, 2006). Pareciera que las células “censan” su posición mediante la recepción de “señales” de sus vecinas, consecuentemente señalizando a ellas sus planos de división, tasas de división, tamaño celular, y en algunos casos su destino de desarrollo (Marcotrigiano *et al.*, 2010). A partir de los datos reportados en esta tesis, se concluye que las determinantes en las disminuciones en expansión foliar estuvieron dadas tanto por una merma en el tamaño de células como por una disminución en las tasas de división celular y consecuentemente, un menor número de células. El genotipo HAR1 vio comprometida su área foliar final en estrés salino de una manera más pronunciada que el genotipo HAR2 por una mayor reducción en las tasas de división celulares (Tabla 3.2, Figura 3.7).

Otros trabajos han reportado mermas en las tasas de expansión foliar en girasol por efectos de otros estreses abióticos, como lo son el estrés por compactación (Andrade *et al.*, 1993), déficit hídrico (Casadebaig *et al.*, 2008), deficiencia nitrogenada (Radin y Boyer, 1982; Palmer *et al.*, 1996), salinidad (Rawson y Munns, 1984) y por estrés hídrico (Sadras *et al.*, 1993).

Neuman *et al.* (1988) trabajaron con poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) y, salinizando las semillas con 50 y 100 mM de NaCl, encontraron una disminución de la tasa de expansión de células de hojas por inducción con luz en hojas, en un periodo de tiempo de 3 días. Este decrecimiento puede haber sido causado por uno de los dos parámetros de crecimiento celular: extensibilidad de la pared y turgencia. La extensibilidad de las paredes fue medida con la técnica del Instron. La salinidad no disminuyó la extensibilidad y causó un pequeño incremento relativo a las 72 horas. Lo que si se afectó fuertemente fue la turgencia de las células; el ajuste osmótico fue más que compensado con una disminución del potencial de tensión del xilema y del potencial soluto apoplástico, resultando en una disminución del potencial hídrico de la hoja. En conclusión, en plántulas de poroto, la salinidad media afectó inicialmente la expansión foliar por una reducción en la turgencia más que una reducción en la extensibilidad de las paredes celulares. Además, la

salinización en un período prolongado de tiempo con 100 mM de NaCl (10 días) resultó en un aparente ajuste mecánico, es decir, un incremento en la extensibilidad de la pared celular, lo cual pudo ayudar a compensar las reducciones en la turgencia y mantener las tasas de crecimiento foliar (Neuman *et al.*, 1988). Cabe aclarar que el área foliar medida por estos autores a través del tiempo no mostró un ajuste de tipo sigmoideo, sino más bien exponencial asintótico. Sería de interés abordar en futuros estudios si la salinidad impone cambios en la extensibilidad de las paredes celulares de girasol, tal como propuso Neuman para poroto bajo el mismo estrés.

La reducción de las tasas de expansión foliar en girasol bajo déficit hídrico ha sido relacionado con un decrecimiento en la tasa de división celular (Schuppler *et al.*, 1998; Granier *et al.*, 2000). En ninguno de los trabajos mencionados se indaga acerca de la posible incidencia de la acumulación de Na⁺ sobre las divisiones y expansión celular. En este trabajo se afectaron tanto las tasas de expansión como de división celular. Las tasas de división celular fueron más afectadas en el genotipo HAR1 y debido a que las tasas de expansión celular se afectaron en HAR2 y HAR1 en la misma intensidad, fue HAR1 el que tuvo una mayor disminución del área foliar final (Figuras 3.9 y 3.10).

La salinidad afectó en igual magnitud la tasa relativa de expansión celular en los genotipos contrastantes en inclusión foliar de Na⁺. En el caso de estudio para déficit hídrico, las tasas se afectaron de manera diferente (Pereyra-Irujo *et al.*, 2008). El genotipo HAR2 vio más afectada la tasa relativa de expansión celular que el genotipo HA64 (Pereyra-Irujo *et al.*, 2008). En estrés hídrico, los genotipos mostraron diferentes respuestas en la tasa de expansión celular, mientras que en salinidad, las magnitudes de los cambios en esta variable para dos genotipos contrastantes en inclusión foliar de Na⁺ fueron similares. La tasa relativa de división celular fue más afectada en estrés hídrico en HAR2 que en HA64 (Pereyra-Irujo *et al.*, 2008). En nuestro caso, el genotipo excluyente (HAR2) comprometió en menor medida sus tasas relativas de divisiones celulares (Figura 3.7) que el genotipo incluyente foliar de Na⁺ (HAR1, Figura 3.7).

Concluyendo, podemos decir que los genotipos contrastantes en inclusión foliar de Na^+ mostraron respuestas en diverso grado para la variable disminución en el área foliar final. Dichas diferencias se debieron a disminuciones mayores en las tasas relativas de división celular del genotipo HAR1 (incluyente) que del genotipo excluyente (HAR2). Como las mermas en las tasas de divisiones celulares que determinaron una mayor disminución del área foliar en HAR1 que en HAR2 se dieron en estadios iniciales de la ontogenia de la hoja 8, que coincide con el inicio de la salinización, indicaría que estas diferencias podrían estar causadas por déficit hídrico (mermas en el potencial osmótico). Esto coincide con lo reportado por Munns (2002) quién indica que las modificaciones iniciales en expansión foliar por salinidad son atribuibles mayormente a déficit hídrico (Munns, 2002). Granier y Tardieu (1999) trabajando con el híbrido Albena de girasol demostraron que el estrés lumínico puede afectar diferencialmente las tasas de división y expansión celular en la hoja 8 de girasol. Ellos demostraron que la expansión foliar y la división celular son afectadas por deficiencia de luz antes pero no después de la declinación en las tasas de división celular.

Cambios en el índice estomático

Ante déficit hídrico, al igual que el estrés osmótico impuesto por el estrés salino, las plantas responden reduciendo su tasa de transpiración (Pereyra-Irujo *et al.*, 2008). Dependiendo de la especie considerada y del genotipo estudiado, la reducción de la tasa transpiratoria puede realizarse por cierre estomático como ocurre en girasol (Tardieu y Davies, 1992), o por marchitamiento/enrollado de la hoja como en el caso de gramíneas (O'Toole y Cruz, 1980). La salinidad modificó el índice estomático en ambos genotipos, disminuyéndolo en HAR2 y aumentándolo en HAR1 (Tabla 3.3). La menor cantidad de estomas podría haber provocado una menor tasa transpiratoria en el genotipo excluyente, lo cual podría haber sido un mecanismo para una menor entrada de Na^+ por flujo masal dentro de los tejidos vegetales, especialmente, aquellos con activa transpiración como lo son las hojas. Queda pendiente determinar la tasa transpiratoria en ambos genotipos para

poder corroborar este supuesto que surge a partir de los resultados de esta tesis. Muchos estudios han demostrado que el control estomático sobre la transpiración que media sobre el flujo iónico hacia el vástago, podría demorar la aparición de síntomas de fitotoxicidad en estrés salino, mientras que le permitiría a la planta adaptarse a condiciones ambientales desfavorables (Moya *et al.*, 1999; Dalton *et al.*, 2000; Maggio *et al.*, 2007). Sin embargo, mientras que la adaptación vía cierre estomático puede ser ventajosa en situaciones de estrés cortas (horas, días), para hacer frente al estrés osmótico y minimizar la pérdida de agua, este mecanismo podría impactar negativamente en el rendimiento en la estación de crecimiento, ya que una reducida conductancia estomática también puede restringir el suministro de CO₂. Esta es la razón por la que las estrategias para mejorar la tolerancia al estrés salino vía la manipulación de la conductancia estomática han sido raramente exitosas (Thompson *et al.*, 2007). Se ha demostrado recientemente que una reducida densidad estomática puede compensar parcialmente el “trade-off” entre el crecimiento de la planta y la adaptación (Ouyang *et al.*, 2010) y consecuentemente puede ser ventajosa bajo el estrés salino (Orsini *et al.*, 2012).

Es de esperar que las hojas más chicas tengan mayores densidades estomáticas debido al apretado empaquetamiento de los estomas dado por una reducida expansión de las células epidérmicas (Beerling y Chaloner, 1993). Lo propuesto por Beerling y Chaloner (1993) pudo corroborarse en esta tesis para HAR1 que aumentó esta variable significativamente pero no para HAR2, la cual aumentó su valor de densidad estomática, pero los cambios no fueron significativos, al menos al nivel estadísticos estudiado ($p < 0,05$) (Tabla 3.3). El índice estomático en salinidad podría haber sido afectado por diferentes mecanismos. Uno de ellos el menor potencial hídrico (estrés osmótico) impuesto por la salinidad. Así, las mermas en dicho potencial podrían haber generado un menor gradiente de potencial agua entre el medio y los tejidos en pleno crecimiento, y esto podría haber tenido como consecuencia una menor presión de turgencia por parte de las células en expansión, obteniéndose así células más pequeñas. Analizando desde el número de células epidérmicas totales y el número de estomas, la señalización inicial mediada por ABA desde las raíces podría haber provocado mermas en las tasas de divisiones celulares por medio de la vía hormonal. El efecto tóxico provocado por las sales en las células

epidérmicas y meristemoides de la hoja 8 podrían haber interferido en el normal metabolismo de las mismas, provocando menores tasas de divisiones en dichos tejidos en activo crecimiento y en activa multiplicación celular.

Cambios en las variables anatómicas y fisiológicas de la expansión foliar que ocurren durante la ontogenia de la hoja

En esta sección se estudiaron los cambios ocurridos a nivel foliar y en distintas posiciones fitomerales en plantas sometidas a estrés salino. Es de destacar, a nivel general y para un amplio rango de especies, las diferentes dinámicas que ocurren en la hoja durante su ontogenia. Los cambios durante la ontogenia de la hoja fueron muy bien resumidos por Pantin *et al.* (2012) y se ilustran en la figura 3.9. En la misma pueden observarse numerosas variables estudiadas en el presente capítulo y relacionadas con los cambios en las mismas bajo estrés salino y la correlación de estos cambios con la inclusión foliar de Na^+ en hojas de diferentes genotipos. Algunas de las variables que se ilustran y que fueron determinadas en este capítulo son: área foliar en función del tiempo, número de células por hoja, tamaño celular, tasas absolutas de expansión foliar, tasas relativas de expansión foliar, área foliar específica (que es el recíproco de LMA, materia seca específica), densidad estomática, número de células por hoja e índice estomático. Esta figura resume con claridad la enorme cantidad de cambios que acontecen en la ontogenia de la hoja y que determinan el área foliar final y la capacidad de captar carbono, que es el fin último de los tejidos fotosintéticamente activos que con la translocación de los mismos permitirán un rendimiento en grano. De la figura 3.9 se desprende que: 1) la capacidad de la hoja de ser “destino” de carbohidratos, 2) los cambios en las tasas absolutas y relativas de expansión foliar, 3) los cambios en la extensibilidad de las paredes celulares, y 4) los cambios en las variables y parámetros estomáticos, todos juntos, determinan la dinámica de la expansión foliar. Las variables estudiadas área foliar total por planta, materia seca acumulada y su partición, materia seca de raíces, porcentaje de hoja muerta y concentraciones foliares de Na^+ , nos permitieron caracterizar (a corto y largo plazo) los genotipos estudiados por su tolerancia a la salinidad en el capítulo anterior (a corto y largo plazo) y correlacionar la inclusión foliar de Na^+ con cambios en las variables presentadas en la figura 3.9. (que

también se estudiaron en este capítulo: materia seca foliar, área foliar por hoja y por planta, área foliar específica, duración de la expansión foliar, momento de emergencia de las hojas, máximas tasas absolutas de expansión foliar y momento en el que ocurre, dinámicas de las áreas y número de células, dinámica de las tasas de expansión y divisiones celulares, densidades de células epidérmicas y estomáticas e índice estomático).

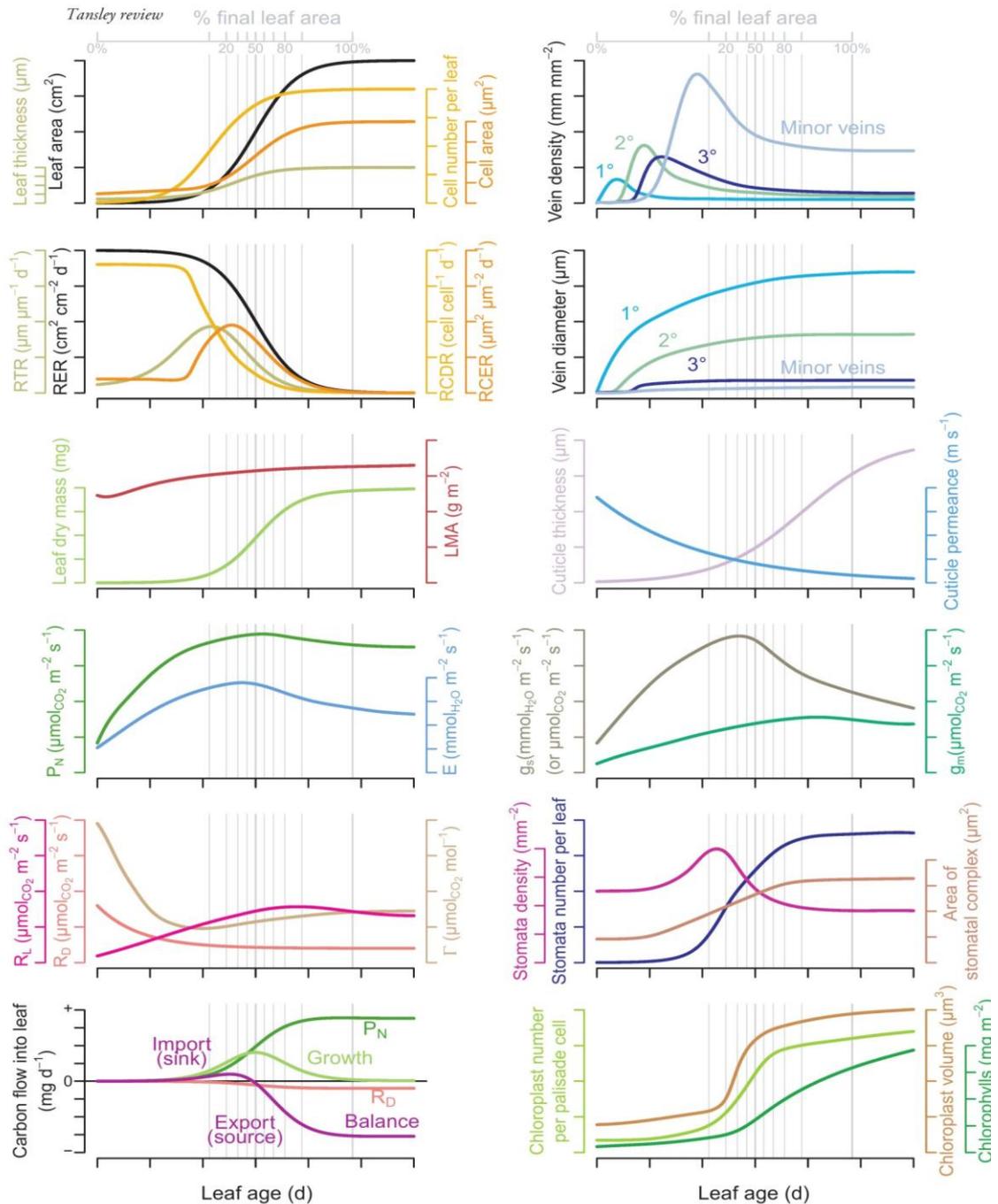


Fig. 3.9. Dinámica de eventos anatómicos, fisiológicos y de desarrollo que ocurren durante la ontogenia de la hoja. Estas curvas fueron realizadas para sintetizar los valores de un amplio rango de especies obtenidas de la literatura científica (Šesták, 1985; Kriedmann, 1986; Turgeon, 1989; Granier y Tardieu, 2009; Sack *et al.*, 2012). Adaptado de Pantin *et al.* (2012).

CONCLUSIONES

Hubo cambios por salinidad en los parámetros área foliar por hoja, materia seca foliar y área foliar específica en distintas hojas en el perfil de la planta. De los cuatro genotipos analizados, los menos incluyentes de Na^+ foliar mantuvieron el AFE, mientras que los incluyentes, disminuyeron el AFE por salinidad.

Los genotipos menos incluyentes vieron afectadas en mayor medida las variables de la dinámica de la expansión foliar, especialmente el área foliar final y las máximas tasas absolutas de expansión foliar.

Al analizarse los efectos de las tasas de la expansión foliar y de la prolongación de la expansión foliar bajo salinidad, no se pudo determinar la existencia de un mecanismo compensador que morigere los efectos de las tasas de expansión foliar sobre las mermas en área foliar final por salinidad. Estos hallazgos contrastan con los encontrados para los mismos genotipos, especialmente HAR2 y HA64 bajo déficit hídrico. La componente tóxica y cambios hormonales distintos a los acontecidos bajo déficit hídrico, podrían ser los causales de las diferentes respuestas frente a estrés hídrico y salino.

No hubo correlación entre las variables de la dinámica de la expansión foliar y la acumulación foliar de Na^+ . Genotipos tolerantes a la salinidad en respuesta a corto y largo plazo (como HAR2, capítulo II) no presentaron las mismas respuestas al analizarse la dinámica de la expansión foliar en las hojas 4, 8 y 12. Las disminuciones más pronunciadas en el área foliar de las hojas iniciadas antes, durante y después de la imposición de la salinidad (hojas 4, 8 y 12), no coincidieron con los genotipos más incluyentes foliares de Na^+ . Aquellos genotipos más incluyentes foliares de Na^+ (HAR1 y HA64) presentaron diferencias estadísticamente significativas en esta variable, entre hojas de plantas control y salinizadas pero en menor proporción que los genotipos menos

incluyentes foliares de Na^+ . HAR2 y HAR5, que fueron los genotipos menos incluyentes foliar de Na^+ , tuvieron mayores disminuciones en las áreas foliares de las hojas 4, 8 y 12. El genotipo HAR2, que fue el de tolerancia a salinidad determinada en el Capítulo II y que fue el que menos disminuyó su área foliar total por planta (capítulo II), no tuvo las mismas respuestas al analizar la disminución en área foliar de la hoja 4, 8 y 12 por salinidad. Por otro lado, HA64, que fue el genotipo que quedó segundo en el ranking de tolerancia a largo y corto plazo (capítulo II) parecería haber sido, a pesar de incluir mucho Na^+ en hojas, el genotipo que menos disminuyó porcentualmente su área foliar final de las hojas 4, 8 y 12. También es de destacar que los genotipos menos incluyentes que presentaron mayor disminución en el área foliar de las hojas iniciadas antes, durante y después de la salinización, no fueron los que quedaron primeros en el ranking de tolerancia a salinidad. HAR2 sí lo fue, pero sin embargo HAR5 (que incluye poco Na^+ en laminas foliares) fue el último en el ranking de tolerancia a salinidad en el corto y largo plazo.

Los experimentos en invernadero validaron los hallazgos realizados en cámaras de crecimiento, especialmente en los genotipos que se utilizaron en ambas condiciones como HA64 y HAR2. Los genotipos incluyentes en invernadero tuvieron las mismas respuestas en los cuatro parámetros estudiados de la dinámica de la expansión foliar con los estudiados en cámaras de crecimiento.

Los cambios en área foliar final bajo salinidad estuvieron modulados por cambios en las tasas de expansión y división celular. El genotipo incluyente presentó mayores disminuciones en las tasas de división celulares, resultando en una mayor disminución en el área foliar final por salinidad. En este experimento sí pudo encontrarse correlación entre inclusión foliar de Na^+ y respuesta en la dinámica de las variables celulares en genotipos contrastantes en inclusión foliar de Na^+ . Lo mismo sucedió con el cambio en variables estomáticas. El índice estomático disminuyó en el genotipo excluyente (HAR2) y aumento en el incluyente (HAR1). Se hipotetiza que el aumento en el índice estomático en el genotipo incluyente podría haber aumentado el flujo transpiratorio, lo que con el flujo masal de agua podría haberse acumulado mayor cantidad de Na^+ en hoja, siendo esta falta

de adaptación en los índices estomáticos, la posible causa para que el genotipo sea incluyente y HAR2 fuera excluyente. Restan realizar mediciones de conductancia estomática y flujo transpiratorio para poder contestar las nuevas preguntas que surgen de los resultados de esta tesis.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Alkio M., Schubert A., Diepenvrock W. and Grimm E. 2003. Effect of source–sink ratio on seed set and filling in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Pl. Cell Environ.* 26: 1609-1619.
- Andrade A., Wolfe D. W. and Fereres E. 1993. Leaf expansion, photosynthesis, and water relations of sunflower plants grown on compacted soil. *Pl. Soil* 149: 175-184.
- Andrade F. H. and Ferreiro M. A. 1996. Reproductive growth of maize, sunflower and soybean at different source levels during grain filling. *Field Crop Res.* 48: 155-165.
- Andrade F. H., Calvino P., Cirilo A. and Barbieri P. 2002. Yield responses to narrow rows depend on increased radiation interception. *Agron. J.* 94: 975–980.
- Andriankaja M., Dhondt S., De Bodt S., Vanhaeren H., Coppens F., De Milde L., Mühlenbock P., Skirycz A., Gonzalez N., Beemster G. T. S. *et al.* 2012. Exit from proliferation during leaf development in *Arabidopsis thaliana*: a not-so-gradual process. *Developm. Cell* 22: 64–78.
- Beerling D. J. and Chaloner W. G. 1993. The impact of atmospheric CO₂ and temperature change on stomatal density: Observations from *Quercus robur* lamma leaves. *Ann. Bot.* 71: 231-235.
- Casadebaig P., Debaeke P. and Lecoeur J. 2008. Thresholds for leaf expansion and transpiration responses to soil water deficit in a range of sunflower genotypes. *Eur. J. Agron.* 28: 646-654.
- Cookson S. J., Van Lijsebettens M. and Granier C. 2005. Correlation between leaf growth variables suggest intrinsic and early controls of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Pl. Cell Environ.* 28: 1355-1366.
- Dale J. E. 1988. The control of leaf expansion. *Annu. Rev. Pl. Physiol. Pl. Mol. Biol.* 39: 267–295.
- Dalton F. N., Maggio A. and Piccinni G., 2000. Simulation of shoot chloride accumulation: separation of physical and biochemical processes governing plant salt tolerance. *Pl. Soil* 219: 1–11.
- Dosio G. A. A., Aguirrezabal L. A. N., Andrade F. H. and Pereyra V. R. 2000. Solar radiation intercepted during seed filling and oil production in two sunflower hybrids. *Crop Sci.* 40: 1637-1644.
- Dosio G. A. A., Rey H., Lecoeur J., Izquierdo N. G., Aguirrezabal L. A. N., Tardieu F. and Turc O. 2003. A whole-plant analysis of the dynamics of expansion of individual leaves of two sunflower hybrids. *J. Exp. Bot.* 54: 2541-2552.
- Fleming A. J. 2006. The integration of cell proliferation and growth in leaf morphogenesis. *J. Pl. Res.* 119: 31-36.
- Francois, E. 1996. Salinity effects on four sunflower hybrids. *Agron. J.* 88: 215-219.
- Fricke W. 2002. Biophysical limitation of cell elongation in cereal leaves. *Ann. Bot.* 90: 157-167.
- Garnier E., Shipley B., Roumet C. and Laurent G. 2001. A standardized protocol for the determination of specific leaf area and leaf dry matter content. *Funct. Ecol.* 15: 688–695.
- Granier C. and Tardieu F. 1998. Spatial and temporal analyses of expansion and cell cycles in sunflower leaves. *Pl. Physiol.* 116: 991-1001.

- Granier C. and Tardieu F. 1999. Water deficit and spatial pattern of leaf development. Variability in responses can be simulated using a simple model of leaf development. *Pl. Physiol.* 119:609-620.
- Granier C., Turc O. and Tardieu F. 2000. Co-ordination of cell division and tissue expansion in sunflower, tobacco, and pea leaves: dependence or Independence of both processes? *J. Pl. Growth Regul.* 19: 45-54.
- Granier C. and Tardieu F. 2009. Multi-scale phenotyping of leaf expansion in response to environmental changes: the whole is more than the sum of parts. *Pl. Cell Environ.* 32: 1175–1184.
- Gudesblat G. E., Schneider-Pizón J., Betti C., Mayerhofer J., Vanhoutte I., van Dongen W., Boeren S., Zhiponova M., de Vries S., Jonak C. and Russinova E. 2012. SPEECHLESS integrates brassinosteorid and stomata signalling pathways. *Nature (Cell Biology)* DOI: 10.1038/ncb2471.
- Hsiao T. C., Acevedo E. and Henderson D.W. 1970. Maize leaf elongation: continuous measurements and close dependence on plant water status. *Science* 168: 590–591.
- InfoStat. 2009. InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba. Argentina.
- Johnson B. J. 1972. Effect of artificial defoliation on sunflower yields and other characteristics. *Agron. J.* 64: 688–689.
- Kang J., Mizukami Y., Wang H., Fowke L. and Dengler N. G. 2007. Modification of cell proliferation patterns alters leaf vein architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 226: 1207–1218.
- Kaplan D. R. 1992 . The relationship of cells to organisms in plants: Problems and implications of an organismal perspective. *Int. J. Pl. Sci.* 153 : S28- S37 .
- Kaplan D. R. 2001 . Fundamental concepts of leaf morphology and morphogenesis: A contribution to the interpretation of molecular genetic mutants. *Int. J. Pl. Sci.* 162: 465 – 474 .
- Kaplan D. R. and Hagemann W . 1991 . The relationship of cell and organism in vascular plants — Are cells the building blocks of plant form? *Bioscience* 41: 693-703 .
- Kazama T., Ichihashi Y., Murata S. and Tsukaya H. 2010. The mechanism of cell cycle arrest front progression explained by a KLUH/CYP78A5-dependent mobile growth factor in developing leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Pl. Cell Physiol.* 51: 1046–1054.
- Kriedemann P. E. 1986. Stomatal and photosynthetic limitations to leaf growth. *Austral. J. Pl. Physiol.* 13: 15–31.
- Maggio A., Raimondi G., Martino A. and De Pascale S. 2007. Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environ. Exp. Bot.* 59, 276–282.
- Marcotrigiano M. 2001 . Genetic mosaics and the analysis of leaf development. *Int. J. Pl. Sci.* 162 : 513 – 525 .
- Marcotrigiano M. 2010. A role for leaf epidermis in the control of leaf size and the rate and extent of mesophyll cell division. *Am. J. Bot.* 97: 224-233.
- Meyerowitz E. M. 1996. Plant development: Local control, global patterning. *Curr. Op. Gen. Developm.* 6 : 475-479 .
- Moya J. L., Primo-Millo E. and Talon M. 1999. Morphological factors determine salt tolerance in citrus seedlings: the shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. *Pl. Cell Environ.* 22: 1425–1433.
- Muller B., Stosser M. and Tardieu F. 1998. Spatial distribution of tissue expansion and cell division rates are related to irradiance and to sugar content in the growing zone of maize roots. *Pl. Cell Environ.* 21: 149-158.

- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt y water stress. *Pl. Cell Environ.* 25: 239-250.
- Munns R. and Termaat A. 1986. Whole-plant responses to salinity. *Austral. J. Pl. Physiol.* 13: 143-160.
- Neumann P., Van Volkenburgh E. and Cleland R. 1988. Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. *Pl. Physiol.* 88: 233-237.
- Orsini F., Alnayef M., Bona S., Maggio A. and Gianquinto G. 2012. Low stomatal density and reduced transpiration facilitate strawberry adaptation to salinity. *Environ. Exp. Bot.* 81: 1-10.
- O'Toole J. and Cruz R. 1980. Response of leaf water potential, stomatal resistance, and leaf rolling to water stress. *Pl. Physiol.* 65: 428-432.
- Ouyang S. Q., Liu Y. F., Liu P., Lei G., He S. J., Ma B., Zhang W., Zhang J. S. and Chen S.Y. 2010. Receptor-like kinase OsSIK1 improves drought and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*) plants. *Pl. J.* 62: 316-329.
- Palmer S. J., Berridge D. M., McDonald A. J. S. and Davies W. J. 1996. Control of leaf expansion in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by nitrogen nutrition. *J. Exp. Bot.* 47: 359-368.
- Pantin F., Simonneau T. and Muller B. 2012. Coming on leaf age: control of growth by hydraulics and metabolic during leaf ontogeny. *New Phytol.* 196: 349-366.
- Patrick J. W. 1988. Assimilate partitioning in relation to crop productivity. *Hortscience* 23: 33-40.
- Pereyra-Irujo G. A., Velazquez L., Lechner L. and Aguirrezábal L. A. N. 2008. Genetic variability for leaf growth rate and duration under water deficit in sunflower: analysis of responses at cell, organ, and plant level. *J. Exp. Bot.* 59: 2221-2232.
- Radin J. W. and Boyer J. S. 1982. Control of leaf expansion by nitrogen nutrition in sunflower plants. *Pl. Physiol.* 69: 771-775.
- Rawson H. M. and Munns R. 1984. Leaf expansion in sunflower as influenced by salinity and short-term changes in carbon fixation. *Pl. Cell Environ.* 7: 207-213.
- Ray P. M. 1987. Principles of plant cell expansion. En: Physiology of cell expansion during plant growth. Cosgrove and D. J. and Kneivel D. P., (eds). American Society of Plant Physiologists, Bethesda, pp 1-27.
- Reymond M., Muller B., Leonardi A., Charcosset A. and Tardieu F. 2003. Combining quantitative trait loci analysis and an ecophysiological model to analyze the genetic variability of the responses of maize leaf growth to temperature and water deficit. *Pl. Physiol.* 131: 664-675.
- Rodrigues Pereira A. S. 1978. Effects of leaf removal on yield components in sunflower. *Netherlands J. Agric. Sci.* 26: 133-144.
- Rodríguez A., Ortega L., Córdoba A. and Taleisnik E. 2004. Decreased reactive oxygen species concentration in the elongation zone contributes to the reduction in maize leaf growth under salinity. *J. Exp. Bot.* 53: 1383-1390.
- Rodríguez A., Lascano H. R., Bustos L. and Taleisnik E. 2007. Salinity-induced reductions in nadph oxidase activity in the maize leaf blade elongation zone. *J. Pl. Physiol.* 164: 223-230.
- Sack L., Scoffoni C., McKown A. D., Frole K., Rawls M., Havran J. C., Tran H. and Tran T. 2012. Developmentally based scaling of leaf venation architecture explains global ecological patterns. *Nat. Com.* 3: 837.

- Sadras V. O., Villalobos F. J., Fereres E. and Wolfe D. W. 1993. Leaf responses to soil water deficits: Comparative sensitivity of leaf expansion rate and leaf conductance in field-grown sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Pl. Soil* 153: 189-194.
- Saranga Y., Horcicka P. and Wolf S. 1996. Effect of source–sink relationship on yield components and yield of confection sunflower. *Helia* 19: 29–38.
- Scarpella E., Francis P. and Berleth T. 2004. Stage-specific markers define early steps of procambium development in *Arabidopsis* leaves and correlate termination of vein formation with mesophyll differentiation. *Development* 131: 3445–3455.
- Schneider A., Jones J.M. and Hammond J. J. 1987. Simulated hail research in sunflower: defoliation. *Agron. J.* 79: 431-434.
- Schuppler U., He P. H., John P. C. L. and Munns R. 1998. Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cellcycle kinase activity in wheat leaves. *Pl. Physiol.* 117: 667-678.
- Šesták Z. 1985. Photosynthesis during leaf development. Dr. W. Junk Publishers. Dordrecht, the Netherlands.
- Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58: 221-227.
- Sokal R. R. and Rohlf F. J. 1971. Biometry. 2nd. Ed. W. H. Freeman, San Francisco.
- Tardieu F. and Davies W.J. 1992. Stomatal response to abscisic-acid is a function of current plant water status. *Pl. Physiol.* 98: 540–545.
- Tardieu F., Granier C. and Muller B. 1999. Modelling leaf expansion in a fluctuating environment: are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate?. *New Phytol.* 143: 33-43.
- Thompson A. J., Andrews J., Mulholland B. J., McKee J. M., Hilton H. W., Horridge J. S., Farquhar G. D., Smeeton R. C., Smillie I. R., Black C. R. and Taylor I. B. 2007. Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Pl. Physiol.* 143: 1905–1917.
- Tsukaya , H. 2002 . Interpretation of mutants in leaf morphology: Genetic evidence for a compensatory system in leaf morphogenesis that provides a new link between cell and organismal theory. *Int. Rev. Cytol.* 217 : 1-39 .
- Turgeon R. 1989. The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Pl. Physiol. Pl. Mol. Biol.* 40: 119-138.
- Volkenburgh E. V. 1999. Leaf expansion: an integrating plant behaviour. *Pl. Cell Environ.* 2: 1463-1473.
- Walter A., Silk W. K. and Schurr U. 2009. Environmental effects on spatial and temporal patterns of leaf and root growth. *Annu. Rev. Pl. Biol.* 60: 279–304.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar los mecanismos de tolerancia a la salinidad en girasol y correlacionar los cambios en la dinámica de la expansión foliar por salinidad con la inclusión foliar de Na^+ .

ACUMULACIÓN FOLIAR DE Na^+ Y MECANISMOS DE TOLERANCIA A SALINIDAD

1. Todas las líneas en este estudio acumularon Na^+ en toda la planta, sin embargo, las concentraciones foliares de Na^+ fueron significativamente mayores en HAR1, HA64, HA821 y ND761. Los genotipos HAR5, HAR2, HA89 y HAR3 presentaron bajas concentraciones de este ion. Dentro de los genotipos híbridos, se detectaron materiales con muy bajas concentraciones de Na^+ y otros que tuvieron elevadas concentraciones. Los híbridos que más acumularon Na^+ fueron: DK3940, Tritón Max y 50 A 0. También los híbridos SMR 769, 64A89 y CIRO presentaron elevadas concentraciones foliares de Na^+ . Por el contrario, se pudo verificar que ACA885 no acumuló Na^+ en hojas. Por otro lado, SMR779CL, NTO2.0 y Neón acumularon bajas concentraciones de Na^+ en láminas foliares. La salinidad modificó las concentraciones de K^+ de diferente forma para los diversos híbridos estudiados. En general, la salinidad disminuyó las concentraciones foliares de K^+ , con excepción de los híbridos DK4065, SMR769, DK3810, DK3820 y DK3940, donde hubo un aumento no significativo de las concentraciones de este catión por efecto del estrés salino. Por lo tanto y generalizando, puede afirmarse que la marca Dekalb presentó híbridos que incrementaron sus concentraciones foliares absolutas de K^+ en condiciones de estrés salino. Para el caso de las líneas endocriadas, las concentraciones de K^+ y su relación con la cantidad de Na^+ no presentaron valores consistentes. Finalmente se pudo corroborar la hipótesis de que existirá variabilidad para acumulación foliar de Na^+

tanto en las líneas endocriadas, como en los genotipos híbridos estudiados (hipótesis “a”, capítulo I).

2. La tasa relativa de elongación de plantas (TREPs) fue una variable estudiada para determinar tolerancia al estrés osmótico impuesto por exposiciones no prolongadas a la salinidad. Las TREPs variaron en el caso de las líneas, en el tratamiento control; los genotipos con mayores tasas fueron HA124, HAR3 y HAR2, mientras que los de menores tasa fueron HA821 y HA64. Cabe destacar que dentro de las líneas estudiadas, se destacó el genotipo HA64, que presentó baja estatura y elevada producción de hojas en toda la planta. Inicialmente, tanto las plantas control como las tratadas, de una determinada línea, tuvieron alturas estadísticamente similares y los efectos del tratamiento salino fueron detectados a medida que éste progresaba. Las líneas más afectadas fueron HA821, ND761, HAR1, HAR3, HAR4, HAR5 y HA370, mientras que HA64, HA124, HA89 y HAR2 tuvieron las menores disminuciones de sus tasas comparando cada una de ellas con sus respectivos controles. Dentro de las cuatro líneas seleccionadas que contrastaban en su inclusión foliar de Na^+ (HAR5 y HAR2, poco incluyentes, y HAR1 y HA64, netamente excluyentes) pudo determinarse que HAR2 y HA64 presentaron los mayores valores de un ranking que se estableció para determinar la tolerancia a exposiciones poco prolongadas a salinidad, siendo HAR2 poco incluyente y HA64 netamente incluyente. Además, HAR1 y HAR5, que son líneas muy contrastantes en inclusión foliar de Na^+ , tuvieron el mismo valor en el ranking de respuestas a exposiciones poco prolongadas a salinidad. Con esto queda corroborado, para el caso de las líneas, que los efectos tempranos de la salinidad (estrés osmótico) sobre el crecimiento fueron independientes de la acumulación foliar de Na^+ . Esta hipótesis volvió a confirmarse al estudiar los híbridos contrastantes en inclusión foliar de Na^+ y contrastantes a nivel de daño de membranas. Los híbridos más tolerantes a los efectos tempranos de la salinidad sobre el crecimiento fueron SMR 779 CL y TRITÓN MAX. Estos híbridos son contrastantes en inclusión foliar de Na^+ (SMR 779 CL es poco incluyente y TRITÓN MAX es netamente incluyente foliar de Na^+). Debe destacarse que ambos híbridos concuerdan en que son los que menor daño de membrana presentaron. Opuestamente, ACA 885 y SMR 769 toleraron en menor medida los efectos tempranos de la salinidad sobre el crecimiento. Ambos son contrastantes en inclusión foliar de Na^+ .

Coincide que esta falta de tolerancia al estrés osmótico impuesto por la sal se dio en los híbridos que luego presentaron elevado nivel de daño en sus membranas.

3. En este trabajo también se estudió la acumulación de materia seca, su partición y los cambios generados por salinidad. La salinidad aceleró la ontogenia en las líneas estudiadas. Esto queda reflejado en el aumento de la materia seca de capítulos en condiciones de salinidad. La salinidad adelantó el desarrollo en todos los genotipos híbridos, especialmente en TRITÓN MAX y SMR 769. Ambos son incluyentes foliares de Na^+ , por lo que hubo correlación entre inclusión foliar de este ion y adelantamiento en el desarrollo de las plantas. La materia seca radical cambió su participación sobre el total según el genotipo. Así, en ACA 885 y SMR 769, las raíces disminuyeron su participación por salinidad, mientras que SMR779CL no modificó esta relación y TRITÓN MAX la aumentó. Coincidentemente, los híbridos que bajaron su participación de la materia seca radical sobre el total de la materia seca por planta fueron aquellos dos que presentaron niveles de daño muy elevados.

4. Las relaciones hídricas fueron estudiadas en este manuscrito de tesis. Los valores del contenido relativo de agua (CRA) fueron estadísticamente similares en las cuatro líneas endocriadas en condiciones control. La salinidad disminuyó el CRA en mayor magnitud en los genotipos excluyentes (HAR5 y HAR2), mientras que las disminuciones fueron menos pronunciadas en los incluyentes (HAR1 y HA64). Entre los genotipos híbridos ACA 885 fue el único que no disminuyó significativamente su CRA en condiciones de salinidad (comparado con las plantas control) y TRITON MAX fue el híbrido que más disminuyó su Potencial Osmótico en tales condiciones. Ninguno de los híbridos realizó ajuste osmótico.

5. La tolerancia tisular al Na^+ se evaluó relacionando el porcentaje de hojas muertas (%HM) con relación al contenido foliar de Na^+ en el caso de las 4 líneas endocriadas y midiendo el nivel de daño de membranas, en el caso de los 18 híbridos comerciales. El valor de porcentaje de hojas muertas fue elevado para HAR1 y bajo para HAR2, teniendo

en cuenta que el primero incluyó mayores concentraciones de Na^+ que el segundo, por ende, presentó una mayor tolerancia tisular al Na^+ . Se encontró variabilidad intraespecífica para daño de membranas por efecto de la salinidad en los genotipos híbridos analizados. El híbrido 50A0 fue el que mayor índice de daño de membranas presentó. Coincidentemente, este híbrido fue el que presentó las mayores concentraciones de Na^+ foliares al ser salinizado y el que menor cantidad de K^+ presentó bajo estas condiciones. Otros híbridos que presentaron elevados daño de membranas fueron: SMR769, SMR882, 64A89 y DK3810. El híbrido ACA885 también tuvo elevado daño de membranas y bajas concentraciones foliares de Na^+ por lo que no presentó tolerancia tisular al Na^+ . Los menores valores de daño en membranas se encontraron en los híbridos SMR779CL (genotipo que incluyó bajos contenidos foliares de Na^+), en DK4045 (híbrido intermedio en acumulación foliar de Na^+) y TRITÓN MAX, que presentó elevadas concentraciones foliares de Na^+ . Por lo anterior, puede concluirse que el genotipo HAR1 (dentro de las líneas) y el genotipo TRITÓN MAX (entre los híbridos) resultaron ser los materiales más tolerantes al Na^+ tisular.

6. Se encontró variabilidad intraespecífica para mecanismos de tolerancia a salinidad, tanto para el efecto osmótico de este estrés (respuesta a exposiciones poco prolongadas a la salinidad), como para los efectos de la misma sobre parámetros de crecimiento y daño tisular por efecto de la acumulación del Na^+ (respuestas a exposiciones prolongadas a la salinidad). El daño tisular, provocado por exposiciones prolongadas a la salinidad, se midió relacionando la cantidad de hojas muertas y la concentración tisular de Na^+ (entre las líneas) y por la pérdida de estabilidad de las membranas celulares (en el caso de los híbridos). Se pudo establecer un ranking de tolerancia a salinidad a exposiciones prolongadas a la salinidad, como así también, un ranking teniendo en cuenta las respuestas frente a exposiciones tempranas y prolongadas a la salinidad. En este ranking, las líneas endocriadas más tolerantes fueron HAR2 y HAR1. Ambos son contrastantes en inclusión foliar de Na^+ . Lo mismo pudo determinarse para los híbridos: aquellos más tolerantes, tanto a exposiciones prolongadas como a exposiciones tempranas y prolongadas a la salinidad, fueron SMR779CL (con bajas concentraciones foliares de Na^+) y TRITON MAX (netamente incluyente). Con esto refutamos la hipótesis donde se afirmaba que la

acumulación foliar de Na^+ influirá en los efectos tardíos de la salinidad sobre el crecimiento. Es decir, no hubo correlación entre inclusión foliar de Na^+ y tolerancia a los efectos prolongados de la salinidad (respuestas ante exposiciones prolongadas a la salinidad). Se encontraron tanto en las líneas como en los híbridos, materiales tolerantes, siendo los mismos tanto netamente incluyentes como poco incluyentes foliares de Na^+ .

EXPANSIÓN FOLIAR EN GIRASOL BAJO SALINIDAD. MECANISMOS CELULARES DETERMINANTES DE LOS CAMBIOS EN LA EXPANSIÓN FOLIAR POR SALINIDAD

1. En este trabajo de tesis se evaluaron las áreas foliares y sus disminuciones por la imposición de salinidad. En las cuatro líneas endocriadas evaluadas, la salinidad redujo significativamente las áreas foliares de casi todas las hojas, independientemente de la posición fitomeral, ya sea en hojas iniciadas antes, durante o después de la imposición de la salinidad. Asimismo, disminuyó significativamente la biomasa de todas las hojas y en los cuatro genotipos. Las diferencias entre genotipos radicarón en el área foliar específica. Los genotipos con más elevada inclusión foliar de Na^+ (HAR1 y HA64) fueron los más afectados en su área foliar específica (AFE), mientras que los genotipos menos incluyentes (HAR5 y HAR2) no variaron significativamente su AFE por efecto de la salinidad. El área foliar final disminuyó significativamente en los cuatro genotipos endocriados y en las tres hojas analizadas (hojas 4, 8 y 12). Las diferencias en área foliar final por la aplicación del estrés salino, fueron más acentuadas en la hoja 12, en todos los genotipos (Figura 3.3). Esto pudo deberse a que esta hoja estuvo sometida al estrés salino desde que se inició en el meristema apical, o sea, desde su iniciación. En condiciones control, los genotipos HAR5 y HAR2 presentaron áreas foliares mayores comparados con los genotipos HAR1 y HA64. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas, encontrándose las mayores áreas foliares para HAR5, luego HAR2, HAR1 y por último HA64. Como consecuencia, las tasas absolutas de expansión fueron mayores en los dos primeros genotipos (HAR5 y HAR2). Estas diferencias también fueron estadísticamente significativas entre los dos grupos antes mencionados (HAR5 y HAR2 vs. HAR1 y HA64). Por otra parte, las tasas

relativas no tuvieron grandes diferencias entre tratamientos ni entre genotipos. En cuanto al tiempo en que aparecieron las hojas 4, 8 y 12 (tomando el parámetro °Cd a emergencia foliar desde emergencia de plántulas), como resulta lógico, la hoja 4 fue la primera en aparecer y luego las hojas 8 y 12. La salinidad no aumentó el momento de emergencia de las hojas, salvo en la hoja 12 en los genotipos HAR1 y HAR2.

2. La duración de la expansión foliar y las tasas absolutas de expansión foliar fueron determinadas, ya que ambas influyen de manera antagónica en las mermas en área foliar final por salinidad. Mientras que las disminuciones de las tasas de expansión foliar por salinidad disminuyen el área foliar final, la prolongación de la duración de la expansión foliar compensa, en el caso que existiese tal prolongación, las mermas en área foliar provocadas por las menores tasas de expansión foliar. La duración de la expansión foliar no parecería haber variado teniendo en cuenta el número de hoja. Es decir, tanto las hojas 4, 8 y 12 tuvieron la misma duración, independientemente del genotipo analizado. La salinidad prolongó la duración de la expansión solamente en los genotipos HAR2 y HAR5 y solamente en las hojas 4 y 8. Las máximas tasas absolutas de expansión foliar se evaluaron junto con las duraciones de la expansión foliar. Se encontraron mayores valores para este parámetro en la hoja 12, valores intermedios en la hoja 8 y los menores valores en la hoja 4. La salinidad disminuyó significativamente las tasas absolutas de expansión foliar en la mayoría de los casos. Al igual que lo observado para los valores de las plantas control, las máximas tasas en las plantas salinizadas fueron mayores en las hojas ubicadas en posiciones fitomerales superiores (hoja 12) y los menores valores se dieron en la parte inferior de la planta. A su vez, si bien las diferencias fueron estadísticamente significativas en la mayoría de los casos, pudo observarse mayores diferencias en la hoja 12 en todos los genotipos. Al analizarse los efectos de las tasas de la expansión foliar y de la prolongación de la expansión foliar bajo salinidad, no se pudo determinar la existencia de un mecanismo compensador que morigere los efectos de las tasas de expansión foliar sobre las mermas en área foliar final por salinidad. Estos hallazgos contrastan con los encontrados para los mismos genotipos, especialmente HAR2 y HA64 bajo déficit hídrico. El componente tóxico y los cambios hormonales posiblemente distintos a los acontecidos bajo déficit hídrico, podrían ser los causales de las respuestas diferenciales de estas líneas, cuyas

respuestas en la dinámica de la expansión foliar fueron previamente estudiadas frente a este estrés.

3. No hubo correlación entre las variables de la dinámica de la expansión foliar y la acumulación foliar de Na^+ . Todas las líneas disminuyeron, en forma significativa e independientemente de la concentración foliar de Na^+ de cada una de ellas, sus áreas foliares finales y sus máximas tasas absolutas de expansión foliar, tanto en condiciones controladas (cámara de crecimiento), como en invernadero. Las disminuciones más pronunciadas en el área foliar de las hojas iniciadas antes, durante y después de la imposición de la salinidad (hojas 4, 8 y 12) no coincidieron con los genotipos más incluyentes foliares de Na^+ . Aquellos genotipos que presentaron elevadas concentraciones foliares de Na^+ (HAR1 y HA64) presentaron diferencias estadísticamente significativas en esta variables entre hojas de plantas control y salinizadas, pero en menor proporción que los genotipos menos incluyentes foliares de Na^+ . El genotipo HAR2 (que fue el que tuvo el mayor valor de tolerancia a salinidad, determinada en el Capítulo II y que fue el que menos disminuyó su área foliar total por planta) presentó, contrariamente, disminuciones en las áreas foliares de las hojas 4, 8 y 12 por salinidad, de manera igualmente significativa que los genotipos incluyentes foliares de Na^+ (HAR1 y HA64). Si además evaluamos las disminuciones en forma porcentual, este genotipo tuvo un porcentaje de disminución mayor que el genotipo incluyente (HA64). Por otro lado, HA64, que fue el genotipo que quedó segundo en el ranking de tolerancia a exposiciones poco prolongadas (respuestas al estrés iónico) y a exposiciones prolongadas (respuestas al componente iónico de la salinidad) (Capítulo II), fue, a pesar de presentar elevadas concentraciones foliares de Na^+ , el genotipo que menos disminuyó (porcentualmente) su área foliar final de las hojas 4, 8 y 12 (-32 % de disminución del área foliar por salinidad). Es de destacar que el genotipo HAR5, que presentó bajas concentraciones foliares de Na^+ , fue el que presentó las mayores disminuciones en el área foliar por planta (-48%) y en las hojas iniciadas antes, durante y luego de la imposición de la salinidad, indicando la falta de correlación entre inclusión foliar de Na^+ y tolerancia a la salinidad. Igualmente, es necesario reiterar que la salinidad afectó, de manera estadísticamente significativa, el área foliar final en todos los genotipos y en todas las hojas, ya sean esto incluyentes, o no, de Na^+ foliar. Aún más, si tenemos en

cuenta el ranking de tolerancia a la salinidad evaluado en el Capítulo II, este mismo genotipo (HAR5) quedó último en el ranking, acentuando la **falta de correlación entre inclusión foliar de Na⁺, tolerancia a exposiciones prolongadas a la salinidad y disminuciones en el área foliar final en hojas iniciadas antes, durante y luego de la imposición del estrés.**

4. A pesar de lo mencionado en el punto 3 de la inexistencia de correlación entre los cambios en las variables de la dinámica de la expansión foliar por salinidad y la acumulación foliar de Na⁺ (cuando se estudiaron los 4 genotipos endocriados contrastantes en inclusión foliar de Na⁺), diferente fue lo sucedido al estudiar los mecanismos subyacentes que determinan el área foliar final (número y tamaño de células epidérmicas). Estos mecanismos que, mediante sus variaciones, determinan las mermas en área foliar final, se estudiaron en las dos líneas más contrastantes en inclusión foliar de Na⁺. Se determinaron los cambios, por salinidad, en las dinámicas del incremento en número y tamaños celulares, en las tasas de expansión y de división celulares. Los efectos de la salinidad sobre las tasas de división y expansión celular fueron más notorios antes de la emergencia de la hoja. Las tasas relativas de expansión celular se afectaron en la misma proporción, en las dos líneas. Las tasas relativas de división celular disminuyeron más en etapas tempranas de la ontogenia de la hoja y en mayor medida en el genotipo incluyente foliar de Na⁺ (HAR1) que en el menos incluyente (HAR2). Las mayores reducciones en las tasas de división celular en HAR1 (teniendo esto como consecuencia una mayor disminución en el número final de células) parecerían haber sido las determinantes de las mayores disminuciones en el área foliar de la hoja 8 en el genotipo incluyente que en aquel con muy poca acumulación foliar de Na⁺ (HAR2). Para concluir, los resultados indican que las tasas relativas de división celular fueron más afectadas en la línea HAR1 (genotipo incluyente foliar de Na⁺) que en HAR2. Como las mermas en las tasas de divisiones celulares que determinaron una mayor disminución del área foliar en HAR1 que en HAR2 se dieron en estadios iniciales de la ontogenia de la hoja 8, que coincide con el inicio de la salinización, indicaría que estas diferencias podrían estar causadas por déficit hídrico (disminuciones en el potencial hídrico), y coinciden con la relativa susceptibilidad de HAR1 con respecto a HAR2 en este parámetro, según se vio en el Capítulo II, al compararse las

mermas en las tasas iniciales de elongación de plantas, por salinidad (TREPs, respuestas a exposiciones poco prolongadas a la salinidad).

5. En este trabajo de tesis también se estudiaron los cambios causado por los tratamientos salinos sobre las densidades e índice estomático en las líneas contrastantes en inclusión foliar de Na^+ . El índice estomático disminuyó en el genotipo excluyente (HAR2) y aumentó en el incluyente (HAR1). En este caso se corroboró la hipótesis donde se planteó que la acumulación diferencial foliar de Na^+ afectará diferencialmente las respuestas en la densidad e índice estomático. A partir de los resultados encontrados, se hipotetiza que el aumento en el índice estomático en el genotipo incluyente (HAR1) podría haber aumentado el flujo transpiratorio provocando que, junto con el flujo masal de agua, podría haberse acumulado mayor cantidad de Na^+ en hoja. Quedarían por realizar mediciones de conductancia estomática y flujo transpiratorio para poder contestar las nuevas preguntas que surgen del actual trabajo.

CONCLUSIONES FINALES RESPECTO A LAS HIPÓTESIS Y OBJETIVOS PLANTEADOS

A partir de las hipótesis y objetivos planteados en este trabajo puede concluirse que:

a) Respecto a la hipótesis que afirmaba que “existirá variabilidad intraespecífica para acumulación foliar de Na^+ ”, los resultados encontrados confirman la misma. Tanto las líneas como los híbridos presentaron diferentes grados de acumulación foliar de Na^+ . Así, HA821, entre las líneas, fue el que presentó la mayor concentración de Na^+ en lámina, siguiendo en orden HAR1, HAR3, ND761 y HA64. Las líneas menos incluyentes fueron: HA89, HA124, HAR2, HAR4 y HAR5. Entre los genotipos híbridos, los más incluyentes fueron DK3940, TRITÓN MAX, 50 A0, SMR 769, 64 A 89 y CIRO. Los menos incluyentes fueron ACA885, SMR779CL, NTO2.0 y Neón.

b) En cuanto a la hipótesis que afirmaba que “la tolerancia a salinidad en genotipos de girasol incluirá variabilidad para mecanismos que intervienen en las respuestas tempranas y tardías a esta condición”, pudo corroborarse esta presunción. Esto es así ya que se pudo establecer un ranking de tolerancia a salinidad a largo como así también un ranking de tolerancia a respuestas a exposiciones poco prolongadas (estrés osmótico) y a exposiciones prolongadas (estrés iónico) a la salinidad, teniendo en cuenta las variables de crecimiento. En este ranking, las líneas endocriadas más tolerantes, tanto al estrés osmótico como al estrés iónico, fueron HAR2 y HAR1. Ambas líneas son contrastantes en inclusión foliar de Na^+ . Entre los híbridos también pudo encontrarse variabilidad en mecanismos de tolerancia ante exposiciones poco prolongadas y prolongadas a la salinidad. Aquellos más tolerantes, tanto al estrés osmótico (exposiciones poco prolongadas) como al estrés iónico (exposiciones prolongadas a la salinidad) fueron SMR779 CL (poco incluyente foliar de Na^+) y TRITON MAX (netamente incluyente). Al haber genotipos con alta (HAR1 y TRITÓN MAX) y baja acumulación foliar de Na^+ (HAR2) se corrobora la hipótesis b1 donde se afirmaba que “los efectos tempranos de la salinidad sobre el crecimiento serán independientes de la acumulación foliar de Na^+ ”. Por el contrario, no se encontró correlación entre inclusión foliar de Na^+ y tolerancia sobre los efectos tardíos de la salinidad sobre las plantas, quedando refutada la hipótesis b2 (“la acumulación foliar de Na^+ influirá en los efectos tardíos de la salinidad sobre el crecimiento”). Esto es así ya que genotipos netamente incluyentes (HAR1 y TRITÓN MAX) como excluyentes (HAR2) foliares de Na^+ fueron los más tolerantes (tuvieron los mayores valores en el ranking de tolerancia a la salinidad) tanto bajo estrés osmótico (exposiciones poco prolongadas a la salinidad) como ante el estrés iónico (exposiciones prolongadas a salinidad).

c) Con respecto a la hipótesis c (“los efectos de la salinidad sobre los determinantes del área foliar final, tasas de división y expansión celular y los cambios en parámetros estomáticos, estarán influidos diferencialmente por la acumulación foliar de Na^+) se concluye que, si bien la salinidad afectó la mayoría de los parámetros de la dinámica de la expansión foliar en todos los genotipos estudiados, cuando se hicieron estudios más detallados en genotipos contrastantes en acumulación foliar de Na^+ (HAR2, excluyente y HAR1, incluyente) se pudo determinar que hubo correlación entre acumulación foliar de

Na⁺ y mermas en los parámetros celulares que subyacen en la expansión foliar y parámetros estomáticos. Concretamente, en el genotipo incluyente (HAR1) fueron más afectadas las tasas de división celular, mientras que en el genotipo excluyente (HAR2) la salinidad afectó en menor medida este parámetro, resultando en una menor reducción en el área foliar final de la hoja 8 por salinidad. Las mermas por salinidad en las tasas de expansión foliar se vieron afectadas en ambos genotipos en iguales proporciones. Por último, se observó una disminución en el índice estomático en el genotipo excluyente (HAR2). Contrariamente, en el genotipo incluyente (HAR1), se observó un aumento en este parámetro. La disminución en el índice estomático en HAR2 podría conferirle ventajas en estrés salino.

PERSPECTIVAS Y CONSIDERACIONES PARTICULARES RELACIONADAS CON EL ÁMBITO DE LAS CIENCIAS AGROPECUARIAS

A partir de los estudios realizados y resultados alcanzados en este trabajo de tesis, se proponen algunas líneas de investigación :

1. Determinar las respuestas de los genotipos de girasol analizados en condiciones de campo, ya que los trabajos hasta aquí desarrollados se hicieron en cámara de crecimiento y en condiciones semicontroladas de invernadero.

2. Determinar el estado redox, y sus cambios por salinidad, y la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) en estos genotipos de girasol bajo salinidad, que seguramente estarán involucradas en el daño de membranas y en la tolerancia tisular al Na⁺. En el presente trabajo sólo se determinaron las concentraciones de MDA y el nivel de daño de membranas, por pérdida de electrolitos, sin medir específicamente alguna de estas EROs. Además los resultados preliminares sobre MDA no fueron consistentes.

3. Analizar cambios en los flujos transpiratorios en condiciones de salinidad y correlacionar dichas respuestas con los cambios en los índices estomáticos analizados y con la inclusión foliar de Na^+ .

4. Seleccionar genotipos por sus mecanismos de tolerancia a salinidad y utilizar los mismos como bases genéticas para el mejoramiento en girasol bajo estrés salino. De esta manera se podrán contar con genotipos mejorados para esta situación y así poder avanzar en el cultivo de esta especie en zonas donde, por limitantes edáfico-salinas, es inviable y poco rentable su cultivo.

Por último se debe resaltar que el fin cúlmine de este trabajo de tesis fue haber logrado la generación de conocimientos básicos en el modelo de estudio. Los mismos permitirán ser utilizados para el mejoramiento genético en girasol bajo estrés salino y, de esta manera, se podrán lograr, a futuro, mayores rendimientos del cultivo en zona marginales (como lo son las zonas donde actualmente se realiza girasol por haber sido desplazado por el monocultivo de soja). De esta manera es seguro que se puede aumentar la producción nacional de esta oleaginosa, y como objetivo de máxima, se podrá contribuir en mejorar la alimentación a nivel mundial. No debe olvidarse que el trabajo encomendado para todo Ingeniero Agrónomo es lograr, con el esfuerzo de su trabajo, una mejor calidad de vida de los seres humanos, mediante la generación de un aumento en la oferta de alimentos, haciendo eficiente el uso de los recursos y manejando sustentablemente los mismos. El uso eficiente de los recursos permitirá la utilización de los mismos para nuestras futuras generaciones.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Agren G. I. and Franklin O. 2003. Root: shoot ratios, optimization and nitrogen productivity. *Ann. Bot.* 92: 795-800.
- Akram M.S., Ashraf M. and Akram N. A. 2009. Effectiveness of potassium sulfate in mitigating salt-induced adverse effects on different physio-biochemical attributes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Flora* 204: 471-483.
- Alkio M., Schubert A., Diepenvrock W. and Grimm E. 2003. Effect of source–sink ratio on seed set and filling in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Pl. Cell Environ.* 26: 1609-1619.
- Alves A. C. and Setter T. 2004. Response of cassava leaf area expansion to water deficit: Cell proliferation, cell expansion and delayed development. *Ann. Bot.* 94: 605-613.
- Amsler A., Perreta M., Tivano J. C. y Vegetti A. C. 2004. Anatomía caulinar de especies de Oryzeae (Poaceae). *Candollea* 59: 135-156.
- Amtmann A. and Sanders D. 1999. Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Adv. Bot. Res.* 29:75-112.
- Andrade A., Wolfe D. W. and Fereres E. 1993. Leaf expansion, photosynthesis, and water relations of sunflower plants grown on compacted soil. *Pl. Soil* 149: 175-184.
- Andrade F. H. and Ferreiro M. A. 1996. Reproductive growth of maize, sunflower and soybean at different source levels during grain filling. *Field Crop Res.* 48: 155-165.
- Andrade F. H., Calvino P., Cirilo A. and Barbieri P. 2002. Yield responses to narrow rows depend on increased radiation interception. *Agron. J.* 94: 975–980.
- Andriankaja M., Dhondt S., De Bodt S., Vanhaeren H., Coppens F., De Milde L., Mühlenbock P., Skiryecz A., Gonzalez N., Beemster G. T. S. *et al.* 2012. Exit from proliferation during leaf development in *Arabidopsis thaliana*: a not-so-gradual process. *Developm. Cell* 22: 64–78.
- Apse M. P., Aharon G. S., Snedden W. A. and Blumwald E. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256– 1258.
- Ashraf M. 2002. Salt tolerance of cotton. Some new advances. *Crit. Rev. Pl. Sci.* 21: 1–30.
- Ashraf M. and O'Leary J. W. 1995. Distribution of cations in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive lines of sunflower under saline conditions. *J. Pl. Nutr.* 18: 2379-2388.
- Ashraf M. and Ali Q. 2008. Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Environ. Exp. Bot.* 63: 266-273.
- Ashraf M., Akram N. A., Arteca R. N. and Foolad M. R. 2010. The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. *Crit. Rev. Pl. Sci.* 29: 162-190.

- Babu R.C., Pathan M. S., Blum A. and Nguyen H.T. 1999. Comparison of measurement methods of osmotic adjustment in rice cultivars. *Crop Sci.* 39: 150-158.
- Bajji M., Kinet J. M. and Lutts S. 2001. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Pl. Growth Regulation* 00: 1-10.
- Balibrea M. E., Santa Cruz A. M., Bolarín M. C. and Pérez-Alfocea F. 1996. Sucrolytic activities in relation to sink strength and carbohydrate composition in tomato fruit growing under salinity. *Pl. Sci.* 118: 47-55.
- Balibrea M. E., Parra M., Bolarín M. C. and Pérez-Alfocea F. 1999. PEG-osmotic treatment in tomato seedlings induces salt-adaptation in adult plants. *Austral. J. Pl. Physiol.* 26: 781-786.
- Ballesteros E., Zingarelli L., Blumwald E. and Smith E. 1995. Tonoplast Na⁺/H⁺ antiport activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Pl. Physiol.* 109: 549-556.
- Ballesteros E., Blumwald E., Donaire J.P. and Belder A. 1997. Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress. *Physiol. Pl.* 99: 328-334.
- Barlow E.W.R. 1986. Water relations of expanding leaves. *Austral. J. Pl. Physiol.* 13: 45-58.
- Barreda V. D., Palazzesi L., Tellería M.C., Katinas L., Crisci J.V., Bremer K., Passalia M.G., Corsolini R., Rodríguez Brizuela R. and Bechis F. 2010. Eocene Patagonia fossils of the Daisy Family. *Science* 329: 1621.
- Barreda V.D., Palazzesi L., Katinas L., Crisci J.V., Tellería M.C., Bremer K., Passalia M., Bechis F. and Corsolini R. 2012. An extinct Eocene taxon of the daisy familia (Asteraceae): evolutionary, ecological and biogeographical implications. *Ann. Bot.* 109: 127-134.
- Barreto de Moraes Neto L., Socorro de Souza Carneiro M., Feitosa de Lacerda C., Roberto Góes Ferreira Costa M., Melo Fontenele R. and Valmir Feitosa J. 2012. Effect of irrigation water salinity and cutting age on the components of biomass of *Echinochloa pyramidalis*. *R. Bras. Zootec.* 41: 550-556.
- Beerling D. J. and Chaloner W. G. 1993. The impact of atmospheric CO₂ and temperature change on stomatal density: Observations from *Quercus robur* lamma leaves. *Ann. Bot.* 71: 231-235.
- Benlloch M., Moreno I. and Rodríguez-Navarro A. 1989. Two modes of rubidium uptake in sunflower plants. *Pl. Physiol.* 90: 939-42.
- Bethke P.C. and Drew M. C. 1992. Stomatal and nonstomatal components to inhibition of photosynthesis in leaves of *Capsicum annuum* during progressive exposure to NaCl salinity. *Pl. Physiol.* 99: 219-226.
- Blum A. and Ebercon A. 1981. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci.* 21: 43-47.
- Blumwald E., Aharon G. S. and Apse M. P. 2000. Sodium transport in plant cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 140-151.
- Bolsa de Cereales de Buenos Aires. Actualidad de la producción del girasol. Publicado en internet, disponible en www.aial.fullblog.com.ar/inta-perspectivas-agricolas-20122013. Activo Abril 2012
- Boyer J. S. 1966. Leaf water potentials measured with a pressure chamber. *Pl. Physiol.* 42: 133-137.

- Boyer J. S. 1974. Water transport in plants: mechanisms of apparent changes in resistance during absorption. *Planta* 117: 187-207.
- Boyer J. S., Cavalieri A.J. and Schulze E. D. 1985. Control of the rate of cell enlargement: excision, wall relaxation, and growing-induced water potentials. *Planta* 163: 527-543.
- Carpita N., Sabulase D., Montezinos D. and Delmer D. P. 1979. Determination of the pore size of cell walls of living plants. *Science* 205: 1144-1147.
- Casadebaig P., Debaeke P. and Lecoœur J. 2008. Thresholds for leaf expansion and transpiration responses to soil water deficit in a range of sunflower genotypes. *Eur. J. Agron.* 28: 646-654.
- Cécicoli G., Ramos J. C., Ortega L. I., Acosta J. M. and Perreta M. G. 2011. Salinity induced anatomical and morphological changes in *Chloris gayana* Kunth roots. *Biocell* 35: 9-17.
- Cookson S. J., Van Lijsebettens M. and Granier C. 2005. Correlation between leaf growth variables suggest intrinsic and early controls of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Pl. Cell Environ.* 28: 1355-1366.
- Cosgrove D. J. 1993. Water uptake by growing cells: an assessment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake and hydraulic conductance. *Int. J. Pl. Sci.* 154: 10-21.
- Cosgrove D. J. 1998. Cell wall loosening by expansions. *Pl. Physiol.* 118: 333-339.
- Cottee N. S., Tan D. K.Y., Bange M. P. and Cheetan J. A. 2007. Simple electrolyte leakage protocols to detect cold tolerance in cotton genotypes. WCRC-4. Australia.
- Couia H., Chorbali M. H. and Touraine B. 1994. Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and on NO₃-reduction rate within whole plants of salt-sensitive bean and salt-tolerant cotton. *Pl. Physiol.* 105: 1409-1418.
- Cramer G. R. and Läuchli A. 1986. Ion activities in solution in relation to NA⁺-Ca₂⁺ interactions at the plasmalemma. *J. Exp. Bot.* 25: 321-330.
- Cramer G. R., Epstein E. and Läuchli A. 1988. Kinetics of root elongation of maize in response to short-term exposure to NaCl and elevated calcium concentration. *J. Exp. Bot.* 25: 1513-1522.
- Cramer G. R. and Bowman D. C. 1991. Kinetics of maize leaf elongation 1. Increased yield threshold limits short-term, steady-state elongation rates after exposure to salinity. *J. Exp. Bot.* 25: 1417-1426.
- Chadalavada S.V., Rajendrakumar C.S., Suryanarayana T. and Reddy A. R. 1997. DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process. *FEBS Lett.* 410: 201-205.
- Chazen O., Hartung W. and Neumann P. M. 1995. The different effects of PEG 6000 and NaCl on leaf development are associated with differential inhibition of root water transport. *Pl. Cell Environ.* 18: 727-735.
- Chimenti C. A. and Hall A. J. 1993. Genetic variation and changes with ontogeny of osmotic adjustment in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* 71: 201-210.
- Chimenti C. A. and Hall A. J. 1994. Responses to water stress of apoplastic water fraction and bulk modulus of elasticity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes of contrasting capacity for osmotic adjustment. *Pl. Soil* 166: 101-107.
- Chimenti C. A., Pearson J. and Hall A. J. 2002. Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. *Field Crops Res.* 75: 235-246.
- Dale J. E. 1988. The control of leaf expansion. *Annu. Rev. Pl. Physiol. Pl. Mol. Biol.* 39: 267-295.

- Dale G. and Dieters M. 2007. Economic returns from environmental problems: breeding salt- and drought tolerant eucalypts for salinity abatement and commercial forestry. *Ecol. Eng.* 31: 175-182.
- Dalton F. N., Maggio A. and Piccinni G., 2000. Simulation of shoot chloride accumulation: separation of physical and biochemical processes governing plant salt tolerance. *Pl. Soil* 219: 1–11.
- Dash M. and Panda S. K. 2001. Salt stress induced changes in growth and enzyme activities in germinating *Phaseolus mungo* seeds. *Biol. Pl.* 44: 587-589.
- Davenport R. J., Munoz-Mayor A., Jha D., Essah P. A., Rus A. N. A. and Tester M. 2007. The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in *Arabidopsis*. *Pl. Cell Environ.* 30: 497–507.
- De La Vega, A. 2007. IV Congreso Argentino de Girasol. Buenos Aires: ASAGIR: Nuestro campo. Primera Edición.
- Di Caterina R., Giuliani M. M., Rotunno T., De Caro A. and Flagella Z. 2007. Influence of salt stress on seed yield and oil quality of two sunflower hybrids. *Ann. Appl. Biol.* 151: 145-154.
- Dodd I. C. and Davies W. J. 1996. The relationship between leaf growth and ABA accumulation in the grass leaf elongation zone. *Pl. Cell Environ.* 19: 1047-1056.
- Dosio G. A. A., Aguirrezabal L. A. N., Andrade F. H. and Pereyra V. R. 2000. Solar radiation intercepted during seed filling and oil production in two sunflower hybrids. *Crop Sci.* 40: 1637-1644.
- Dosio G. A. A., Rey H., Lecoeur J., Izquierdo N. G., Aguirrezabal L. A. N., Tardieu F. and Turc O. 2003. A whole-plant analysis of the dynamics of expansion of individual leaves of two sunflower hybrids. *J. Exp. Bot.* 54: 2541-2552.
- Downton W. J. S. 1977. Photosynthesis in salt-stressed grapevines. *Austral. J. Pl. Physiol.* 4: 183-192.
- Draper H.H. and Hadley M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 186: 421-431.
- Duan J., Li J., Guo S. and Kang Y. 2008. Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances short-term salinity tolerance. *J. Pl. Physiol.* 165: 1620-1635.
- El-Haddad E. S. H. M. and O’Leary J. W. 1994. Effect of salinity and K/Na ratio of irrigation water on growth and solute content of *Atriplex amnicola* and *Sorghum bicolor*. *Irrig. Sci.* 14: 127-133.
- Fahmy A. S., Mohamed T. M., Mohamed S. A. and Saker M. M. 1998. Effect of salt stress on antioxidant activities in cell suspension cultures of cantaloupe (*Cucumis melo*). *Egypt. J. Physiol. Sci.* 22: 315-326.
- Feikema P. M., Sasse J. M. and Bandara G. D. 2012. Chloride content and biomass partitioning in Eucalyptus hybrids grown on saline sites. *New For.* 43: 89-107.
- Fernández-García N., Martínez V., Cerdá A. and Carvajal M. 2002. Water and nutrient uptake of grafted tomato plants grown under saline conditions. *J. Pl. Physiol.* 159: 899-905.
- Fiesta nacional del girasol. Publicado en internet, disponible en http://www.fiestanacdelgirasol.com.ar/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=38&Itemid=53
- Fleming A. J. 2006. The integration of cell proliferation and growth in leaf morphogenesis. *J. Pl. Res.* 119: 31-36.

- Flint H. L., Boyce B. R. and Beattie D. J. 1967. Index of injury-a useful expression of freezing injury to plant tissues as determined by the electrolytic method. *Can. J. Pl. Sci.* 47: 229-230.
- Flowers T. J. 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55: 307-319.
- Flowers T. J., Troke P. F. and Yeo A. R. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Pl. Physiol.* 25: 89-121.
- Flowers T. J. and Läuchli A. 1983. Sodium Versus Potassium: Substitution and Compartmentation. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*. Läuchli A. and Bieleski R. L. (eds.) New Series, Springer Verlag, New York, pp. 651-681.
- Flowers T. J., Hajibagheri M. A. and Clipson N.J.W. 1986. Halophytes Quarterly. *Revi. Biol.* 61: 313-337.
- Flowers T. J. and Yeo A. R. 1986. Ion relations of plants under drought and salinity. *Austral. J. Pl. Physiol.* 13: 75-91.
- Francois, E. 1996. Salinity effects on four sunflower hybrids. *Agron. J.* 88: 215-219.
- Frensch J. 1997. Primary responses of root and leaf elongation to water deficits in the atmosphere and soil solution. *J. Exp. Bot.* 48: 985-999.
- Frensch J. and Hsiao T. C. 1994. Transient responses of cell turgor and growth of maize roots as affected by changes in water potential. *Pl. Physiol.* 104: 247-254.
- Frensch J. and Hsiao T. C. 1995. Rapid response of the yield threshold and turgor regulation during adjustment of root growth to water stress in *Zea mays*. *Pl. Physiol.* 125: 303-312.
- Fricke W. 2002. Biophysical limitation of cell elongation in cereal leaves. *Ann. Bot.* 90: 157-167.
- Fricke W. and Peters W. S. 2002. The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley: a study at the cell level. *Pl. Physiol.* 129: 374-388.
- Garnier E., Shipley B., Roumet C. and Laurent G. 2001. A standardized protocol for the determination of specific leaf area and leaf dry matter content. *Funct. Ecol.* 15: 688-695.
- Gaxiola R. A., Fink G. R. and Hirschi K. D. 2002. Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. *Pl. Physiol.* 129: 967-73.
- Ghoulam C., Foursy A. and Fares K. 2002. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 47: 39-50.
- Gheyi H. R. 2000. Problemas de salinidade na agricultura irrigada. En: *Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido*. Oliveira T.S., Romero R.E., Assis Jr., Silva J.R.C.S (Eds.). Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, DCS-UFC, p 329-346.
- Gil-Mascarell R., López-Coronado J. M., Bellés J. M., Serrano R. and Rodríguez P. L. 1999. The *Arabidopsis* HAL2-like gene family includes a novel sodium-sensitive phosphatase. *Pl. J.* 17: 373-383.
- Givnish T. J. 1988. Adaptation to sun and shade: a whole plant perspective. *Austral. J. Pl. Physiol.* 15: 63-92.
- Gläser H.U., Thomas D., Gaxiola R., Montrichard F., Surdin-Kerjan Y. and Serrano R. 1993. Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a putative phosphatase gene. *EMBO J.* 12: 3105-3110.
- Gomes Silveira J. A., Marinho Araújo S. A., Matos Santos Limab J. P and Almeida Viégas R. 2009. Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment

- mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex nummularia*. *Environ. Exp. Bot.* 66: 1-8.
- Gorham J., Wyn Jones R. G. and Bristol A. 1990. Partial characterization of the trait for enhanced K⁺-Na⁺ discrimination in the D genome of wheat. *Planta* 180: 590-597.
- Gowing D. J. G., Davies W. J. and Jones H. G. 1990. A positive root-sourced signal as an indicator of soil drying in apple, *Malus x domestica* Borkh. *J. Exp. Bot.* 41: 1535-1540.
- Granier C. and Tardieu F. 1998. Spatial and temporal analyses of expansion and cell cycles in sunflower leaves. *Pl. Physiol.* 116: 991-1001.
- Granier C. and Tardieu F. 1999. Water deficit and spatial pattern of leaf development. Variability in responses can be simulated using a simple model of leaf development. *Pl. Physiol.* 119:609-620.
- Granier C., Turc O. and Tardieu F. 2000. Co-ordination of cell division and tissue expansion in sunflower, tobacco, and pea leaves: dependence or Independence of both processes? *J. Pl. Growth Regul.* 19: 45-54.
- Granier C. and Tardieu F. 2009. Multi-scale phenotyping of leaf expansion in response to environmental changes: the whole is more than the sum of parts. *Pl. Cell Environ.* 32: 1175–1184.
- Greenway H. and Osmond C. B. 1972. Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. *Pl. Physiol.* 49:256-259.
- Greenway H. and Munns R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Annu. Rev. Pl. Physiol.* 31: 149-190.
- Gudesblat G. E., Schneider-Pizón J., Betti C., Mayerhofer J., Vanhoutte I., van Dongen W., Boeren S., Zhiponova M., de Vries S., Jonak C. and Russinova E. 2012. SPEECHLESS integrates brassinosteorid and stomata signalling pathways. *Nature (Cell Biology)* DOI: 10.1038/ncb2471.
- Guetta-Dahan Y., Yaniv Z., Zilinskas B. A. and Ben-Hayyim G. 1997. Salt and oxidative stress, similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta* 203: 460-469.
- Hancock J. G. 1972. Changes in cell membrane permeability in sunflower hypocotyls infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pl. Physiol.* 49: 358-364.
- Hartig K. and Beck E. 2006. Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Pl. Biol.* 8: 389-396.
- Hernández J.A., Olmos E., Corpas F.J., Sevilla F. and del Rio L. A. 1996. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Pl. Sci.* 105: 151-167.
- Hernandez J. A., Jimenez A., Mullineaux P. and Sevilla F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum*) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Pl. Cell Environ.* 23: 853-862.
- Historia de los colonos ruso-judíos arribados a la Argentina durante el siglo XIX. Publicado en internet, disponible en <http://www.casares.gov.ar/>
- Ho L. C. 1988. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annu. Rev. Pl. Physiol. Pl. Mol. Biol.* 39: 355-378.
- Hoagland D. R. and Snyder W. C. 1933. Nutrition of strawberry plants under controlled conditions. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 30: 288-296.
- Hoagland D. R. and Arnon D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experimental Station, Circular* 347.

- Horie T., Hauser F. and Schroeder J.I. 2009. HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. *Trends in Plant Science* 14: 660-668.
- Hsiao T. C., Acevedo E. and Henderson D.W. 1970. Maize leaf elongation: continuous measurements and close dependence on plant water status. *Science* 168: 590–591.
- Hsiao T. C., Frensch J. and Rojas-Lara B. A. 1998. The pressure-jump technique shows maize leaf growth to be enhanced by increases in turgor only when water status is not too high. *Pl. Cell Environ.* 21: 33-42.
- Hsiao T. C. and Xu L. K. 2000. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *J. Exp. Bot.* 51: 1595-1616.
- Hu Y., Burucs Z., von Tucher S. and Schmidhalter U. 2007. Shortterm effects of drought and salinity on mineral nutrient distribution along growing leaves of maize seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 60: 268–275.
- Huang J. and Redman R. E. 1995. Responses of growth, morphology, and anatomy to salinity and calcium supply in cultivated and wild barley. *Can. J. Bot.* 73: 1859-1866.
- Hurkman W. J. 1992. Effect of salt stress on germination expression: a review. *Pl. Soil* 146: 145-151.
- InfoStat. 2009. *InfoStat*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba. Argentina.
- James R. A., Davenport R. J. and Munns R. 2006. Physiological Characterization of Two Genes for Na⁺ Exclusion in Durum Wheat, Nax1 and Nax2. *Pl. Physiol.* 142: 1537-1547.
- Johnson B. J. 1972. Effect of artificial defoliation on sunflower yields and other characteristics. *Agron. J.* 64: 688–689.
- Kalaji M. H. and Pietkiewicz S. 1993. Salinity effects on plant growth and other physiological processes. *Acta Physiol. Pl.* 15: 89-124.
- Kang J., Mizukami Y., Wang H., Fowke L. and Dengler N. G. 2007. Modification of cell proliferation patterns alters leaf vein architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 226: 1207–1218.
- Kaplan D. R. 1992 . The relationship of cells to organisms in plants: Problems and implications of an organismal perspective. *Int. J. Pl. Sci.* 153 : S28- S37 .
- Kaplan D. R. 2001 . Fundamental concepts of leaf morphology and morphogenesis: A contribution to the interpretation of molecular genetic mutants. *Int. J. Pl. Sci.* 162: 465 – 474 .
- Kaplan D. R. and Hagemann W . 1991 . The relationship of cell and organism in vascular plants — Are cells the building blocks of plant form? *Bioscience* 41: 693-703 .
- Katsuhara M. and Kawasaki T. 1996. Salt stress induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of barley roots. *Pl. Cell Physiol.* 37: 169-173.
- Kawasaki S., Borchert C., Deyholos M., Wang H., Brazille S., Kawai K., Galbraith D. and Bohnert H. J. 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Pl. Cell* 13: 889-905.
- Kazama T., Ichihashi Y., Murata S. and Tsukaya H. 2010. The mechanism of cell cycle arrest front progression explained by a KLUH/CYP78A5-dependent mobile growth factor in developing leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Pl. Cell Physiol.* 51: 1046–1054.
- Kefu Z., Munns R. and King R. W. 1991. Abscisic-acid levels in NaCl-treated barley, cotton and saltbush. *Austral. J. Pl. Physiol.* 18: 17-24.

- Khan M. A., Ungar I. A., Showalter A. M. and Dewald H. D. 1998. NaCl-induced accumulation of glycinebetaine in four subtropical halophytes from Pakistan. *Physiol. Plant.* 102: 487-492.
- Kriedemann P. E. 1986. Stomatal and photosynthetic limitations to leaf growth. *Austral. J. Pl. Physiol.* 13: 15–31.
- Larcher W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: RiMa, 2000. 533p.
- Longstreth D. J. and Nobel P. S. 1979. Salinity effects on leaf anatomy: consequences for photosynthesis 1. *Pl. Physiol.* 63: 700-703.
- Luttge U. 1993. Plant cell membranes and salinity: structural, biochemical and physiological changes. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 5: 217-224.
- Maas E. V., Lesch S. M., Francois L. E. and Grieve C. M. 1994. Tiller development in salt-stressed wheat. *Crop Sci.* 34: 1594-1603.
- Maathuis F. J. M. and Amtmann A. 1999. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Ann. Bot.* 84: 123-133.
- Maggio A., Raimondi G., Martino A. and De Pascale S. 2007. Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environ. Exp. Bot.* 59, 276–282.
- Maser P., Eckelman B., Vaidyanathan R., Horie T., Fairbairn D. J., Kubo M., Yamagami M., Yamaguchi K., Nishimura M. and Uozumi Netal. 2002. Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. *FEBS Lett* 531:157-161.
- Marcotrigiano M. 2001 . Genetic mosaics and the analysis of leaf development. *Int. J. Pl. Sci.* 162 : 513 – 525 .
- Marcotrigiano M. 2010. A role for leaf epidermis in the control of leaf size and the rate and extent of mesophyll cell division. *Am. J. Bot.* 97: 224-233.
- Martinez V. and Läuchli A. 1994. Salt-induced inhibition of phosphate uptake in plants of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *New Phytol.* 126: 609-614.
- Meddings R. L. A., Mc Comb J. A. and Bell D. T. 2001. The salt–waterlogging tolerance of *Eucalyptus camaldulensis* x *E. globulus* hybrids. *Aust. J. Exp. Agric.* 41: 787-792.
- Meyerowitz E. M. 1996. Plant development: Local control, global patterning. *Curr. Op. Gen. Developm.* 6 : 475-479 .
- Møller I. S. and Tester M. 2007. Salinity tolerance of *Arabidopsis*: a good model for cereals? *Trends Pl. Sci.* 12: 534– 540.
- Moya J. L., Primo-Millo E. and Talon M. 1999. Morphological factors determine salt tolerance in citrus seedlings: the shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. *Pl. Cell Environ.* 22: 1425–1433.
- Muller B., Stosser M. and Tardieu F. 1998. Spatial distribution of tissue expansion and cell division rates are related to irradiance and to sugar content in the growing zone of maize roots. *Pl. Cell Environ.* 21: 149-158.
- Munns R. 1988. Effect of high external NaCl concentrations on ion transport within the shoot of *Lupinus albus*. I. Ions in xylem sap. *Pl. Cell Environ.* 11: 283-289.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Pl. Cell Environ.* 25: 239-250.
- Munns R. and Passioura J. B. 1984. Effect of prolonged exposure to NaCl on the osmotic pressure of leaf xylem sap from intact, transpiring barley plants. *Austral. J. Pl. Physiol.* 11: 497-507.
- Munns R. and Termaat A. 1986. Whole-plant responses to salinity. *Austral. J. Pl. Physiol.* 13: 143-160.

- Munns R. and Sharp R. E. 1993. Involvement of abscisic acid in controlling plant growth in soils of low water potential. *Austral. J. Pl. Physiol.* 20: 425-437.
- Munns R., Schachtman D. P. and Condon A. G. 1995. The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Austral. J. Pl. Physiol.* 22: 561-569.
- Munns R. and Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Pl. Biol.* 59: 651-681.
- Murguía J. R., Bellés J. M. and Serrano R. 1995. A salt-sensitive 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase involved in sulfate activation. *Science* 267:232-234.
- Murguía J. R., Bellés J. M. and Serrano R. 1996. The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity. *J. Biol. Chem.* 271: 29029-29033.
- Neumann P.M. 1993. Rapid and reversible modifications of extension capacity of cell walls in elongating maize leaf tissues responding to root addition and removal of NaCl. *Pl. Cell Environ.* 16: 1107-1114.
- Neumann P., Van Volkenburgh E. and Cleland R. 1988. Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. *Pl. Physiol.* 88: 233-237.
- Niklas K. J. and Enquist B. J. 2002. On the vegetative biomass partitioning of seed, plant leaves, stems and roots. *Ann. Nat.* 159: 482-497.
- Nonami H., Wu Y. and Boyer J. S. 1997. Decreased growth-induced water potential. A primary cause of growth inhibition at low water potentials. *Pl. Physiol.* 114: 501-509.
- Olsson O. 2001. The rise of neolithic agriculture. Working papers in economics. Publicado en internet. Disponible en handels.gu.se. Activo Junio 2012.
- Origen del girasol en argentina. Publicado en internet, disponible en <http://www.asagir.com.ar>
- Origen mitológico del girasol. Publicado en internet, disponible en <http://suite101.net/article/las-plantas-y-la-mitologia-griega-a46932>
- Orsini F., Alnayef M., Bona S., Maggio A. and Gianquinto G. 2012. Low stomatal density and reduced transpiration facilitate strawberry adaptation to salinity. *Environ. Exp. Bot.* 81: 1-10.
- O'Toole J. and Cruz R. 1980. Response of leaf water potential, stomatal resistance, and leaf rolling to water stress. *Pl. Physiol.* 65: 428-432.
- Ouyang S. Q., Liu Y. F., Liu P., Lei G., He S. J., Ma B., Zhang W., Zhang J. S. and Chen S.Y. 2010. Receptor-like kinase OsSIK1 improves drought and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*) plants. *Pl. J.* 62: 316-329.
- Palmer S. J., Berridge D. M., McDonald A. J. S. and Davies W. J. 1996. Control of leaf expansion in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by nitrogen nutrition. *J. Exp. Bot.* 47: 359-368.
- Pantin F., Simonneau T. and Muller B. 2012. Coming on leaf age: control of growth by hydraulics and metabolic during leaf ontogeny. *New Phytol.* 196: 349-366.
- Passioura J. B. and Munns. R. 2000. Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Austral. J. Pl. Physiol.* 27: 941-948.
- Patrick J. W. 1988. Assimilate partitioning in relation to crop productivity. *Hortscience* 23: 33-40.
- Pereyra-Irujo G. A., Velazquez L., Lechner L. and Aguirrezábal L. A. N. 2008. Genetic variability for leaf growth rate and duration under water deficit in sunflower: analysis of responses at cell, organ, and plant level. *J. Exp. Bot.* 59: 2221-2232.

- Pérez-Alfocea F., Albacete A., Ghanem M. E. and Dodd I. C. 2010. Hormonal regulation of source sink relations to maintain crop productivity under salinity: a case study of root-to-shoot signalling in tomato. *Funct. Pl. Biol.* 37: 592-603.
- Perreta M. G. and Vegetti A.C. 2004. Structure and development of the branching system in *Melica macra* (Poaceae). *Flora* 199: 36-41.
- Perreta M. G. y Vegetti A. C. 2005. Patrones estructurales en las plantas vasculares: una revisión. *Gayana Botánica* 62: 9-19.
- Perreta M. G. and Vegetti A.C. 2006. Structure and development of the branching system in *Melica sarmentosa*. *Feddes Repertorium* 117: 264-271.
- Pilot G., Gaymard F., Mouline K., Cherel I. and Sentenac H. 2003. Regulated expression of *Arabidopsis* shaker K^+ channel genes involved in K^+ uptake and distribution in the plant. *Pl. Mol. Biol.* 51:773-787.
- Pitman M. G. 1984. Transport across the root and shoot/root interactions. En: *Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement*. Staples R.C. (ed.), Wiley, New York. pp. 93–123.
- Porter H. and Nagel O. 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO_2 , nutrients and water: a quantitative review. *Austral. J. Pl. Physiol.* 27: 595-607.
- Potts B. M. and Dungey H. S. 2004. Interspecific hybridization of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists. *New For.* 27: 115–138.
- Prentice, G. 1986. Origins of plant domestication in the Eastern United States: promoting the individual in archaeological theory. *South. Archaeol.* 5: 103-119.
- Pritchard J., Wyn Jones R.G. and Tomos A.D. 1991 Turgor, growth and rheological gradients of wheat roots following osmotic stress. *J. Exp. Bot.* 42: 1043-1049.
- Quintero F. J., Garciadeblas B. and Rodríguez-Navarro A. 1996. The SAL1 gene of *Arabidopsis*, encoding an enzyme with 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast. *Pl. Cell* 8: 529-37.
- Quintero F. J., Ohta M., Shi H., Zhu J. K. and Pardo J. M. 2002. Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na^+ homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9061-9066.
- Quintero J. M., Fournier J. M. and Benlloch M. 2007. Na^+ accumulation in shoot is related to water transport in K^+ -starved sunflower plants but not in plants with a normal K^+ status. *J. Pl. Physiol.* 164:60–7.
- Quintero J. M., Fournier J. M., Benlloch M. and Rodríguez- Navarro A. 2008. Na^+ accumulation in root sumplast of sunflower plants exposed to moderate salinity is transpiration-dependent. *J. Pl. Physiol.* 165: 1248-1254.
- Qiu Q. S., Guo Y., Dietrich M. A., Schumaker K. S. and Zhu J. K. 2002. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 8436-8441.
- Radin J. W. and Boyer J. S. 1982. Control of leaf expansion by nitrogen nutrition in sunflower plants. *Pl. Physiol.* 69: 771-775.
- Rajendran K., Tester M. and Roy S. J. 2009. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Pl. Cell Environ.* 32: 237-249.
- Ramos J. C., Tivano J. C. y Vegetti A. C. 2002. Estudio anatómico de vástagos reproductivos en *Bromas auleticus* Trin. ex Ness (Poaceae). *Gayana Botánica* 59: 51-60.

- Ramos J., Perreta M., Tivano J. C. y Vegetti A. C. 2004. Variaciones anatómicas en la raíz de *Pappophorum philippianum* inducidas por la salinidad. *Phyton (USA)*: 103-109.
- Raven J. A. 1985. Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants: a cost-benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water. *New Phytol.* 101: 25–77.
- Rawson H. M. and Munns R. 1984. Leaf expansion in sunflower as influenced by salinity and short-term changes in carbon fixation. *Pl. Cell Environ.* 7: 207-213.
- Ray P. M. 1987. Principles of plant cell expansion. En: Physiology of cell expansion during plant growth. Cosgrove and D. J. and Kneivel D. P., (eds). American Society of Plant Physiologists, Bethesda, pp 1-27.
- Reinheimer R., Pozner R. and Vegetti A. C. 2005. Inflorescence, spikelet and floral development in *Panicum maximum* and *Urochloa plantaginea* (Poaceae). *Am. J. Bot.* 92: 565-575.
- Reymond M., Muller B., Leonardi A., Charcosset A. and Tardieu F. 2003. Combining quantitative trait loci analysis and an ecophysiological model to analyze the genetic variability of the responses of maize leaf growth to temperature and water deficit. *Pl. Physiol.* 131: 664–675.
- Rhoades J.P., Kandiah A. and Mashali A.M. 1992. *The use of saline waters for crop production: Irrigation and drainage paper*. FAO. Roma. 133pp.
- Ribichich K. F., López S. E. and Vegetti A. C. 2000. Histopathological spikelet changes produced by *Fusarium graminearum* in susceptible and resistant wheat cultivars. *Pl. Dis.* 84: 794-802.
- Ribichich K. F. y Vegetti A. C. 2001. Fusariosis de la espiga de trigo: evaluación de caracteres exomorfológicos asociados a la resistencia. *Rev. Fac. Agron. La Plata* 104: 121-127.
- Rodrigues Pereira A. S. 1978. Effects of leaf removal on yield components in sunflower. *Netherlands J. Agric. Sci.* 26: 133–144.
- Rodríguez H. G., Roberts J. K. M., Jordan W. R. and Drew M.C. 1997. Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Pl. Physiol.* 25: 881-893.
- Rodríguez A., Ortega L., Córdoba A. and Taleisnik E. 2004. Decreased reactive oxygen species concentration in the elongation zone contributes to the reduction in maize leaf growth under salinity. *J. Exp. Bot.* 53: 1383-1390.
- Rodríguez A., Lascano H. R., Bustos L. and Taleisnik E. 2007. Salinity-induced reductions in nadph oxidase activity in the maize leaf blade elongation zone. *J. Pl. Physiol.* 164: 223-230.
- Rus A., Yokoi S., Sharkhuu A., Reddy M., Lee B. H., Matsumoto T. K., Koiwa H., Zhu J. K., Bressan R. A. and Hasegawa P.M. 2001. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:14150-14155.
- Rus A., Baxter I., Muthukumar B., Gustin J., Lahner B., Yakubova E. and Salt D. E. 2006. Natural variants of AtHKT1 enhance Na⁺ accumulation in two wild populations of *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 2: 1964–1973.
- Saab I. M. and Sharp R. E. 1989. Non-hydraulic signals from maize roots in drying soil: inhibition of leaf elongation but not stomatal conductance. *Planta* 179: 466-474.
- Sachs T. 2005. Auxin's role as an example of the mechanisms of shoot/root relations. *Pl. Soil* 268: 13-19.

- Sack L., Scoffoni C., McKown A. D., Frole K., Rawls M., Havran J. C., Tran H. and Tran T. 2012. Developmentally based scaling of leaf venation architecture explains global ecological patterns. *Nat. Com.* 3: 837.
- Sadras V. O., Villalobos F. J., Fereres E. and Wolfe D. W. 1993. Leaf responses to soil water deficits: Comparative sensitivity of leaf expansion rate and leaf conductance in field-grown sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Pl. Soil* 153: 189-194.
- Sairam R. K., Rao K. V. and Srivastava G. C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long-term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Pl. Sci.* 163: 1037-1046.
- Sairam R. K., Srivastava G. C., Agarwal S. and Meena R. C. 2005. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biol. Plant.* 49: 85-91.
- Sanderson M., Stair D. and Hussey M. 1997. Physiological and morphological responses of perennial forages to stress. *Adv. Agron.* 59: 171-224.
- Saranga Y., Horcicka P. and Wolf S. 1996. Effect of source-sink relationship on yield components and yield of confection sunflower. *Helia* 19: 29-38.
- Scarpella E., Francis P. and Berleth T. 2004. Stage-specific markers define early steps of procambium development in *Arabidopsis* leaves and correlate termination of vein formation with mesophyll differentiation. *Development* 131: 3445-3455.
- Schachtman D.P. and Schroeder J.I. 1994 Structure and transport mechanism of a high affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* 370, 655-658.
- Schneider A., Jones J.M. and Hammond J. J. 1987. Simulated hail research in sunflower: defoliation. *Agron. J.* 79: 431-434.
- Schroeder Murphy S., Huang B., King R. and Smucker A. 1990. Measurement of whole plant responses to compacted and flooded soil environments in the teaching laboratory. *J. Agron. Educ.* 19: 171- 175.
- Schuppler U., He P. H., John P. C. L. and Munns R. 1998. Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cellcycle kinase activity in wheat leaves. Servicio de manejo de Nutrición de plantas dependiente de la FAO. *Pl. Physiol.* 117: 667-678.
- Šesták Z. 1985. *Photosynthesis during leaf development*. Dr. W. Junk Publishers. Dordrecht, the Netherlands.
- Shahbaz M., Ashraf M., Akram N. A., Hanif A., Hamedd S., Joham S. and Rehman R. 2011. Salt-induced modulation in growth, photosynthetic capacity, proline content and ion accumulation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Acta Physiol. Plant.* 33: 1113-1122.
- Shalata A. and Tal M. 1998. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiol. Plant.* 104: 169-174.
- Sharp R. and Le Noble M. E. 2002. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J. Exp. Bot.* 53: 33-37.
- Shen J.R. and Katoh S. 1991. Inactivation and Calcium-dependent reactivation of Oxygen evolution in photosystem II preparations treated at pH 3.0 or with high concentrations of NaCl. *Pl. Cell Physiol.* 32: 439-446.
- Shen W., Gómez-Cadenas A., Routly E. L., Ho T. H. D., Simmonds J. A. and Gulick P. J. 2001. The salt stress-inducible protein kinase gene, Esi47, from the salt-tolerant wheatgrass *Lophopyrum elongatum* is involved in plant hormone signaling. *Pl. Physiol.* 125: 1429-1441.

- Shi H., Ishitani M., Kim C. and Zhu J. K. 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 6896-6901.
- Shi H., Quintero F. J., Pardo J. M. and Zhu J.-K. 2002. The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long distance Na⁺ transport in plants. *Pl. Cell* 14: 465-477.
- Shi H., Lee B.-H., Wu S.-J. and Zhu J.-K. 2003. Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotech.* 21, 81-85.
- Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58: 221-227.
- Slafer G. A. and Rawson H. M. 1997. Phyllochron in Wheat as Affected by Photoperiod Under Two Temperature Regimes. *Austral. J. Pl. Physiol.* 24: 151 – 158.
- Slama I., Ghnaya T., Messedi D., Hessini K., Labidi N., Savoure A. and Abdelly C. 2007. Effect of sodium chloride on the response of the halophyte species *Sesuvium portulacastrum* grown in mannitol-induced water stress. *J. Plant Res.* 120: 291-299.
- Sokal R. R. and Rohlf F. J. 1971. *Biometry*. 2nd. Ed. W. H. Freeman, San Francisco.
- Soussi M., Ocaña A. and Lluch C. 1998. Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.* 49: 1329-1337.
- Steudle E. 1993. Pressure probe techniques: basic principles and application to studies of water and solute relations at the cell, tissue and organ level. En: *Water deficits: plant responses from cell to community*. Smith J. A. C. and Griffith H., (eds). Oxford: Bios Scientific Publishers Ltd, pp. 5-36.
- Steudle E. and Peterson C. A. 1998. How does water get through roots? *J. Exp. Bot.* 49: 775-788.
- Sturm A. and Tang G. 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Pl. Sci.* 4: 401-407.
- Sunarpri H. T., Motoda J., Kubo M., et al. 2005. Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Pl. J.* 44: 928-938.
- Szabolcs. I. 1992. Salinization of soil and water and its relation to desertification. *UNEP Desert. Control Bull.* 21: 32-37.
- Tan K.H. and Dekker M. 1993. *Principles of Soil Chemistry*. 2nd ed. Inc. New York. 376 pp.
- Tardieu F. and Davies W.J. 1992. Stomatal response to abscisic-acid is a function of current plant water status. *Pl. Physiol.* 98: 540-545.
- Tardieu F., Granier C. and Muller B. 1999. Modelling leaf expansion in a fluctuating environment: are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate?. *New Phytol.* 143: 33-43.
- Termaat A. and Munns R. 1986. Use of concentrated macronutrient solutions to separate osmotic from NaCl-specific effects on plant growth. *Austral. J. Pl. Physiol.* 13: 509-522.
- Tester M. and Davenport R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91: 503-527.
- Thompson A. J., Andrews J., Mulholland B. J., McKee J. M., Hilton H. W., Horridge J. S., Farquhar G. D., Smeeton R. C., Smillie I. R., Black C. R. and Taylor I. B. 2007. Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and

- root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Pl. Physiol.* 143: 1905–1917.
- Tribsch A. and Stuessy T. F. 2012. Evolution and phylogeography of arctic and alpine plants in Europe: Introduction. *Taxon* 52: 415-416.
- Tsukaya , H. 2002 . Interpretation of mutants in leaf morphology: Genetic evidence for a compensatory system in leaf morphogenesis that provides a new link between cell and organismal theory. *Int. Rev. Cytol.* 217 : 1-39 .
- Turgeon R. 1989. The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Pl. Physiol. Pl. Mol. Biol.* 40: 119-138.
- Vegetti A. C. 1997. Formas de crecimiento en *Bromus catharticus* y *Bromus auleticus*. *Kurtziana* 25: 165-182.
- Vegetti A. C. and Pilatti R. A. 1998. Structural pattern of tomato plants grown in greenhouse. *Genet. Resour. Crop Evol.* 45: 87-93.
- Vegetti A. C. 2002. Caracterización de los sistemas de ramificación en especies de Oryzeae (Poaceae). *Candollea* 57: 251-260.
- Viégas R. A., Silveira J. A. G. Melo A. R. B. Lima Júnior A. R., Queiroz J. E. and Fausto M. J. M. 2001. Effects of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation of young cashew plants. *Rev. Bras. Eng. Agric. Amb.* 5: 216-222.
- Volkenburgh E. V. 1999. Leaf expansion: an integrating plant behaviour. *Pl. Cell Environ.* 2: 1463-1473.
- Volkmar K. M., Hu Y. and Steppuhn H. 1998. Physiological responses of plants to salinity: a review. *Can. J. Plant Sci.* 78: 19-27.
- Walter A., Silk W. K. and Schurr U. 2009. Environmental effects on spatial and temporal patterns of leaf and root growth. *Annu. Rev. Pl. Biol.* 60: 279–304.
- Wang M., Zhou Q. and Ren L. 2009. Toxicological responses in wheat *Triticum aestivum* under joint stress of chlorimuron-ethyl and copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 2121–2129.
- Woodward F. I., Körner C. H. and Crabtree R. C. 1986. The dynamics of leaf extension in plants with diverse altitudinal ranges. I. Field observations on temperature responses at one altitude. *Oecologia* 70: 222-226.
- Wolf O., Jeschke W. D. and Hartung W. 1990. Long-distance transport of abscisic-acid in NaCl-treated intact plants of *Lupinus albus*. *J. Exp. Bot.* 41: 593-600.
- Wu L. 1981. The potential for evolution of salinity tolerance in *Agrostis stolonifera* L. and *Agrostis tenuis* Sibth. *New Phytol.* 89: 471-486.
- Wyn Jones R.G. and Storey R. 1978. Salt stress and comparative physiology in the Gramineae. II. Glycinebetaine and proline accumulation in two salt- and water-stressed barley cultivars. *Austral. J. Pl. Physiol.* 5: 817-829.
- Yang G., Rhodes G. and Joly R. J. 1996. Effects of high temperature on membrane stability and chlorophyll fluorescence in glycinebetaine-deficiency and glycinebetaine-containing maize lines. *Aust. J. Pl. Physiol.* 23, 437–443.
- Yeo A. R. 1983. Salinity resistance: Physiologies and prices. *Physiol. Pl.* 58: 214-222.
- Yeo A. R., Lee K. S., Izard P., Boursier P. J. and Flowers T. J. 1991. Short- and long- term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 42, 881-889.
- Zabala J. M., Taleisnik E., Giavedoni J. A., Pensiero J. F. and Schrauf G. E. 2011. Variability in salt tolerance of native populations of *Elymus scabrifolius* (Döll) J.H. Hunz from Argentina. *Grass forage Sci.* 66:109-122.
- Zhu J. K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Op. Pl. Biol.* 6: 441-445.

**FIGURAS Y TABLAS DE PARÁMETROS DE
CRECIMIENTO, DINÁMICA DE LA EXPANSIÓN FOLIAR,
BIPLOTS Y RELACIONES K^+/NA^+**

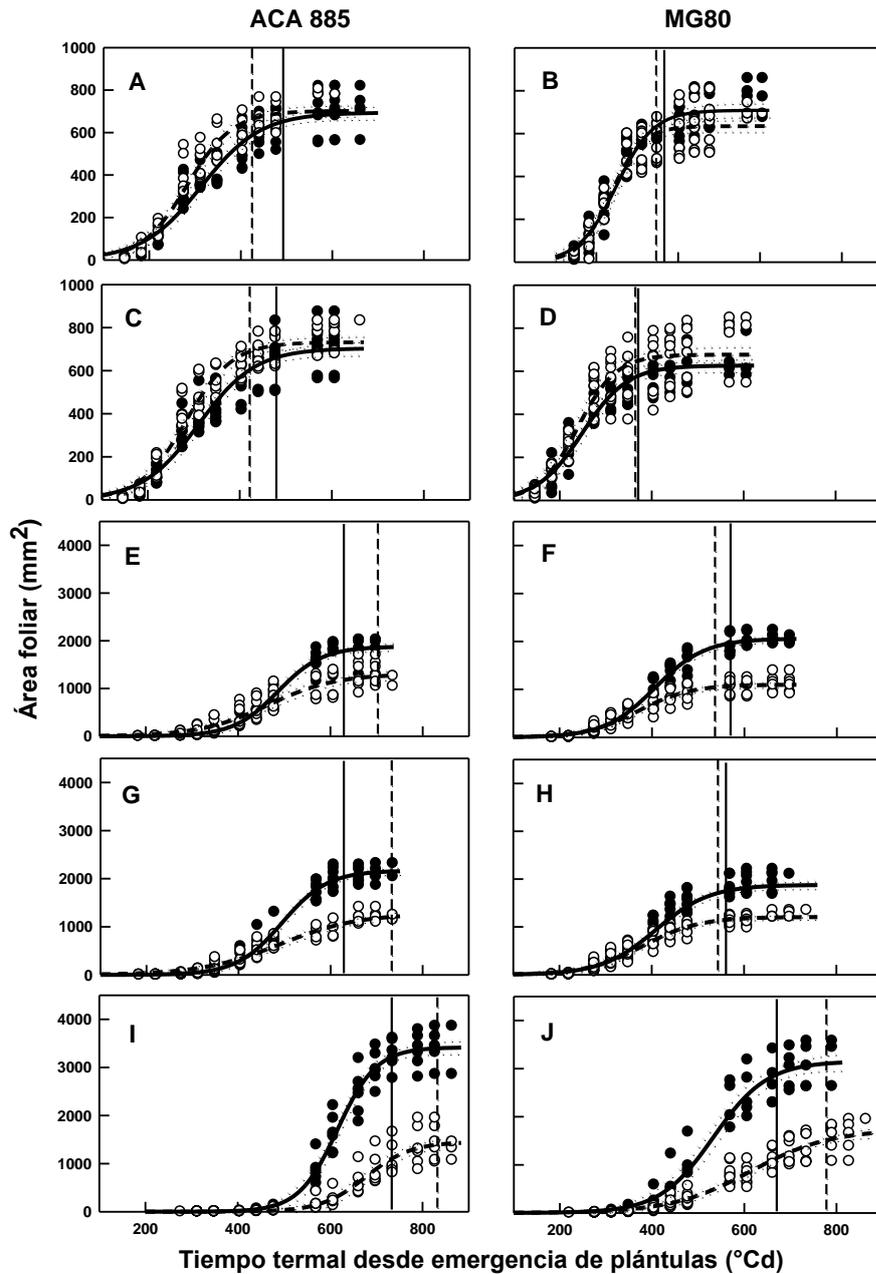


Fig. A.1. Expansión foliar de la hoja 1 a 5 en dos híbridos de girasol, en condiciones control (círculos negros) y tratadas con sal (150 mM NaCl, círculos vacíos). Las curvas ajustadas son curvas de crecimiento sigmoideas para las plantas control (líneas continuas) y salinizadas (líneas discontinuas). Las líneas verticales indican el momento en el cual se alcanza el 95% del área final foliar, en plantas control (líneas continuas) y tratadas (líneas discontinuas). Los ajustes de las curvas fueron sigmoideos de 3 parámetros, según la siguiente ecuación: $f = a / (1 + \exp(-(x-x_0)/b))$.

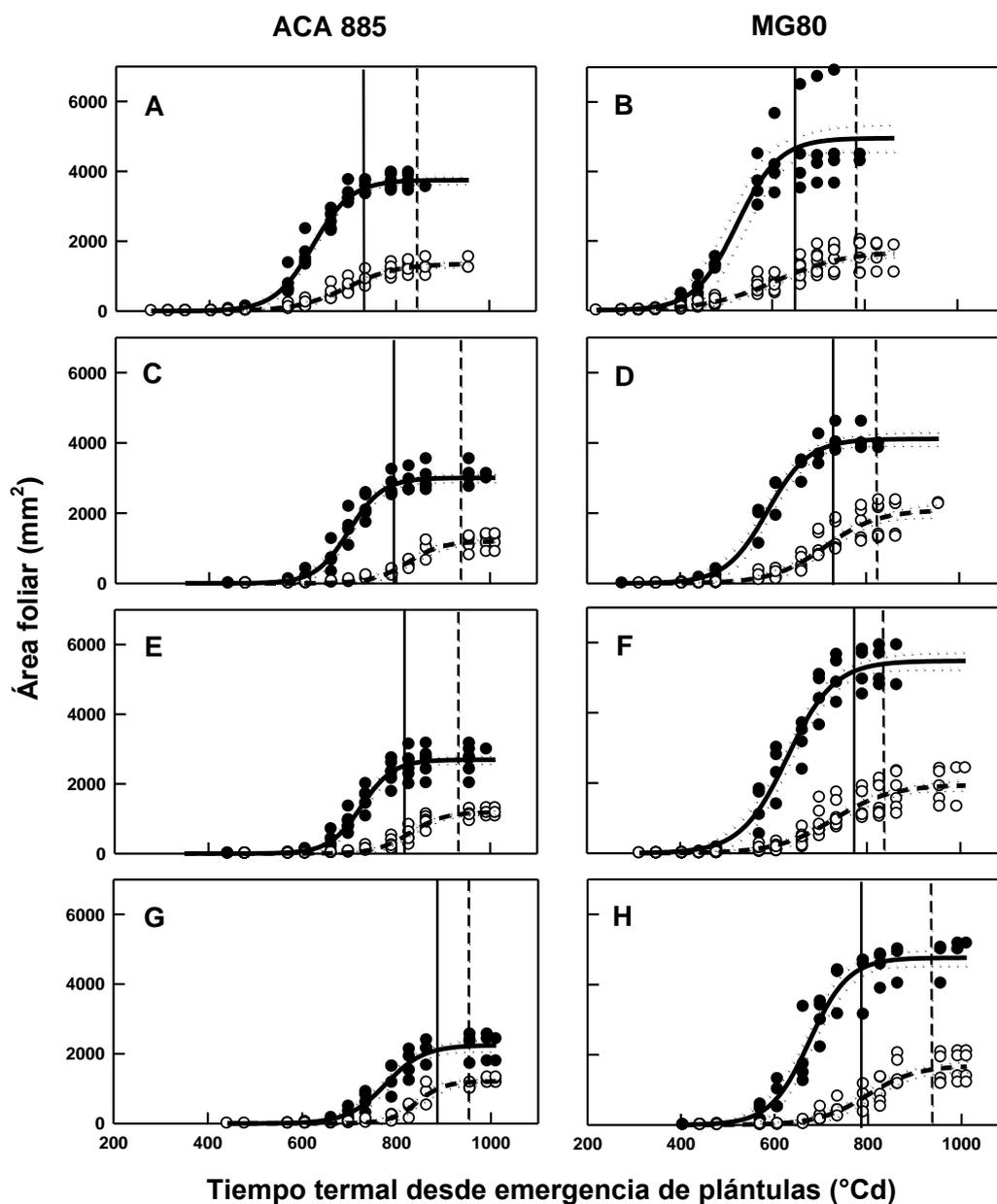


Fig. A.2. Expansión foliar de la hoja 6 a 9 en dos híbridos de girasol, en condiciones control (círculos negros) y tratadas con sal (150 mM NaCl, círculos vacíos). Las curvas ajustadas son curvas de crecimiento sigmoideas para las plantas control (líneas continuas) y salinizadas (líneas discontinuas). Las líneas verticales indican el momento en el cual se alcanza el 95% del área final foliar, en plantas control (líneas continuas) y tratadas (líneas discontinuas). Los ajustes de las curvas fueron sigmoideos de 3 parámetros, según la siguiente ecuación: $f = a / (1 + \exp(-(x - x_0) / b))$.

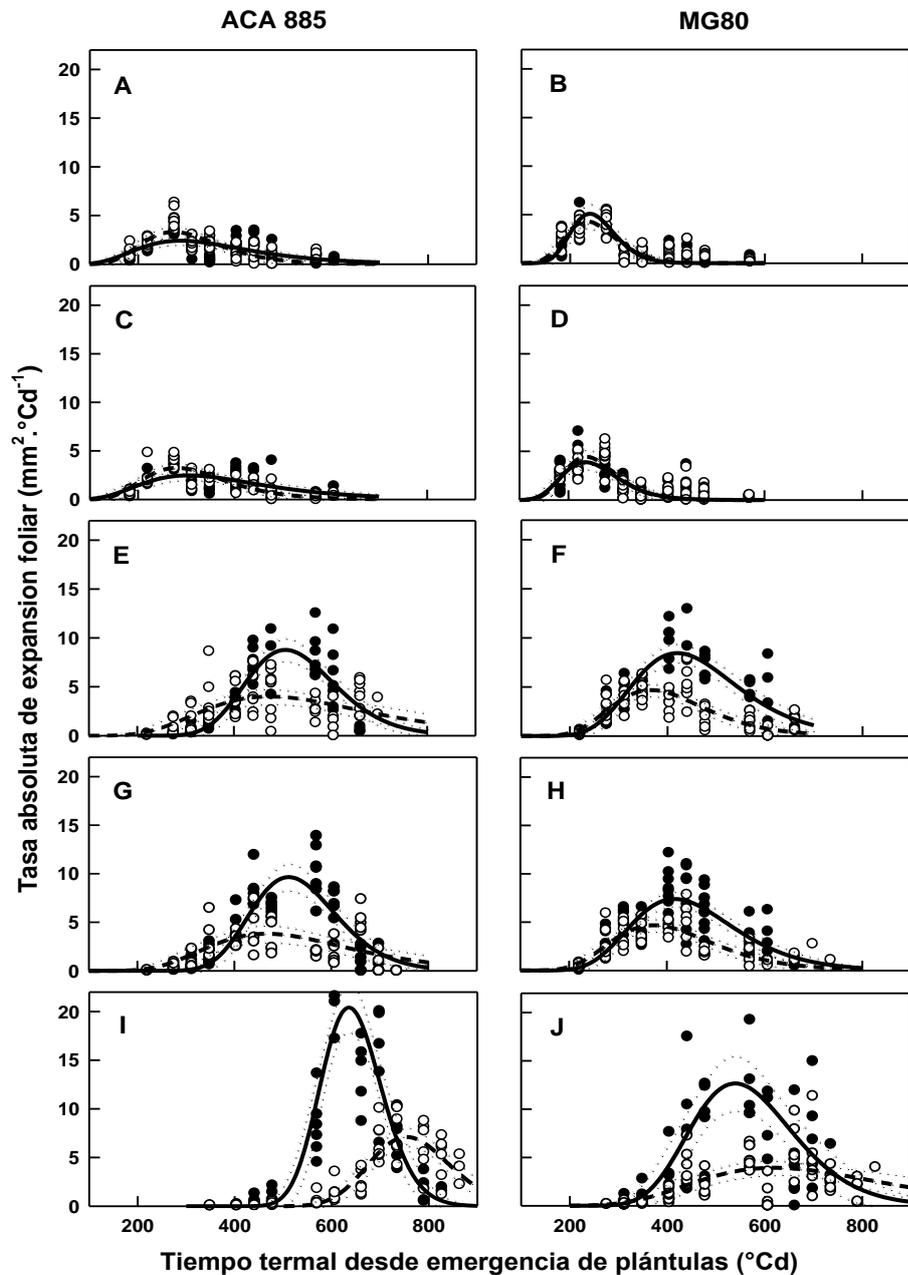


Fig. A.3. Tasas de expansión absoluta de dos híbridos de girasol (ACA885 y MG80) de las hojas 1 a 5. Las curvas con líneas continuas representan un ajuste con una función de segundo grado (cuadrática) para las plantas testigos (círculos negros) mientras que las líneas discontinuas lo son para las plantas tratadas con 150 mM de NaCl (círculos vacíos o blancos). Los ajustes de las curvas fueron logarítmicos de 3 parámetros de acuerdo a la siguiente ecuación: $f = a \cdot \exp(-0,5 \cdot (\ln(x/x_0)/b)^2)$.

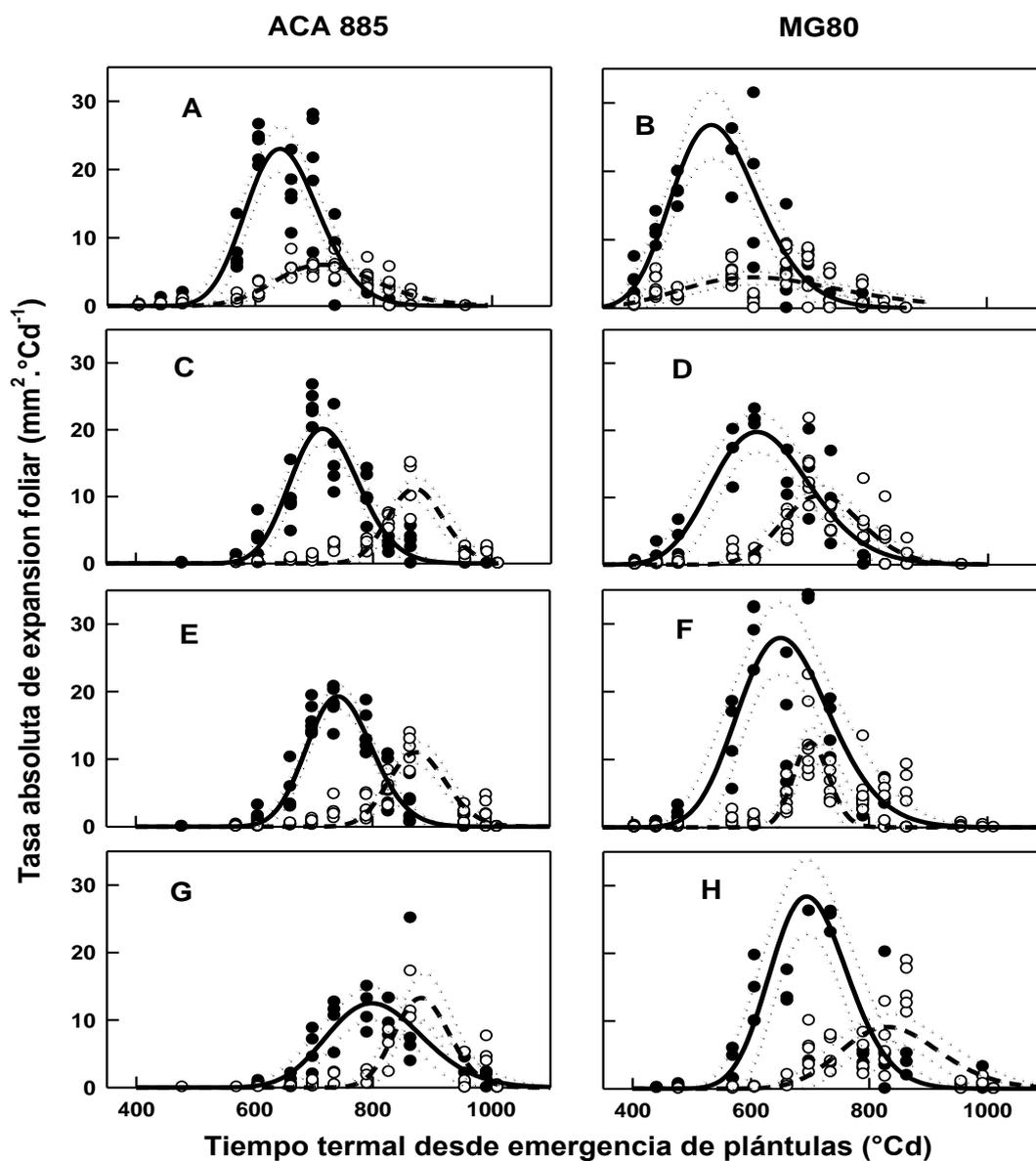


Fig. A.4. Tasas de expansión absoluta de dos híbridos de girasol (ACA885 y MG80) de las hojas 6 a 9. Las curvas con líneas continuas representan un ajuste con una función de segundo grado (cuadrática) para las plantas testigos (círculos negros) mientras que las líneas discontinuas lo son para las plantas tratadas con 150 mM de NaCl (círculos vacíos o blancos). Los ajustes de las curvas fueron logarítmicos de 3 parámetros de acuerdo a la siguiente ecuación: $f=a*\exp(-0,5*(\ln(x/x_0)/b)^2)$.

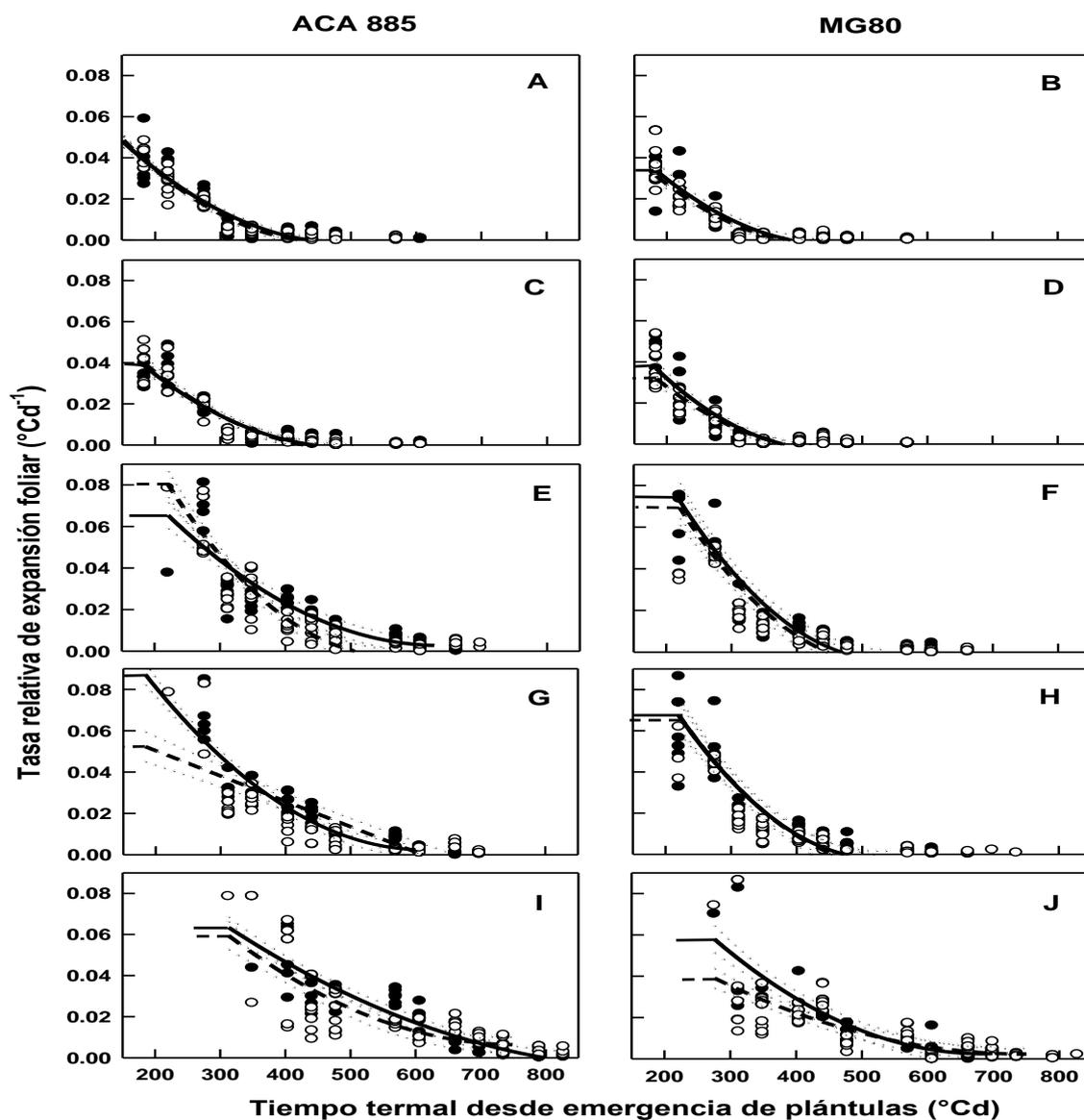


Fig. A.5. Tasas de expansión relativas de la hoja 1 a 5 en dos híbridos de girasol (ACA885 y MG80). Las líneas continuas son las curvas de una función de segundo grado para las plantas testigos (círculos negros); las líneas discontinuas los son para las plantas tratadas con 150 mM de NaCl (círculos vacíos o blancos).

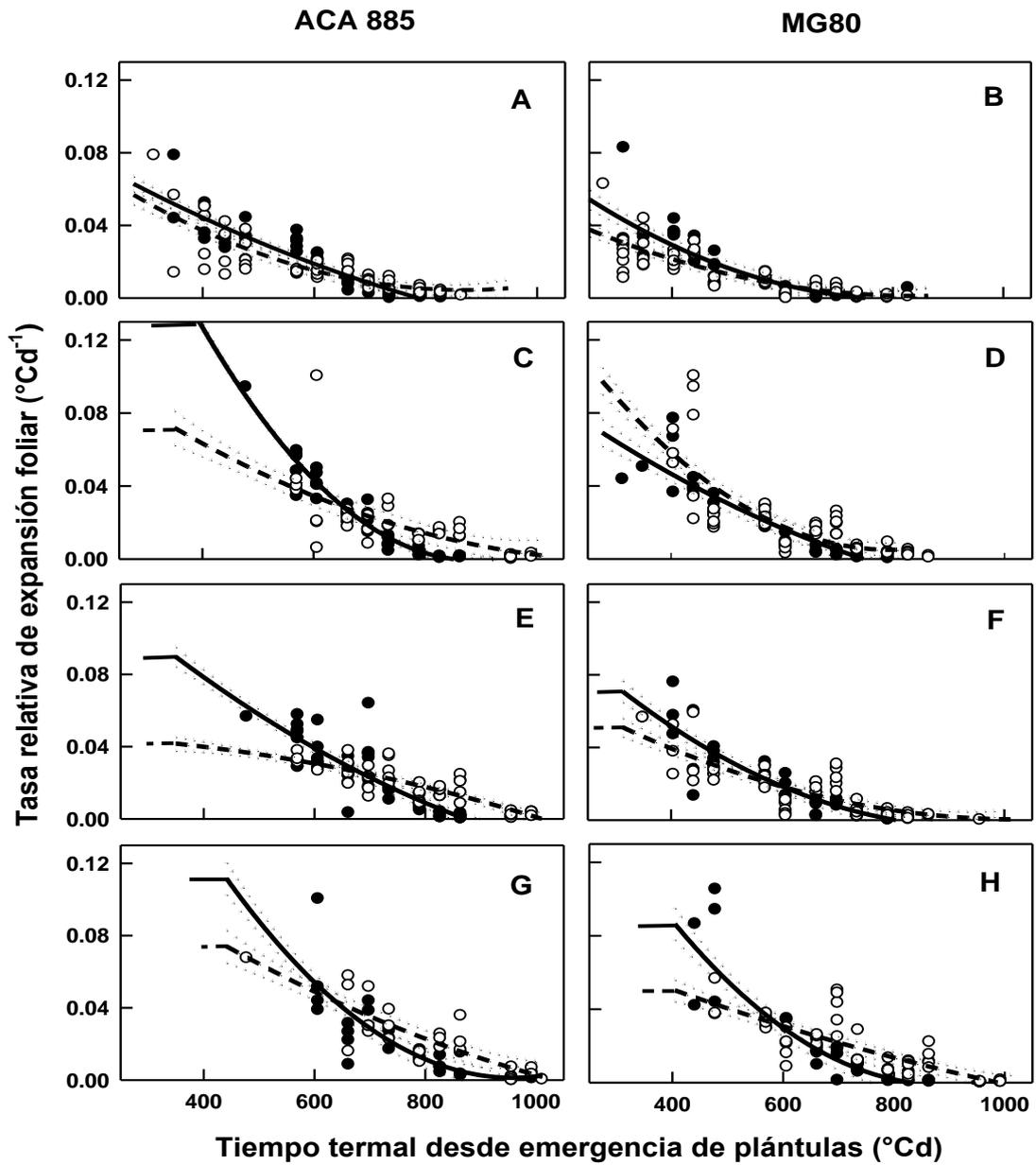


Fig. A.6. Tasas de expansión relativas de la hoja 6 a 9 en dos híbridos de girasol (ACA885 y MG80). Las líneas continuas son las curvas de una función de segundo grado para las plantas testigos (círculos negros); las líneas discontinuas los son para las plantas tratadas con 150 mM de NaCl (círculos vacíos o blancos).

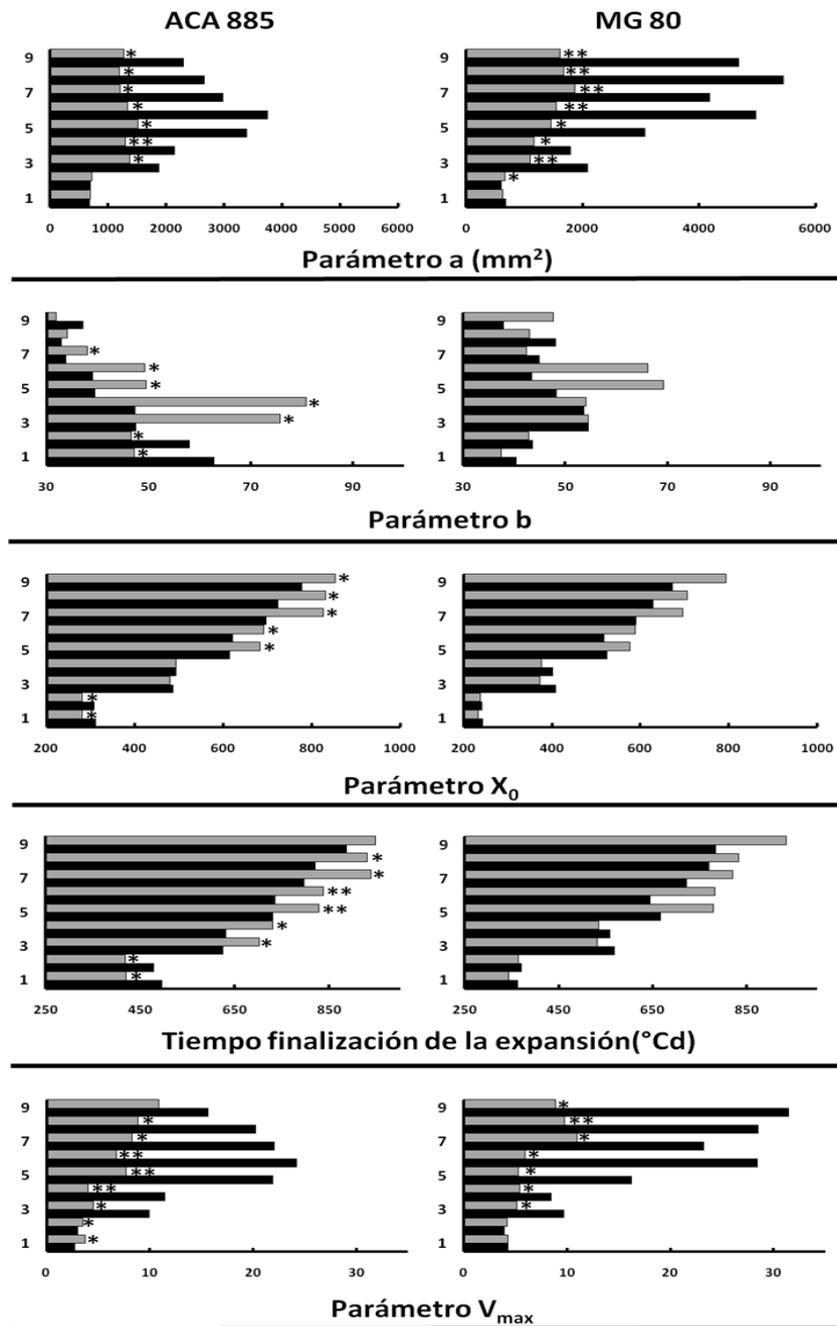


Fig. A.7. Parámetro a (mm²), parámetro b, parámetro x₀, tiempo en el cual finaliza la expansión y parámetro v_{max} en dos híbridos de girasol (ACA885 y MG80) de la hoja 1 a 9. Barras horizontales negras indican el promedio por variable, genotipo y hoja para plantas control y las grises, para plantas salinizadas. (*): diferencias estadísticamente significativas con p<0,05. (**): diferencias estadísticamente significativas con p< 0,01.

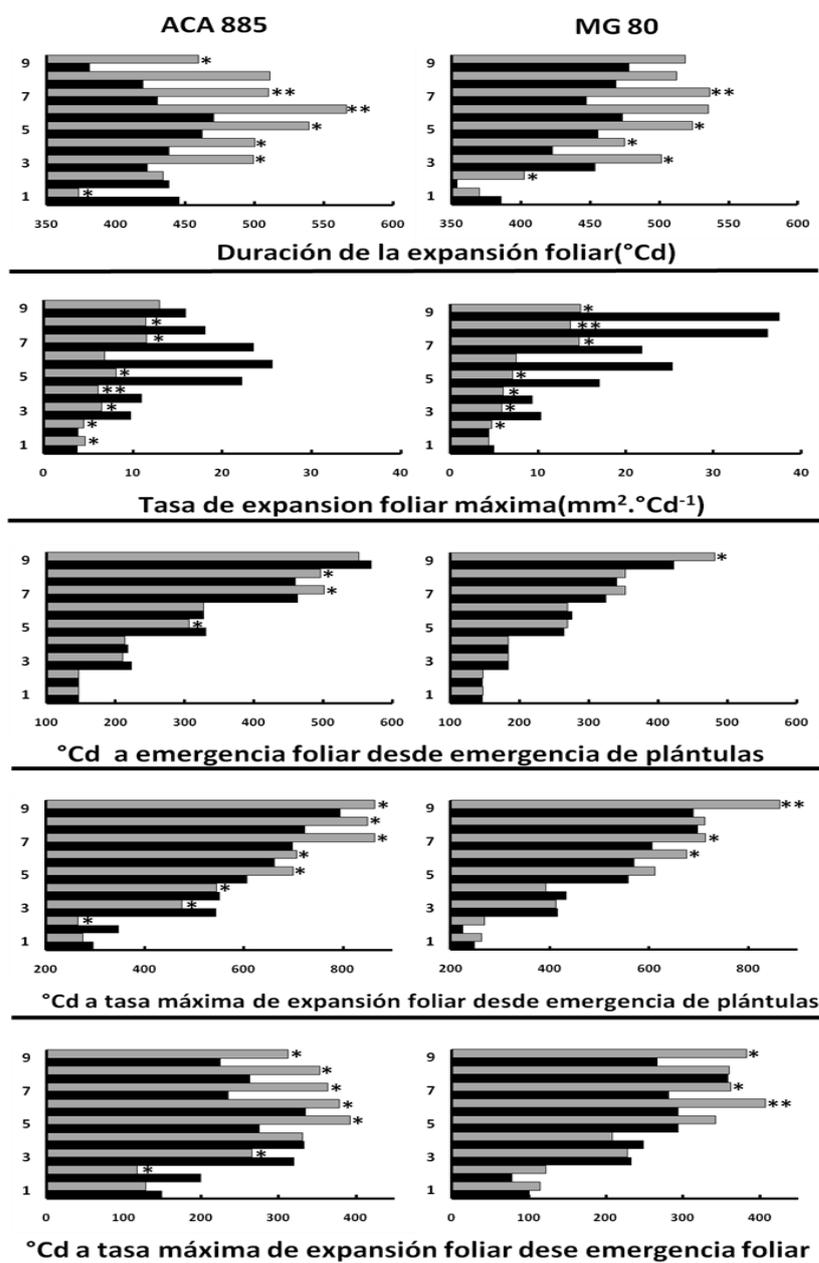


Figura A.8. Duración de la expansión foliar ($^{\circ}\text{Cd}$), tasa máxima de expansión foliar ($\text{mm}^2 \cdot ^{\circ}\text{Cd}^{-1}$), $^{\circ}\text{Cd}$ a emergencia foliar desde emergencia de plántulas y $^{\circ}\text{Cd}$ a máxima tasas de expansión foliar desde emergencia de plántulas y desde emergencia de hoja en dos híbridos de girasol (ACA885 y MG80) de la hoja 1 a 9. Barras horizontales negras indican el promedio por variable, genotipo y hoja para plantas control y las grises, para plantas salinizadas. (*): Diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$. (**): Diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,01$.

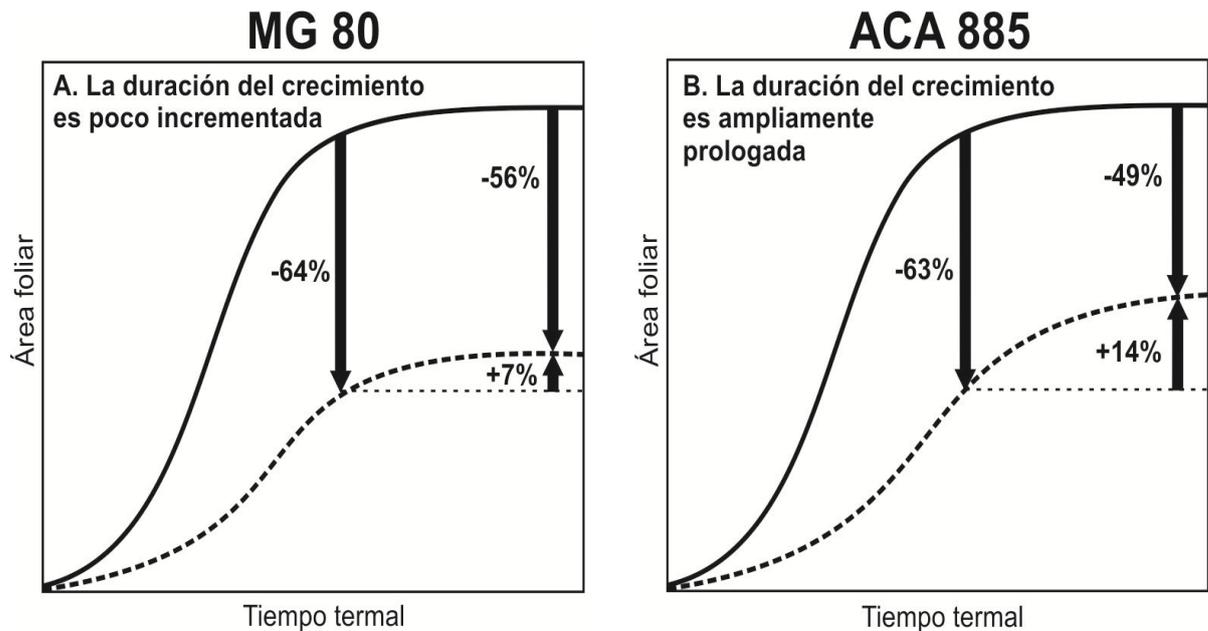


Fig. A.9. Efecto tasa y efecto duración sobre la reducción de la dinámica de la expansión foliar en dos híbridos de girasol (MG80 y ACA885). El primero corresponde al modelo propuesto por Pereyra-Irujo et al. (2008) donde no hay una compensación de la disminución de la tasa por un aumento de la duración y el segundo modelo que se dio para ACA885, en donde la disminución del área foliar final fue menor debido a una compensación de la prolongación de la expansión foliar sobre la disminución de la tasa de expansión.

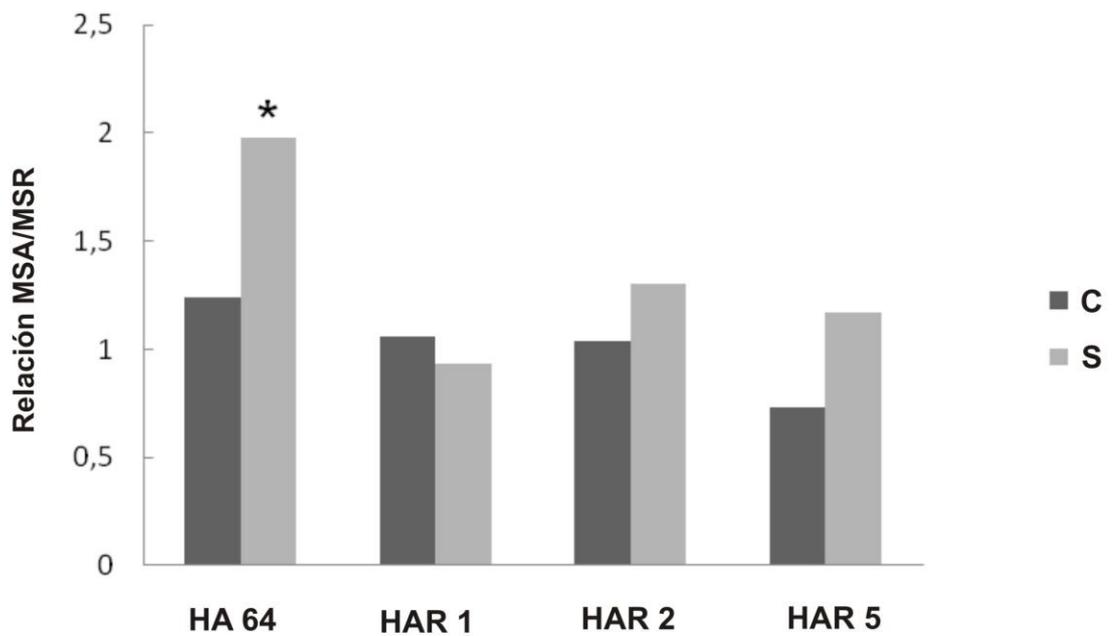


Fig. A.10 Efecto de la salinidad (130mM) sobre la relación materia seca de vástagos (MSA) y materia seca de raíces (MSR) en cuatro genotipos de girasol. El ensayo se llevó a cabo durante 918 °Cd en cámara de crecimiento con condiciones ambientales controladas. C: plantas control. S: plantas salinizadas.

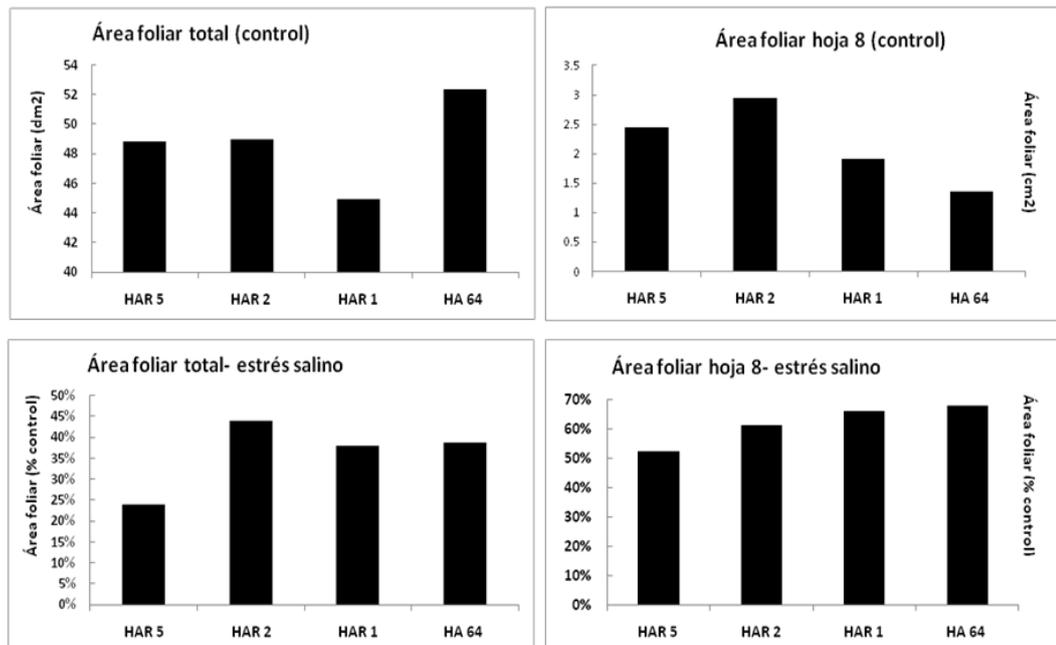


Figura A.11. Área foliar total (figuras de la izquierda) y Área foliar de la hoja 8 (figuras de la derecha) en cuatro genotipos de girasol contrastantes en inclusión foliar de Na^+ . Las figuras superiores son valores absolutos medios de plantas control. Las figuras inferiores son los valores medios de las plantas salinizadas como porcentajes respecto a las plantas control. Se siguió la metodología de presentación de los resultados reportados por Pereryra-Irujo *et al.* (2008).

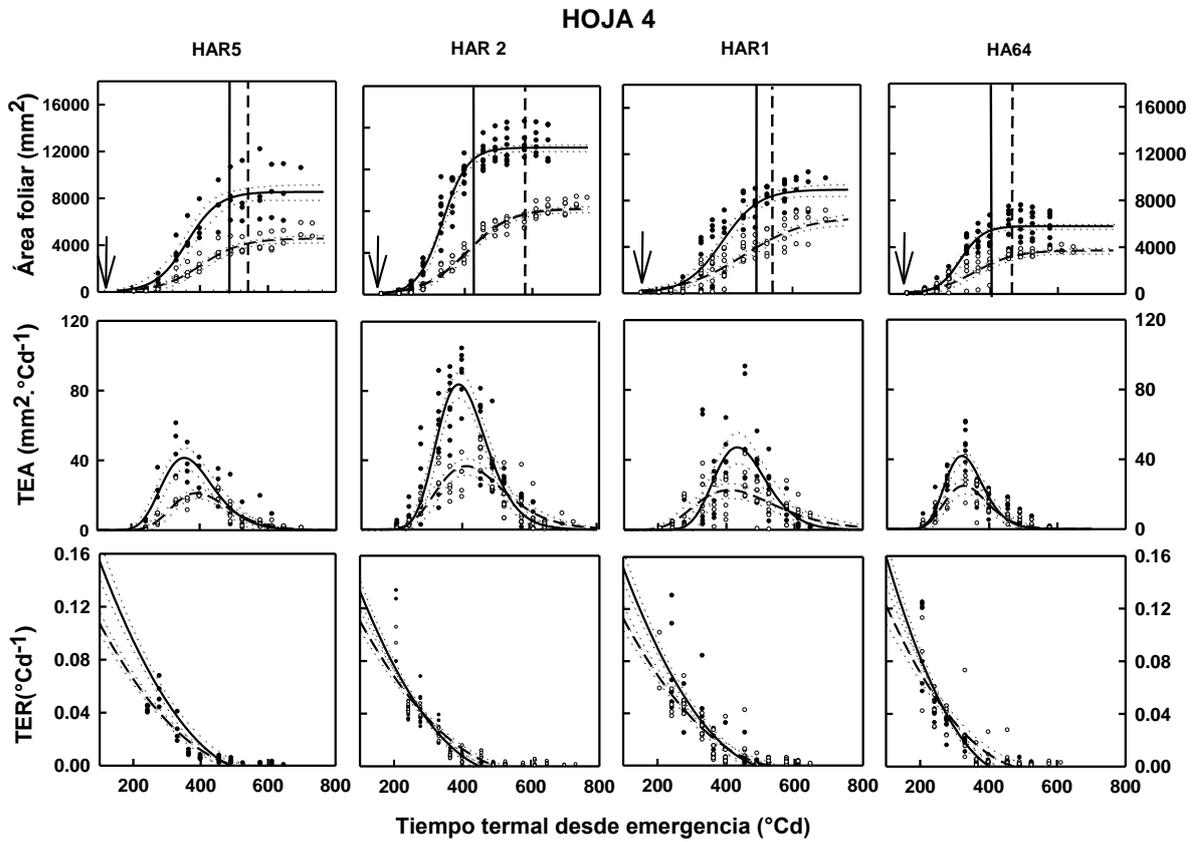


Fig. A.12. Efecto de la salinidad (130mM) sobre la expansión foliar, las tasas absolutas de expansión (TEA) y sobre las tasas relativas de expansión foliar (TER) de la hoja 4 en cuatro genotipos de girasol. Las líneas verticales continuas indican el final de la expansión para plantas control; las líneas discontinuas indican lo mismo para plantas tratadas con sal.

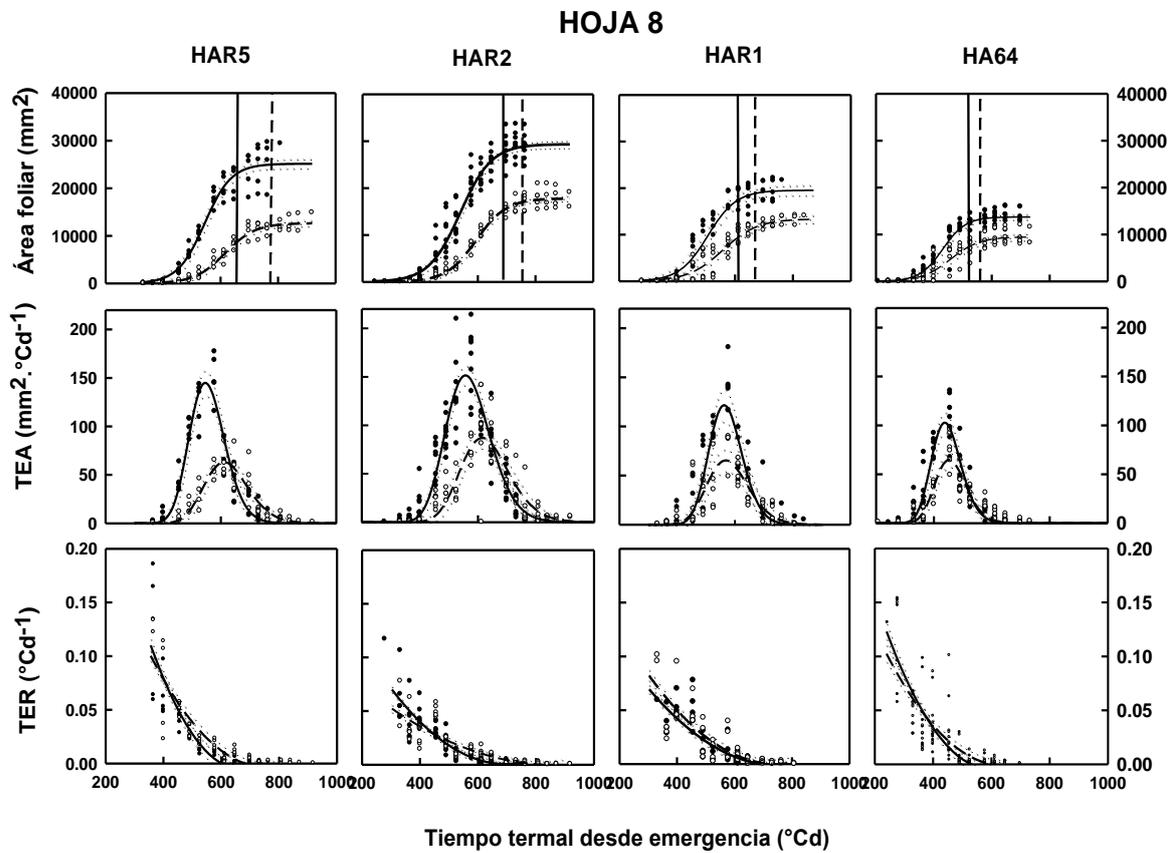


Fig. A.13 Efecto de la salinidad (130mM) sobre la expansión foliar, las tasas absolutas de expansión (TEA) y sobre las tasas relativas de expansión foliar (TER) en la hoja 8 en cuatro genotipos de girasol. Las líneas verticales continuas indican el final de la expansión para plantas control; las líneas discontinuas indican lo mismo para plantas tratadas con sal.

HOJA 12

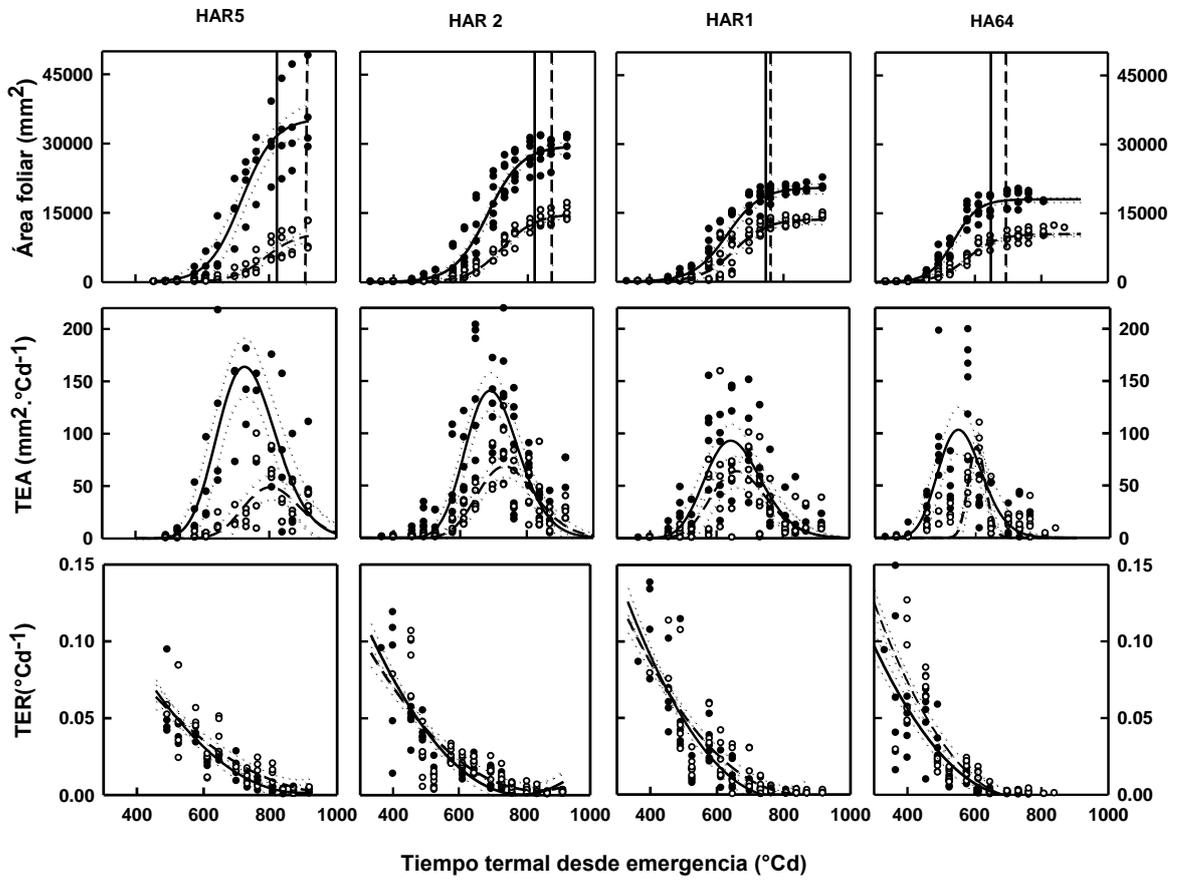


Fig. A.14. Efecto de la salinidad (130mM) sobre la expansión foliar, las tasas absolutas de expansión (TEA) y sobre las tasas relativas de expansión foliar (TER) en la hoja 12 en cuatro genotipos de girasol. Las líneas verticales continuas indican el final de la expansión para plantas control; las líneas discontinuas indican lo mismo para plantas tratadas con sal.

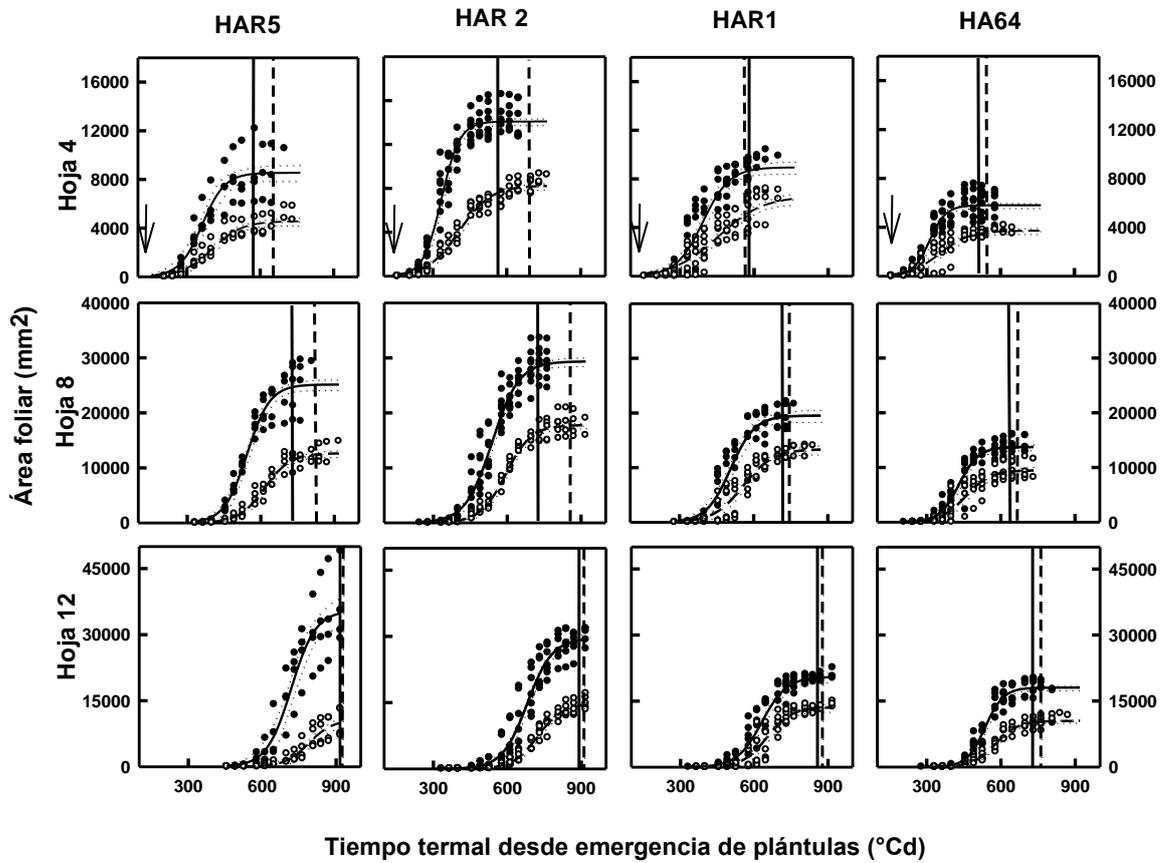


Fig. A.15. Expansión de las hojas 4, 8 y 12 en cuatro líneas de girasol cultivados bajo condiciones control y de salinidad (130 mM NaCl). Los círculos rellenos corresponden a plantas individuales control y las líneas continuas, a la curva de ajuste sigmoideo. Las líneas verticales continuas y discontinuas indican la finalización de la expansión de esa hoja en plantas control y salinizadas, respectivamente. Las flechas indican el inicio del tratamiento salino. Los ajustes de las curvas fueron sigmoideos de 3 parámetros, según la siguiente ecuación: $f=a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$.

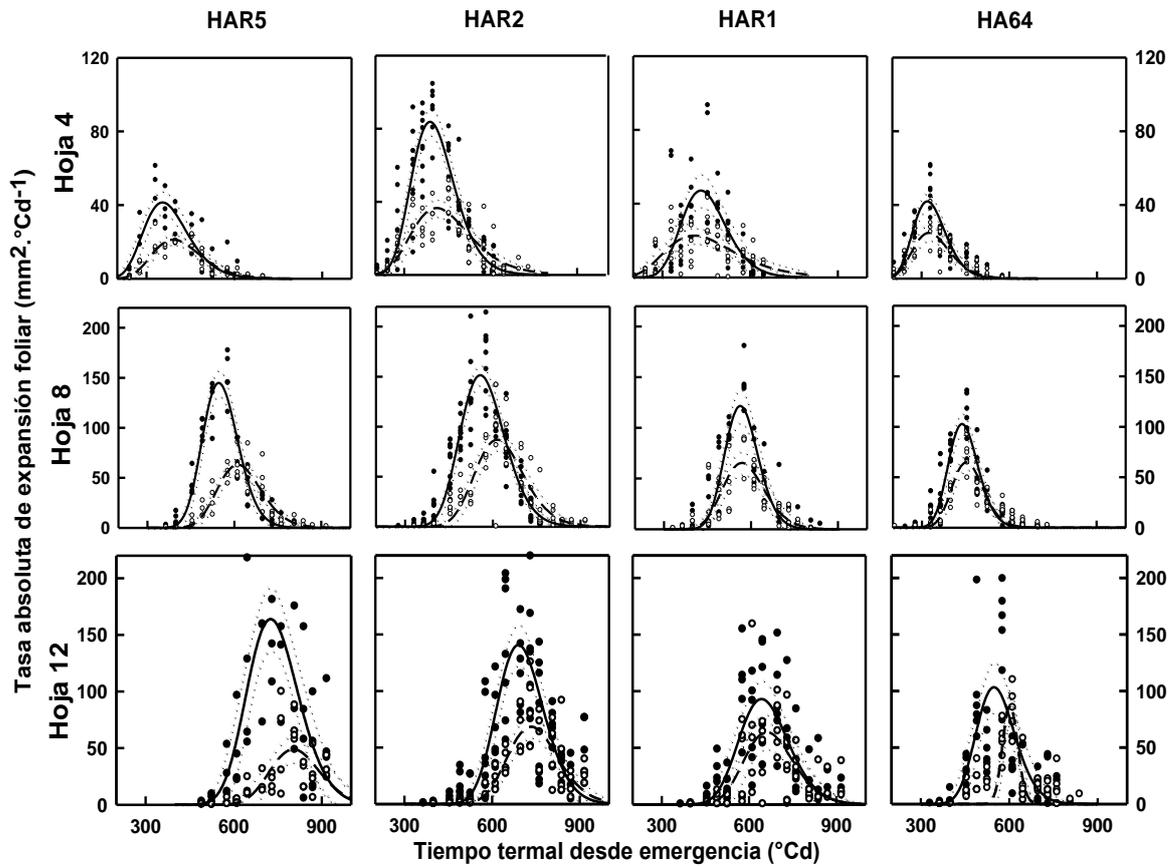


Fig. A.16 Tasas de expansión absolutas de las hojas 4, 8 y 12 en plantas de cuatro líneas de girasol cultivadas bajo condiciones control y de salinidad (130 mM NaCl). Los círculos rellenos y vacíos corresponden a plantas individuales, control y salinas, respectivamente. Las curvas continuas y discontinuas corresponden a la curva de ajuste sigmoideo de las plantas controles y salinas, respectivamente. Las líneas rectas verticales continuas y discontinuas indican la finalización de la expansión de plantas control y salinizadas, respectivamente. Las flechas indican el inicio del tratamiento salino. Los ajustes de las curvas fueron logarítmicos de 3 parámetros de acuerdo a la siguiente ecuación: $f=a*\exp(-0,5*(\ln(x/x_0)/b)^2)$.

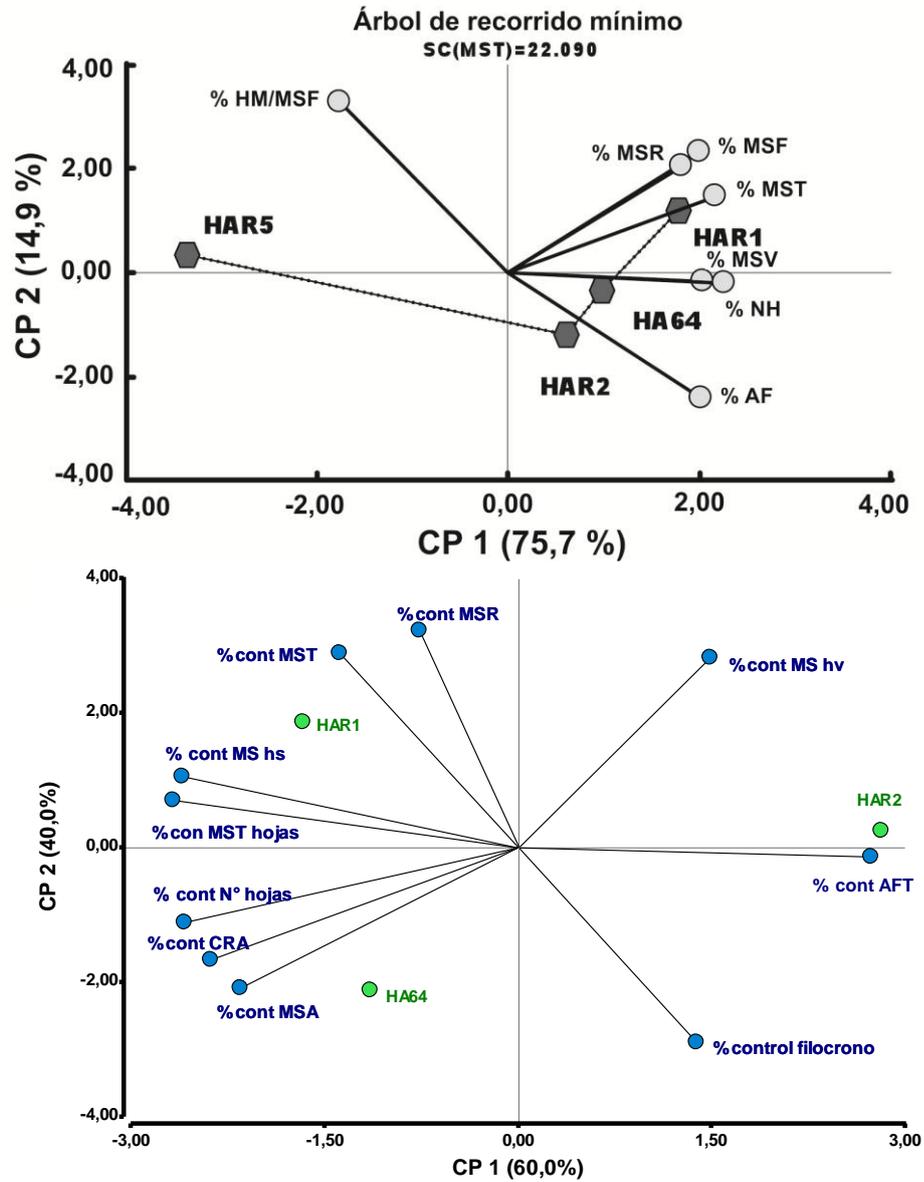


Fig. A.17 Análisis de componentes principales teniendo en cuenta los cuatro genotipos (A) y con menor cantidad de variables analizadas y teniendo en cuenta un mayor número de variables (B) sin el genotipo HAR5. Todas las variables fueron colocadas como porcentajes respecto al control.

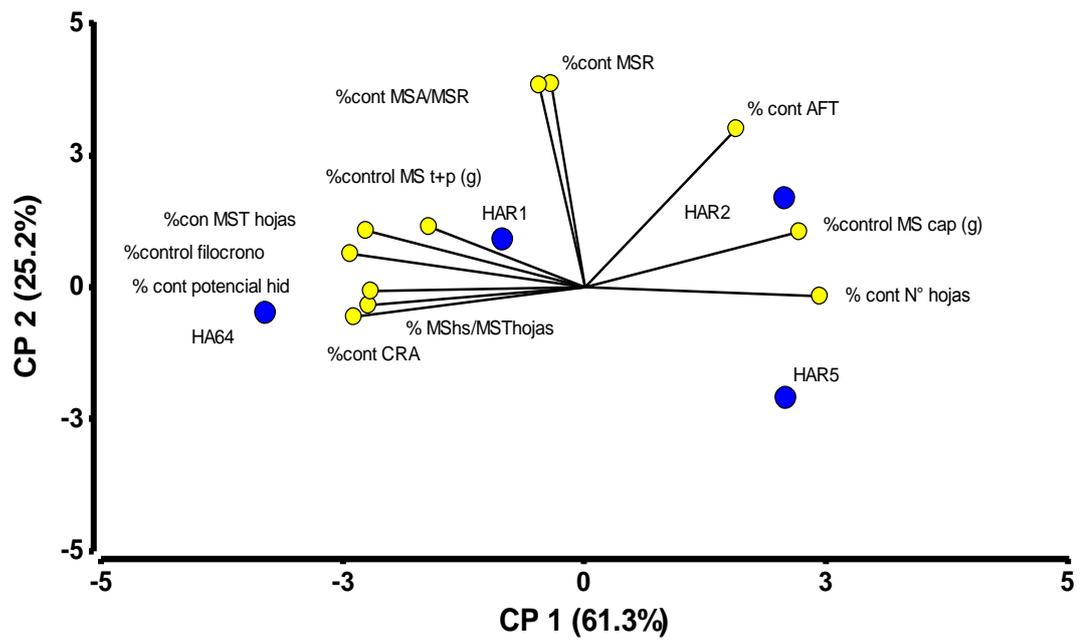


Fig. A.18. Análisis de componentes principales teniendo en cuenta todas las variables de crecimiento. Todas las variables fueron colocadas como porcentajes respecto al control.

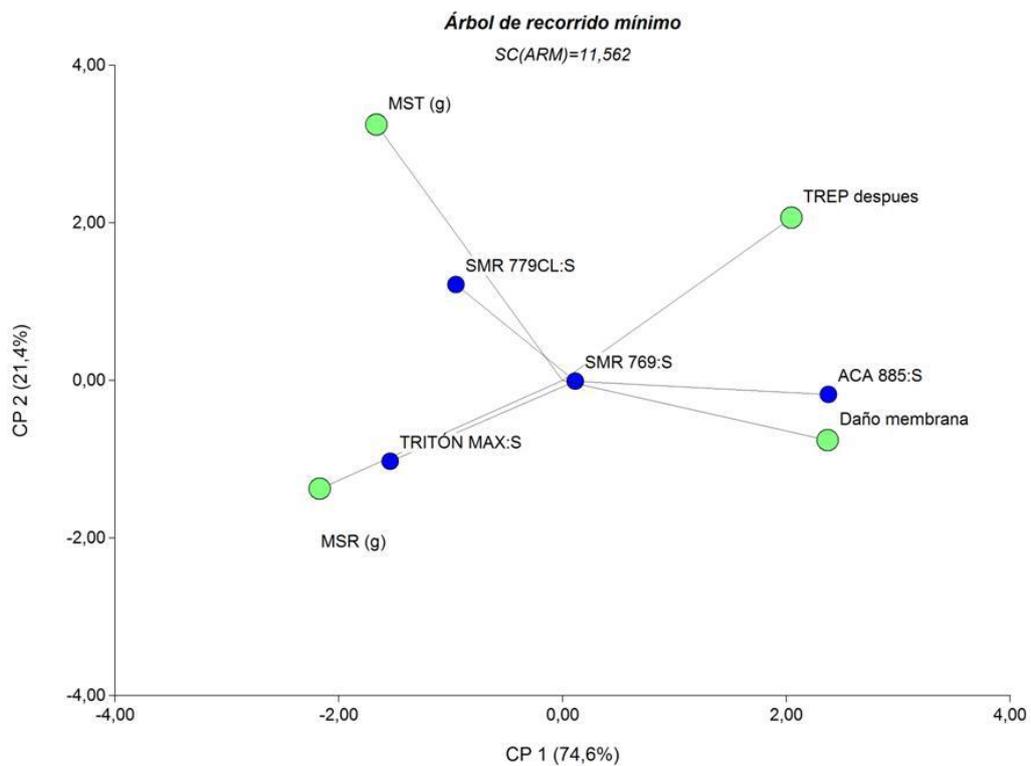


Fig. A.19. Análisis de componentes principales (ACP) en los cuatro híbridos utilizados que contrastan en inclusión foliar de Na^+ y nivel de daño de membrana por salinidad. El ACP se realizó para determinar que variables contribuían con mayor peso para separar entre genotipos y determinar su variabilidad. Una vez determinadas las variables más importantes, las mismas fueron utilizadas para realizar el ranking de tolerancia a salinidad a largo y a corto y largo plazo en los cuatro híbridos estudiados (Capítulo II, Tabla 2.11.).

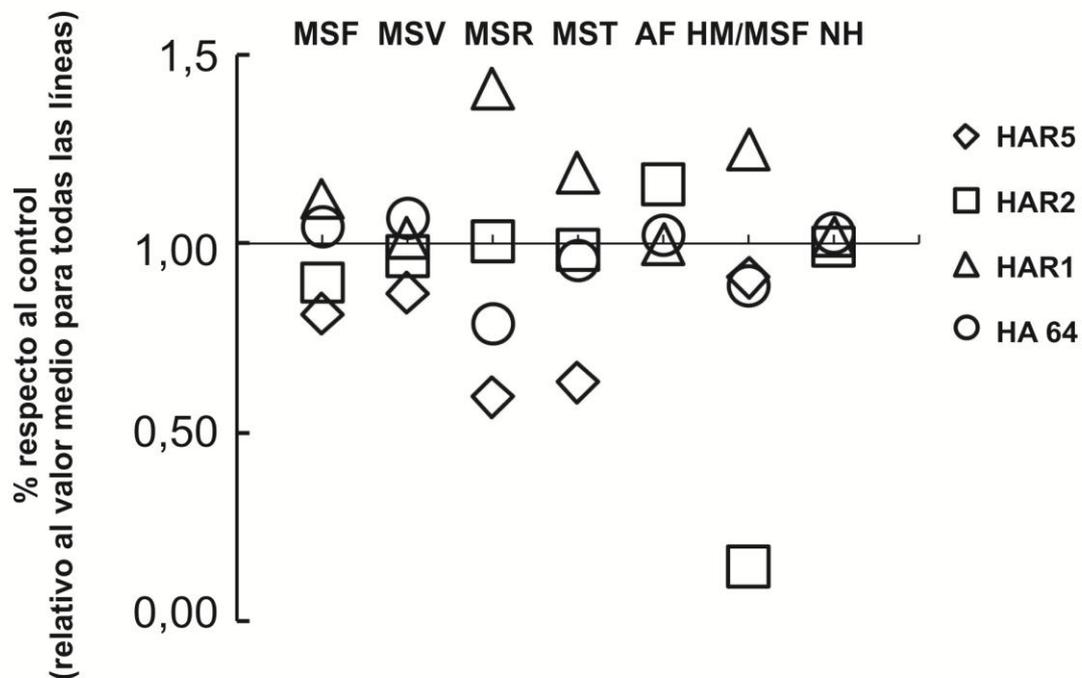


Fig. A.20. Efecto de la salinidad sobre la materia seca foliar (MSF), la materia seca de hoja verde (MSV), la materia seca radical (MSR), la materia seca total de planta (MST), el area foliar total por planta (AF), la relación materia seca de hoja muerta sobre el total de materia seca de hojas (HM/MSF) y sobre el número de hojas (NH). Cada símbolo representa el valor correspondiente para una variable y genotipo dado que se obtiene a partir de dividir la media obtenida de las plantas salinas de esa variable sobre la media obtenida para esa variable promediando todos los genotipos.

Tabla A.1 Efecto de la salinidad (130 mM NaCl) sobre el contenido de clorofila ($\mu\text{g/gPF}$) y de malondialdeído (MDA, subproducto de la peroxidación de lípidos)(mM/gPF) en cuatro gentipos de girasol.

	HAR5		HAR2		HAR1		HA64	
	C	S	C	S	C	S	C	S
Clorofila($\mu\text{g/g PF}$)	2654,7bc	2630,1bc	2802,8c	2781,8c	2385,5abc	1903,4a	2410,8abc	2091,4ab
% del control		99,07		99,25		79,79		86,75
MDA (mM/g PF)	0,102 ab	0,067 a	0,1192b	0,0713a	0,1238b	0,0810a	0,1519 c	0,1107 b
% del control		65,55		59,79		65,46		72,85
DMS (clorofila)	589,77							
DMS (MDA)	0,0301							

Hoja 2

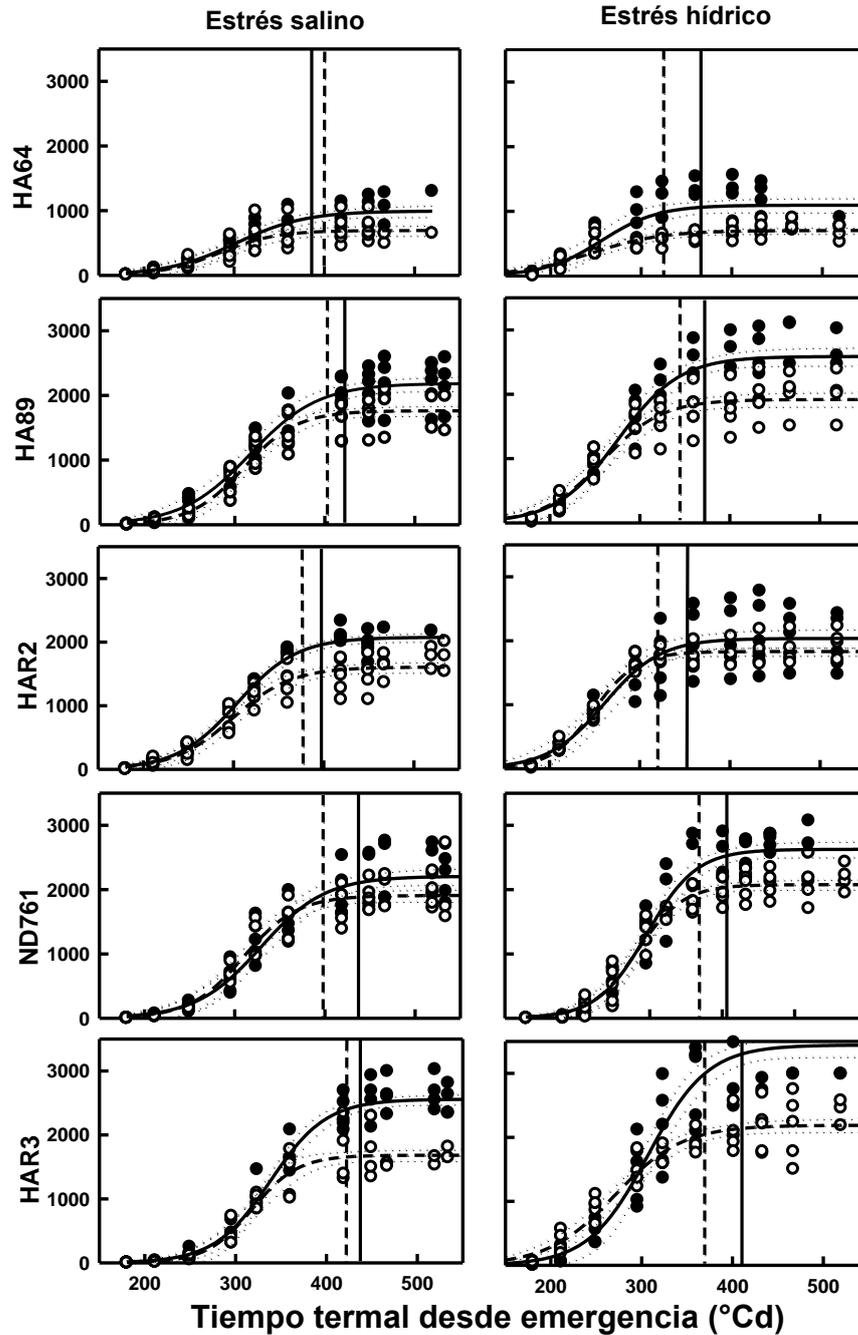


Fig. A.21. Expansión foliar de la hoja 2 en 5 genotipos de girasol en condiciones control (círculos rellenos) y bajo estrés salino o hídrico (círculos vacíos). El nivel de salinidad impuesto fue de 130 mM, equivalente a un estrés osmótico de -0,65 MPa impuesto en el estrés hídrico. Las líneas continuas verticales indican la finalización de la expansión para plantas control y las discontinuas la finalización de la expansión para las plantas tratadas con sal o estrés hídrico (columna de la izquierda y la derecha, respectivamente). Valores eje y en mm².

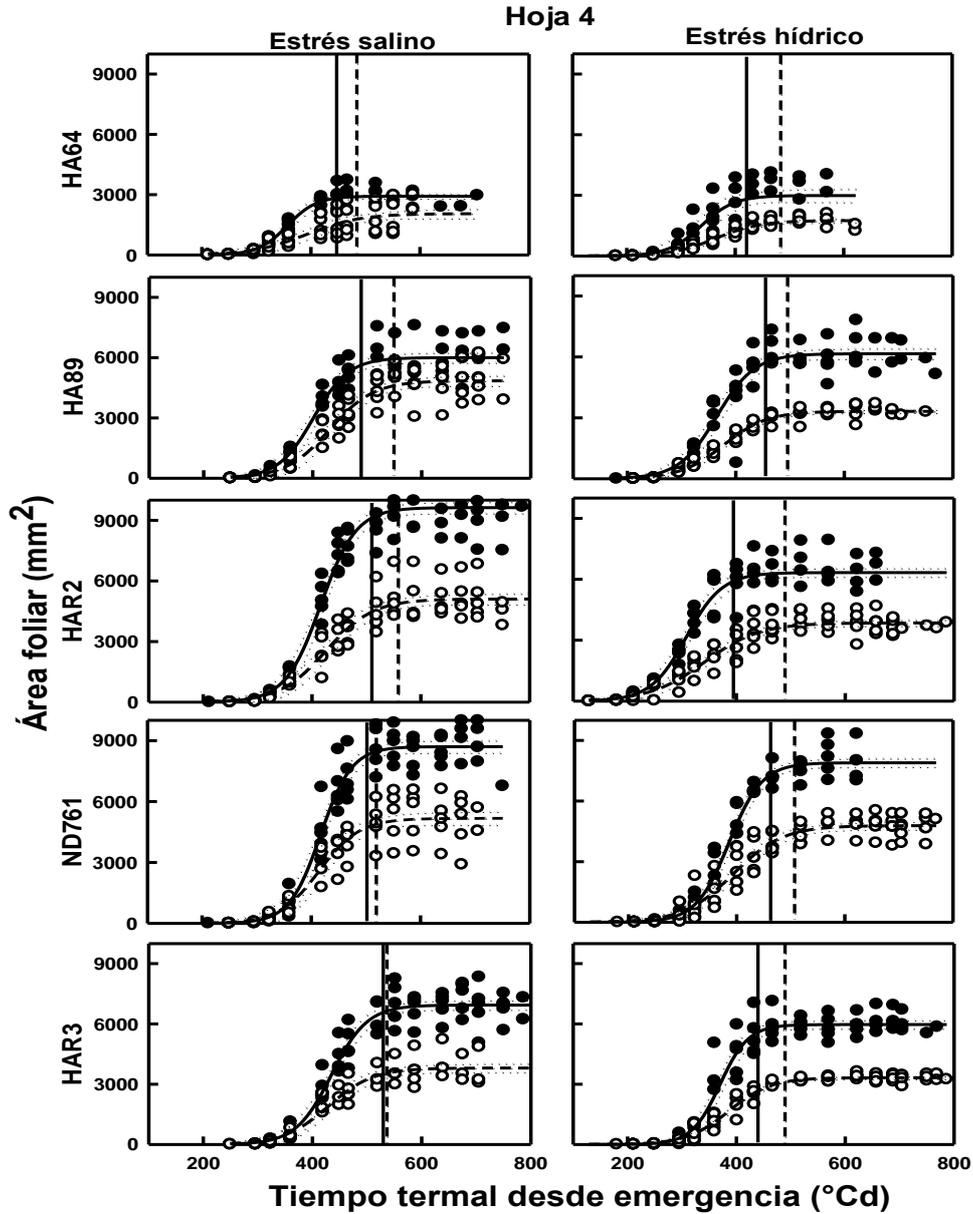


Fig. A.22. Expansión foliar de la hoja 4 en 5 genotipos de girasol en condiciones control (círculos rellenos) y bajo estrés salino o hídrico (círculos vacíos). El nivel de salinidad impuesto fue de 130 mM, equivalente a un estrés osmótico de -0,65 MPa impuesto en el estrés hídrico. Las líneas continuas verticales indican la finalización de la expansión para plantas control y las discontinuas la finalización de la expansión para las plantas tratadas con sal o estrés hídrico (columna de la izquierda y la derecha, respectivamente).

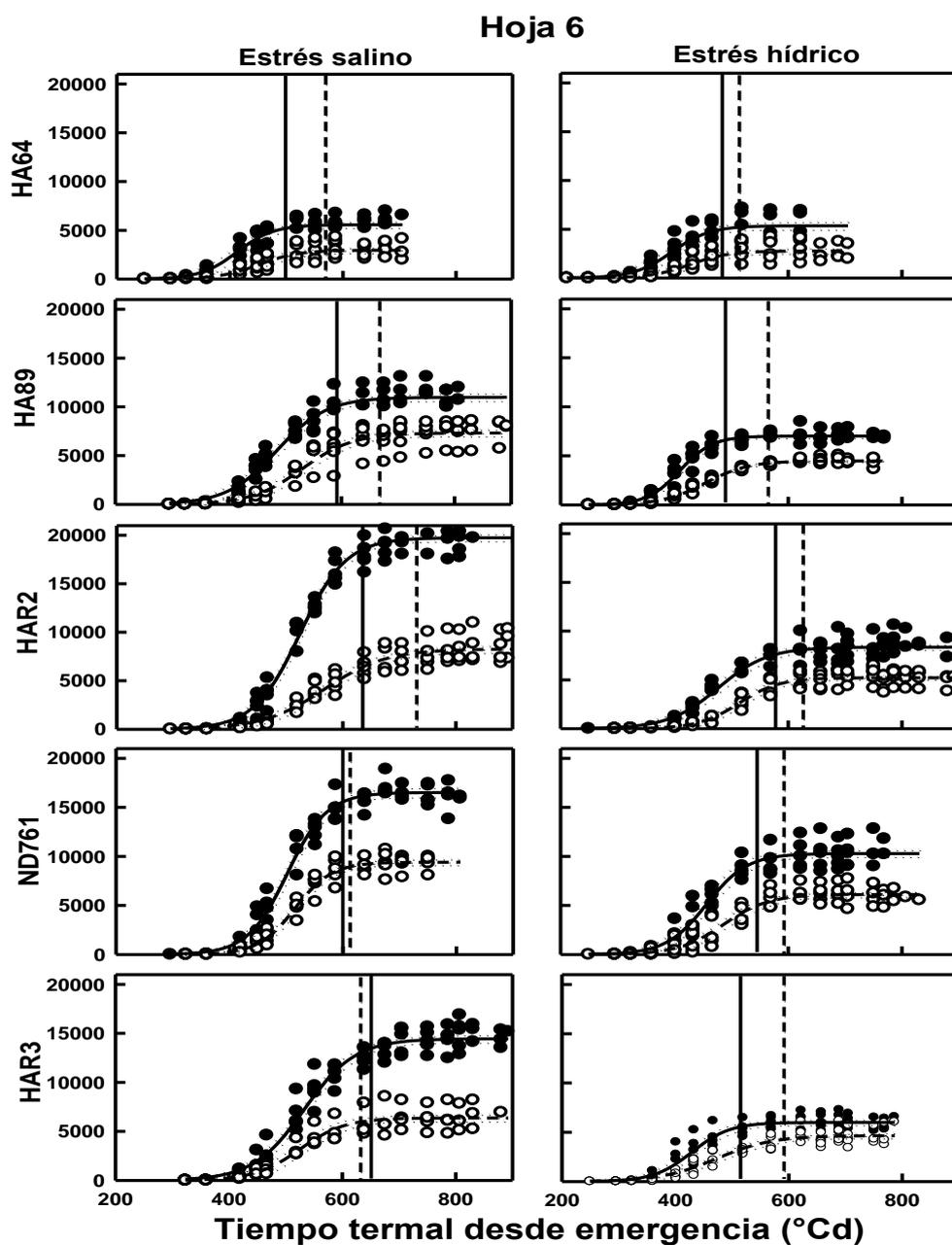


Fig. A.23. Expansión foliar de la hoja 6 en 5 genotipos de girasol en condiciones control (círculos rellenos) y bajo estrés salino o hídrico (círculos vacíos). El nivel de salinidad impuesto fue de 130 mM, equivalente a un estrés osmótico de -0,65 MPa impuesto en el estrés hídrico. Las líneas continuas verticales indican la finalización de la expansión para plantas control y las discontinuas la finalización de la expansión para las plantas tratadas con sal o estrés hídrico (columna de la izquierda y la derecha, respectivamente). Valores eje y en mm^2 .

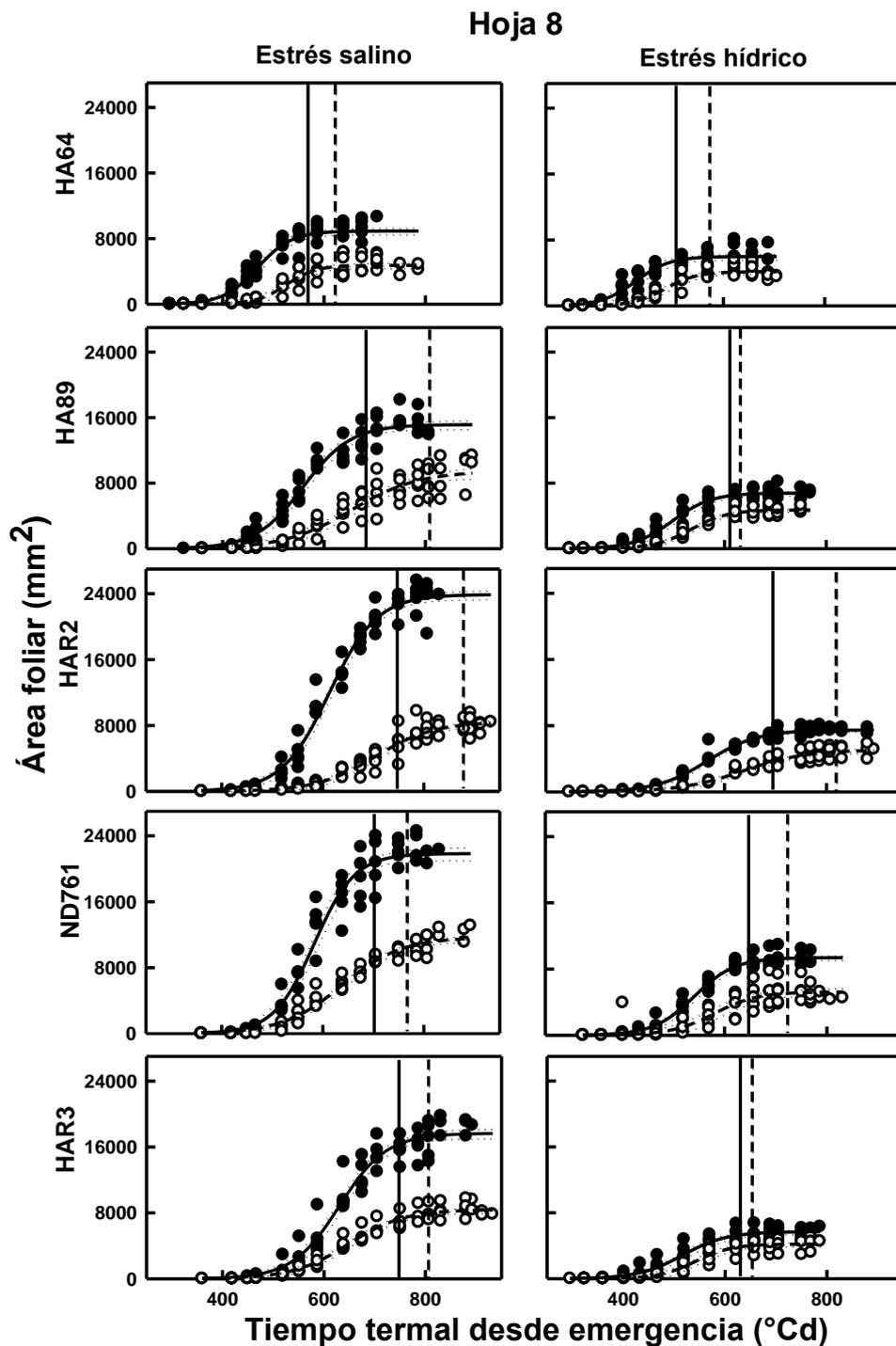


Fig. A.24. Expansión foliar de la hoja 8 en 5 genotipos de girasol en condiciones control (círculos rellenos) y bajo estrés salino o hídrico (círculos vacíos). El nivel de salinidad impuesto fue de 130 mM, equivalente a un estrés osmótico de -0,65 MPa impuesto en el estrés hídrico. Las líneas continuas verticales indican la finalización de la expansión para plantas control y las discontinuas la finalización de la expansión para las plantas tratadas con sal o estrés hídrico (columna de la izquierda y la derecha, respectivamente).

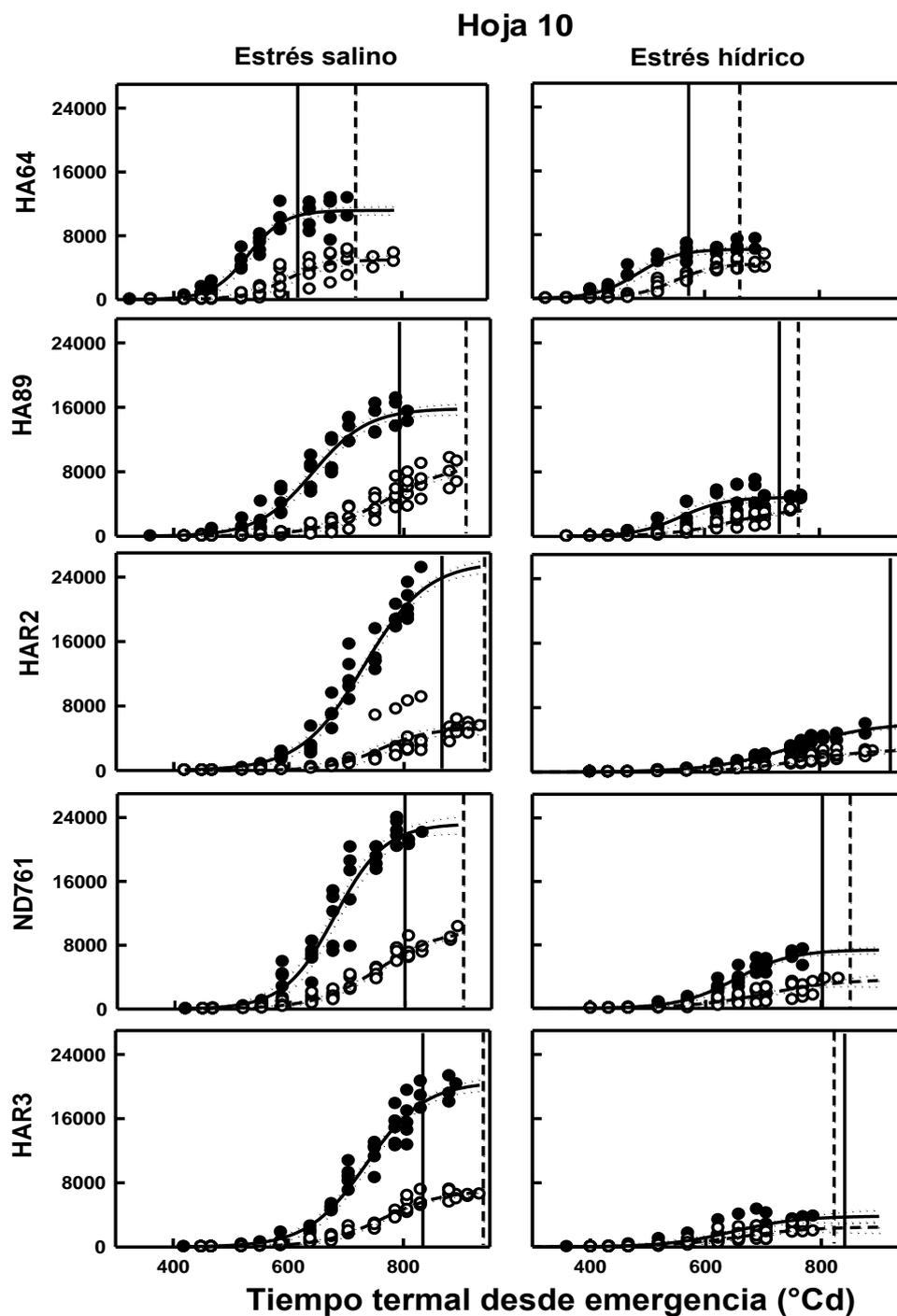


Fig. A.25. Expansión foliar de la hoja 10 en 5 genotipos de girasol en condiciones control (círculos rellenos) y bajo estrés salino o hídrico (círculos vacíos). El nivel de salinidad impuesto fue de 130 mM, equivalente a un estrés osmótico de -0,65 MPa impuesto en el estrés hídrico. Las líneas continuas verticales indican la finalización de la expansión para plantas control y las discontinuas la finalización de la expansión para las plantas tratadas con sal o estrés hídrico (columna de la izquierda y la derecha, respectivamente). Valores eje y en mm².

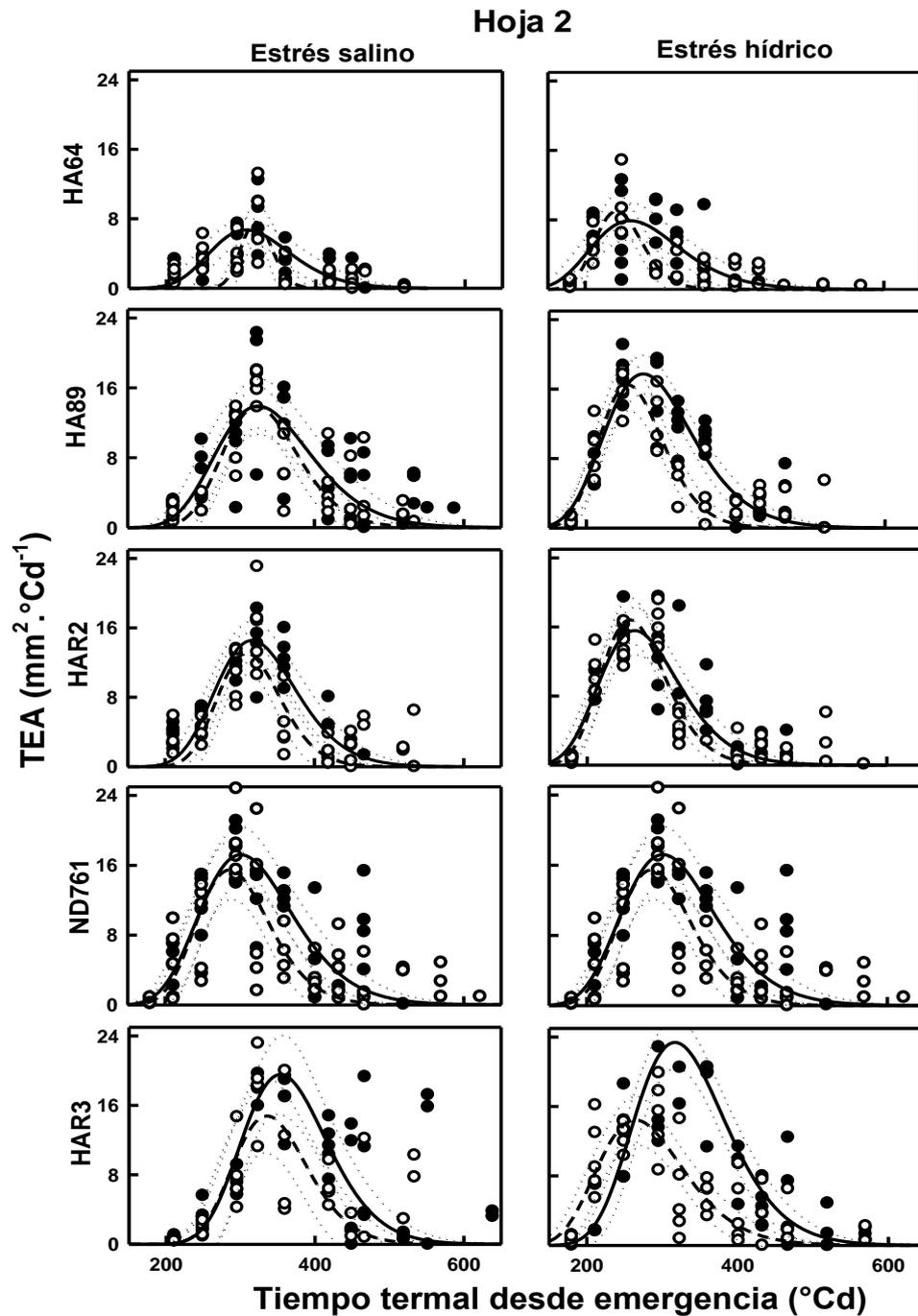


Fig. A.26. Tasas absolutas de expansión foliar de la hoja 2 en 5 genotipos de girasol en condiciones control (círculos rellenos) y bajo estrés salino o hídrico (círculos vacíos). El nivel de salinidad impuesto fue de 130 mM, equivalente a un estrés osmótico de -0,65 MPa impuesto en el estrés hídrico. Las curvas continuas son los ajustes de las plantas control y las líneas discontinuas son los ajustes para las plantas tratadas (con sal o estrés hídrico en la columna de la izquierda y la derecha, respectivamente)

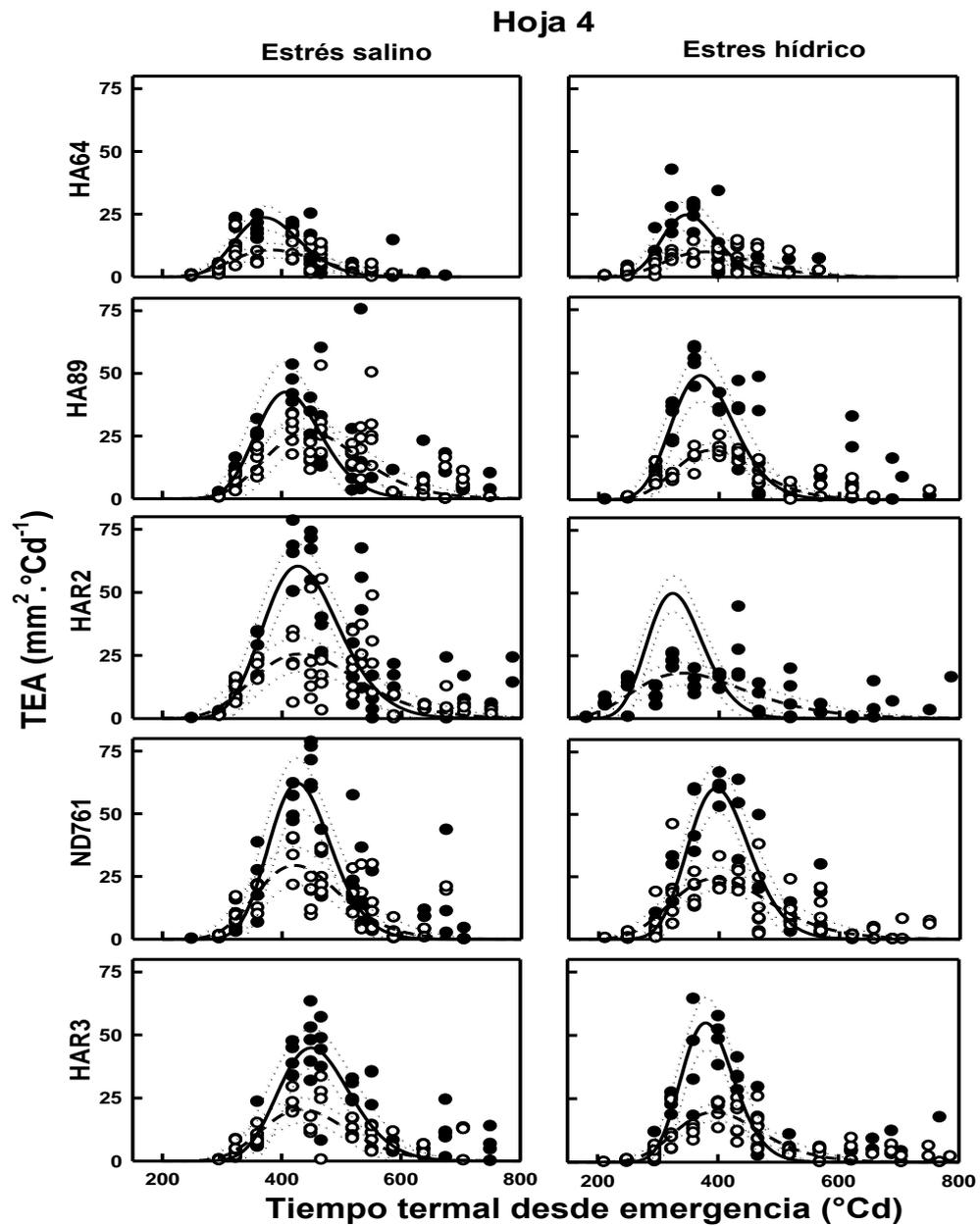


Fig. A.27. Tasas absolutas de expansión foliar de la hoja 4 en 5 genotipos de girasol en condiciones control (círculos rellenos) y bajo estrés salino o hídrico (círculos vacíos). El nivel de salinidad impuesto fue de 130 mM, equivalente a un estrés osmótico de -0,65 MPa impuesto en el estrés hídrico. Las curvas continuas son el ajuste de las plantas control y las líneas discontinuas son los ajustes para las plantas tratadas (con sal o estrés hídrico en la columna de la izquierda y la derecha, respectivamente)

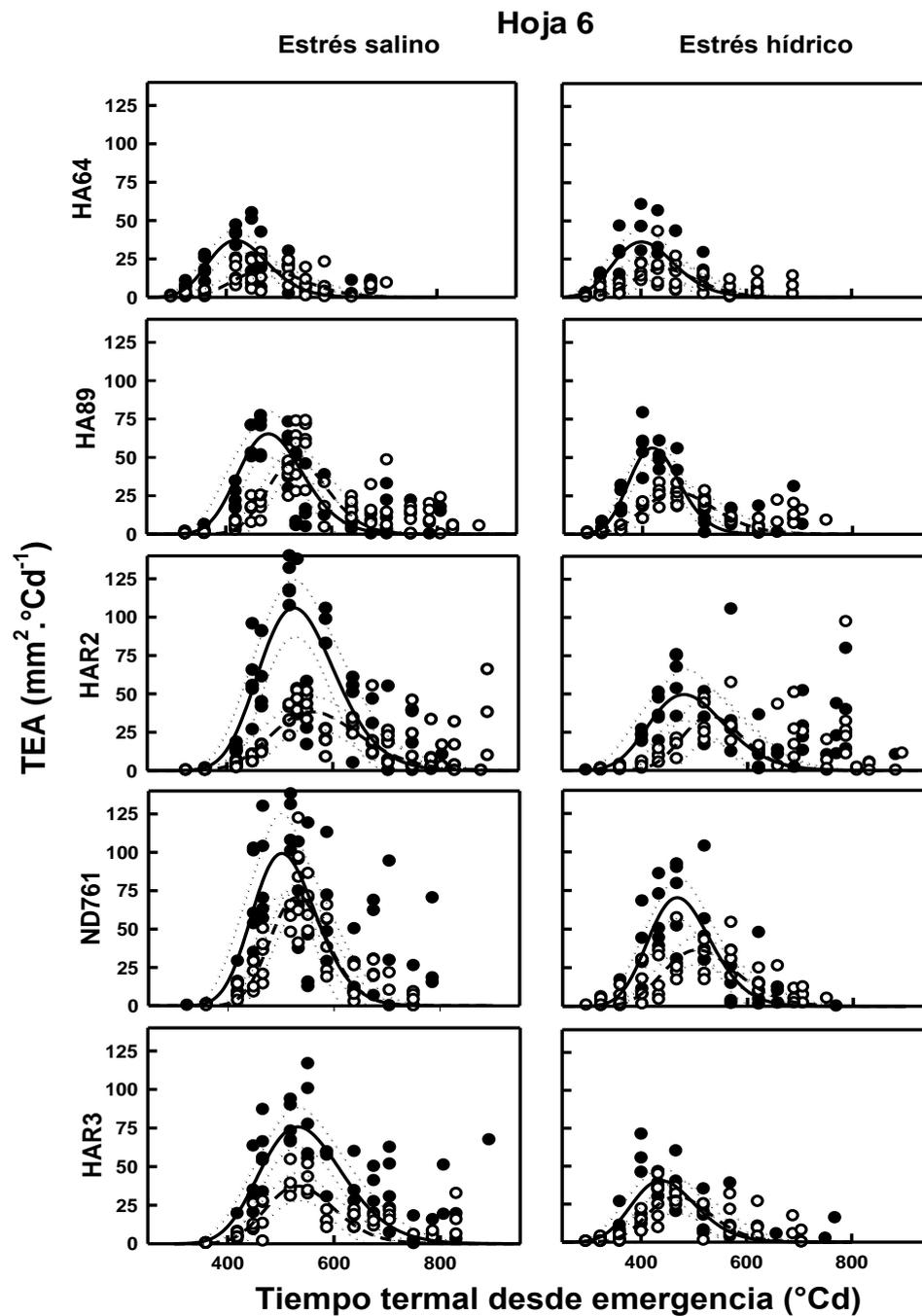


Fig. A.28. Tasas absolutas de expansión foliar de la hoja 6 en 5 genotipos de girasol en condiciones control (círculos rellenos) y bajo estrés salino o hídrico (círculos vacíos). El nivel de salinidad impuesto fue de 130 mM, equivalente a un estrés osmótico de -0,65 MPa impuesto en el estrés hídrico. Las curvas continuas son los ajustes de las plantas control y las líneas discontinuas son los ajustes para las plantas tratadas (con sal o estrés hídrico en la columna de la izquierda y la derecha, respectivamente).

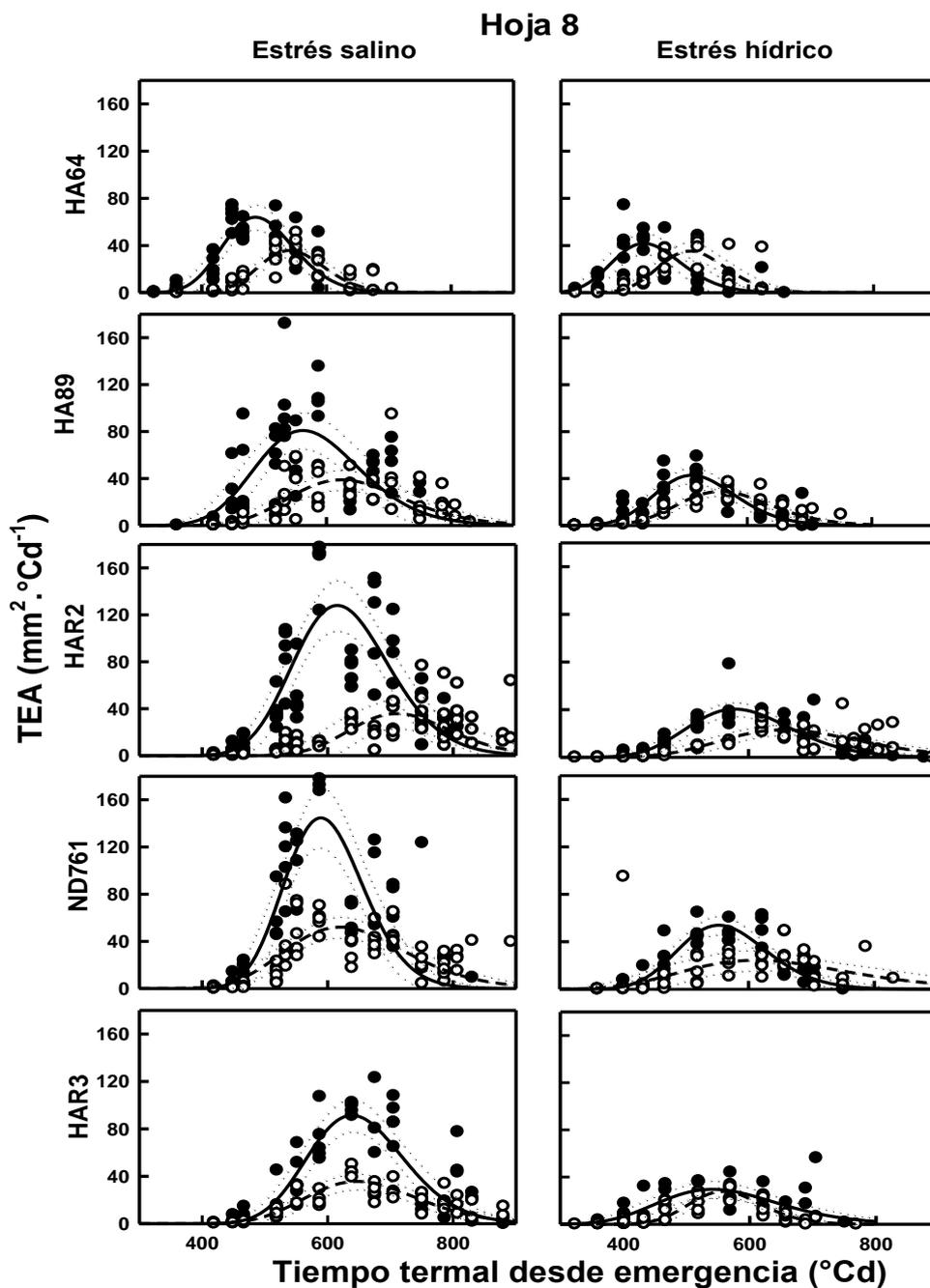


Fig. A.29. Tasas absolutas de expansión foliar de la hoja 8 en 5 genotipos de girasol en condiciones control (círculos rellenos) y bajo estrés salino o hídrico (círculos vacíos). El nivel de salinidad impuesto fue de 130 mM, equivalente a un estrés osmótico de -0,65 MPa impuesto en el estrés hídrico. Las curvas continuas son los ajustes de las plantas control y las líneas discontinuas para las plantas tratadas (con sal o estrés hídrico en la columna de la izquierda y la derecha, respectivamente).

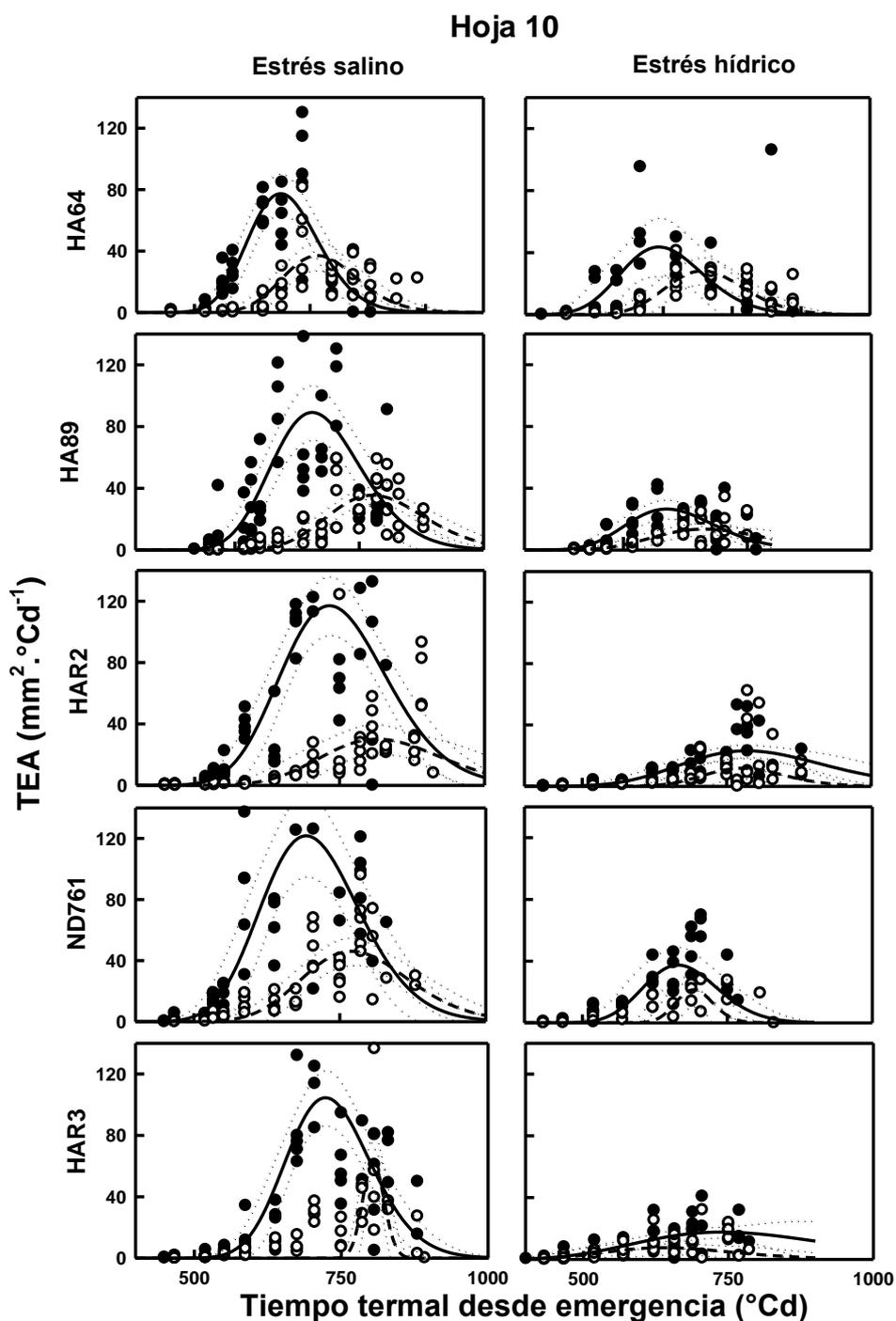


Fig. A.30. Tasas absolutas de expansión foliar de la hoja 10 en 5 genotipos de girasol en condiciones control (círculos rellenos) y bajo estrés salino o hídrico (círculos vacíos). El nivel de salinidad impuesto fue de 130 mM, equivalente a un estrés osmótico de -0,65 MPa impuesto en el estrés hídrico. Las curvas continuas son los ajustes de las planas control y las líneas discontinuas, los ajuste para las plantas tratadas (con sal o estrés hídrico en la columna de la izquierda y la derecha, respectivamente).

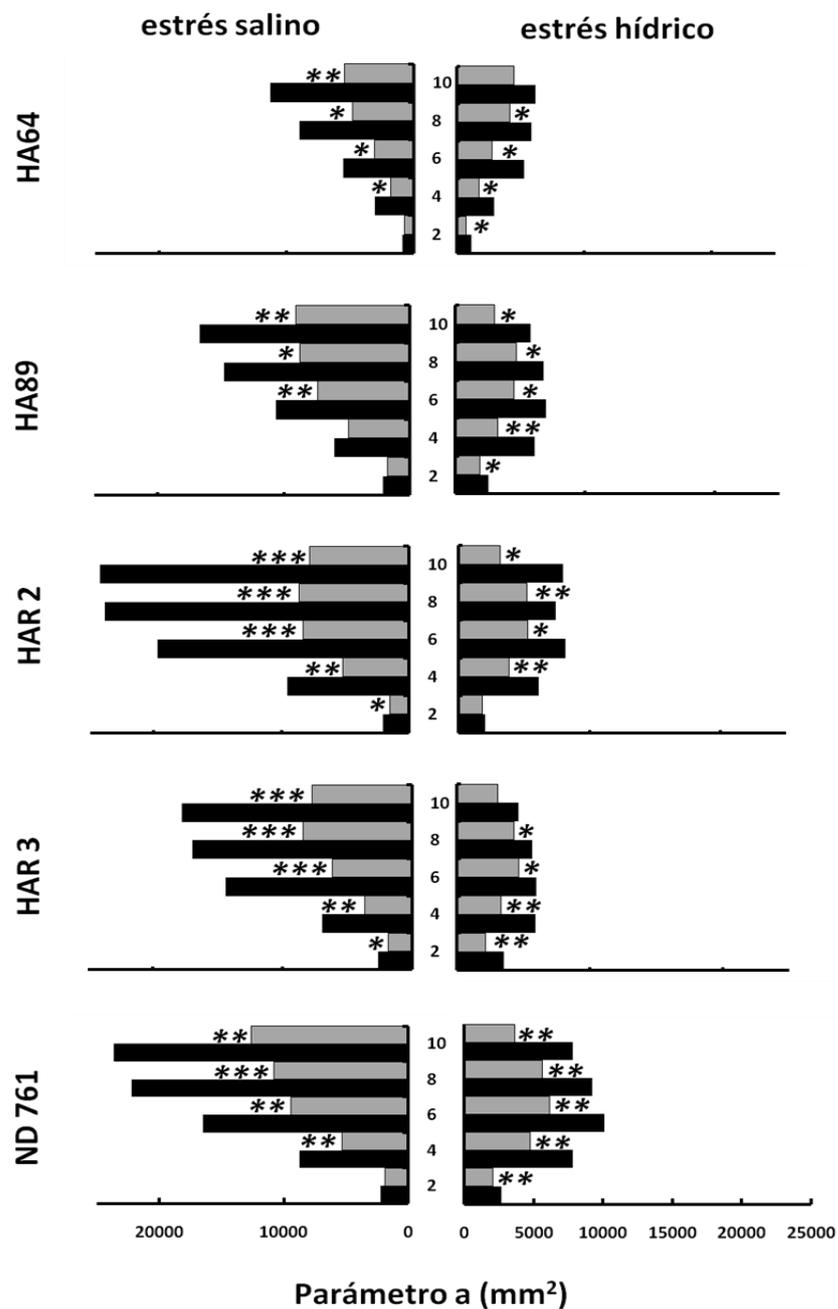


Fig. A.31. Parámetro a de las hojas 2, 4, 6, 8 y 10 en 5 genotipos de girasol. Los gráficos de la izquierda son de estrés salino y los de la derecha, de estrés hídrico. Barras negras indican los valores para plantas controles y las grises, para plantas tratadas. (*): Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). (**): Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Se utilizó test LSD de Fisher de diferencias mínimas significativas. (***) : Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

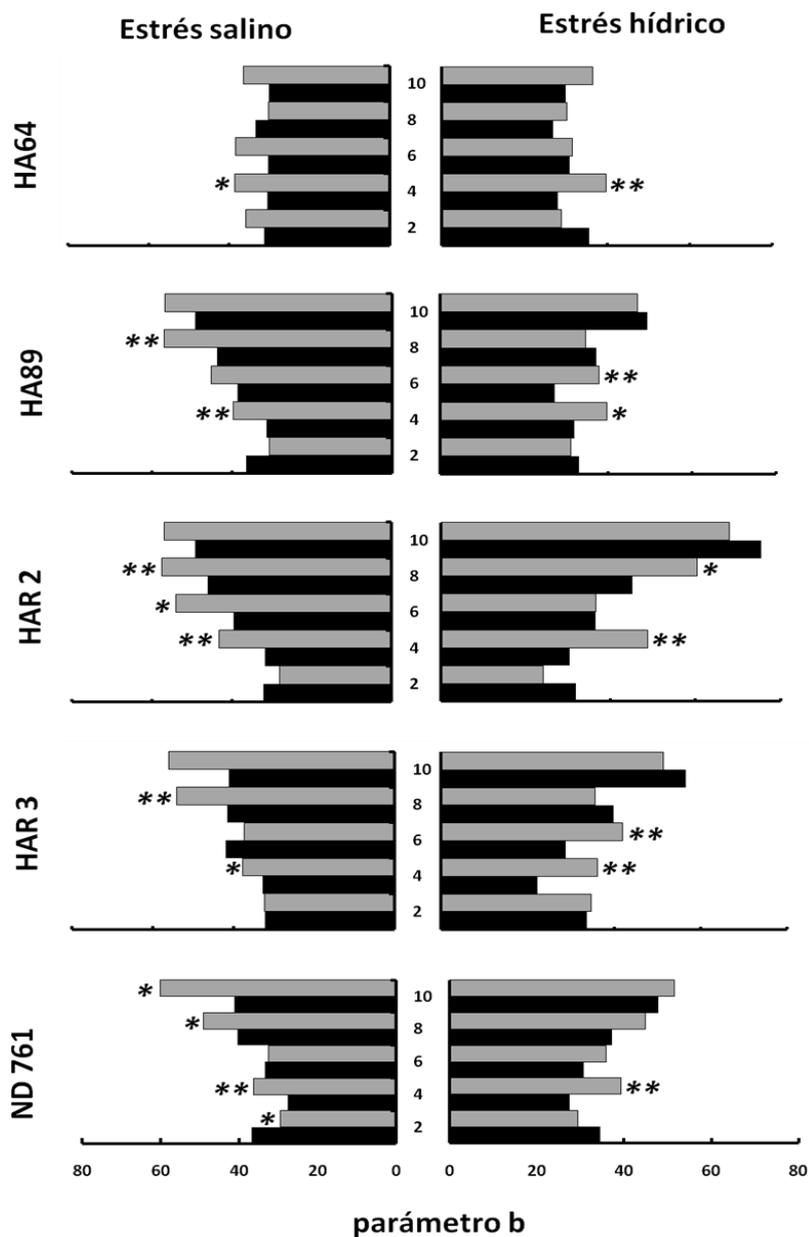


Fig. A.32. Parámetro b de las hojas 2, 4, 6, 8 y 10 en 5 genotipos de girasol. Los gráficos de la izquierda son de estrés salino y los de la derecha, de estrés hídrico. Barras negras indican los valores para plantas controles y las grises, para plantas tratadas. (*): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). (**): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Se utilizó test LSD de Fisher de diferencias mínimas significativas.

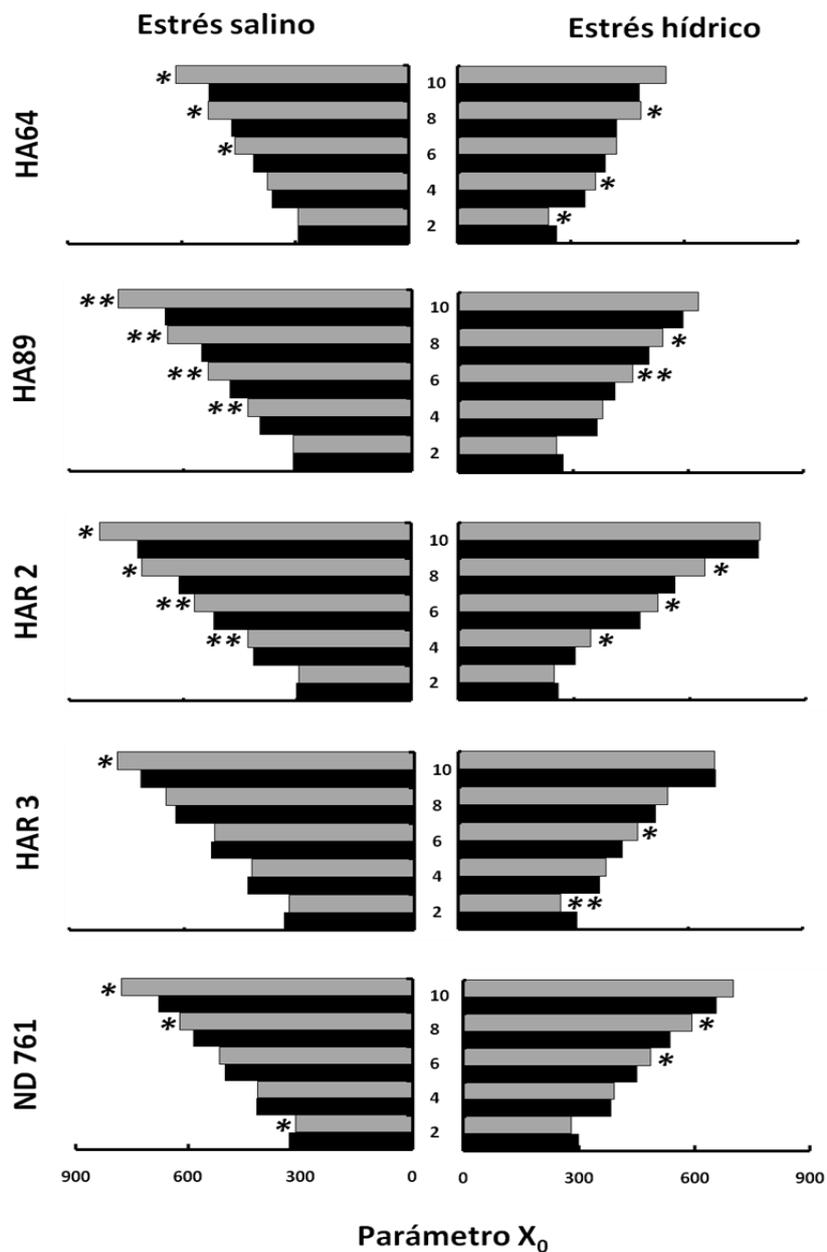


Fig. A.33. Parámetro x_0 de las hojas 2, 4, 6, 8 y 10 en 5 genotipos de girasol. Los gráficos de la izquierda son de estrés salino y los de la derecha, de estrés hídrico. Barras negras indican los valores para plantas controles y las grises, para plantas tratadas. (*): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). (**): Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Se utilizó test LSD de Fisher de diferencias mínimas significativas.

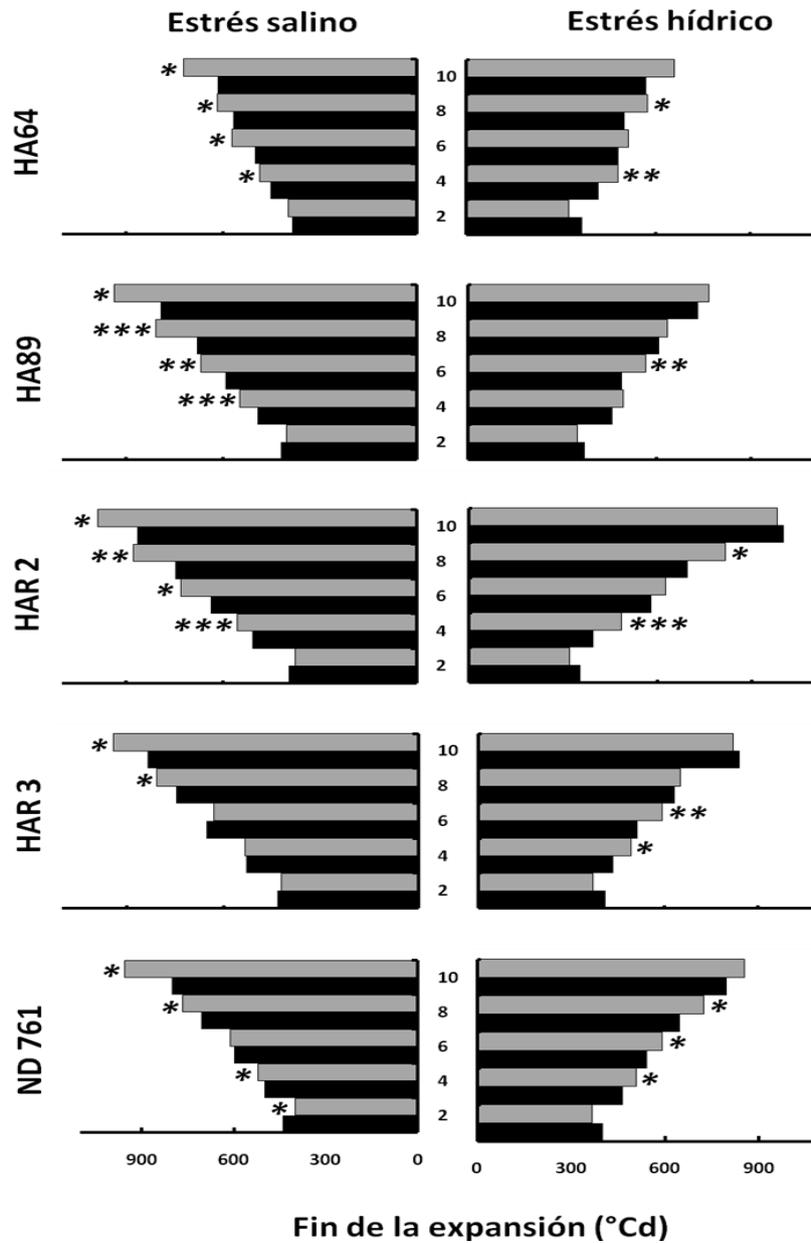


Fig. A.34. Parámetro “fin de la expansión” de las hojas 2, 4, 6, 8 y 10 en 5 genotipos de girasol. Los gráficos de la izquierda son de estrés salino y los de la derecha, de estrés hídrico. Barras negras indican los valores para plantas controles y las grises, para plantas tratadas. (*): Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). (**): Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). Se utilizó test LSD de Fisher de diferencias mínimas significativas. (***) : Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$).

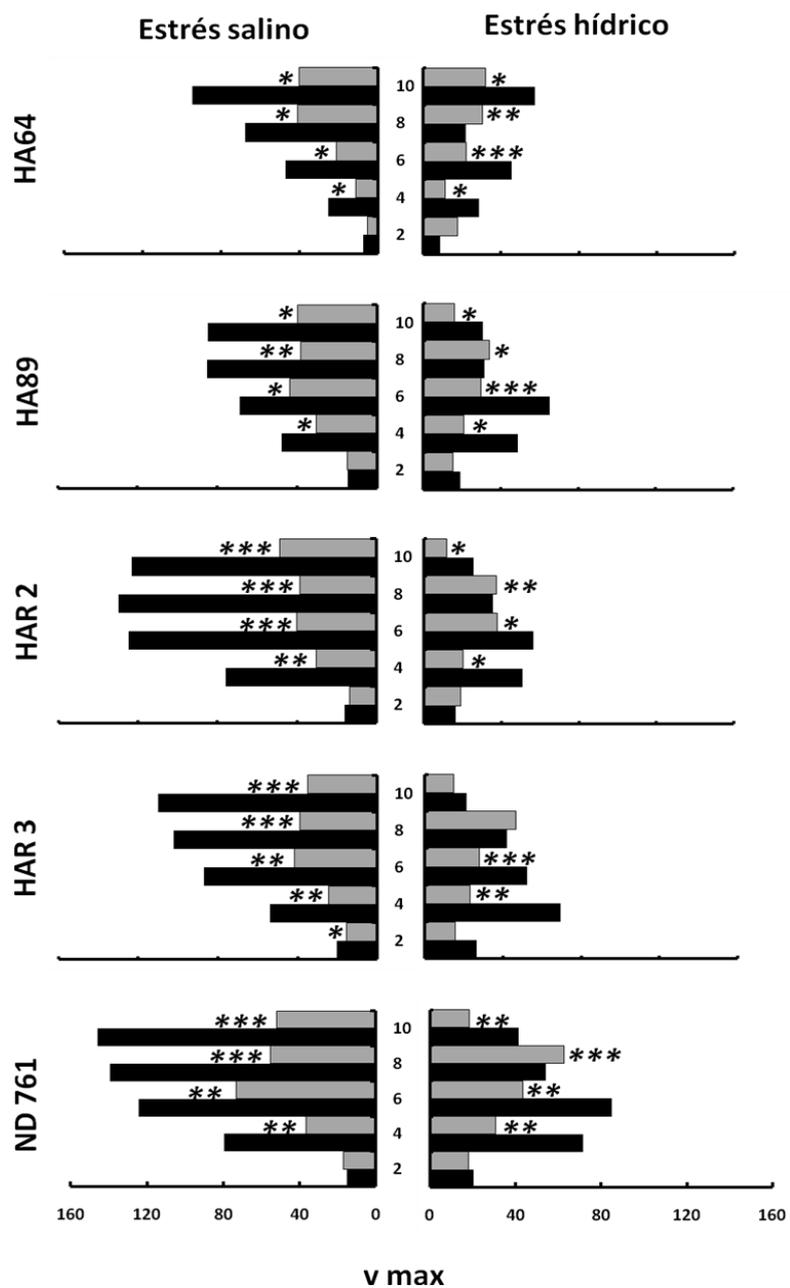


Fig. A.35. Parámetro “Vmax” de las hojas 2, 4, 6, 8 y 10 en 5 genotipos de girasol. Los graficos de la izquierda son de estrés salino y los de la derecha, de estrés hídrico. Barras negras indican los valores para plantas controles y las grises, para plantas tratadas. (*): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). (**): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Se utilizó test LSD de Fisher de diferencias mínimas significativas.

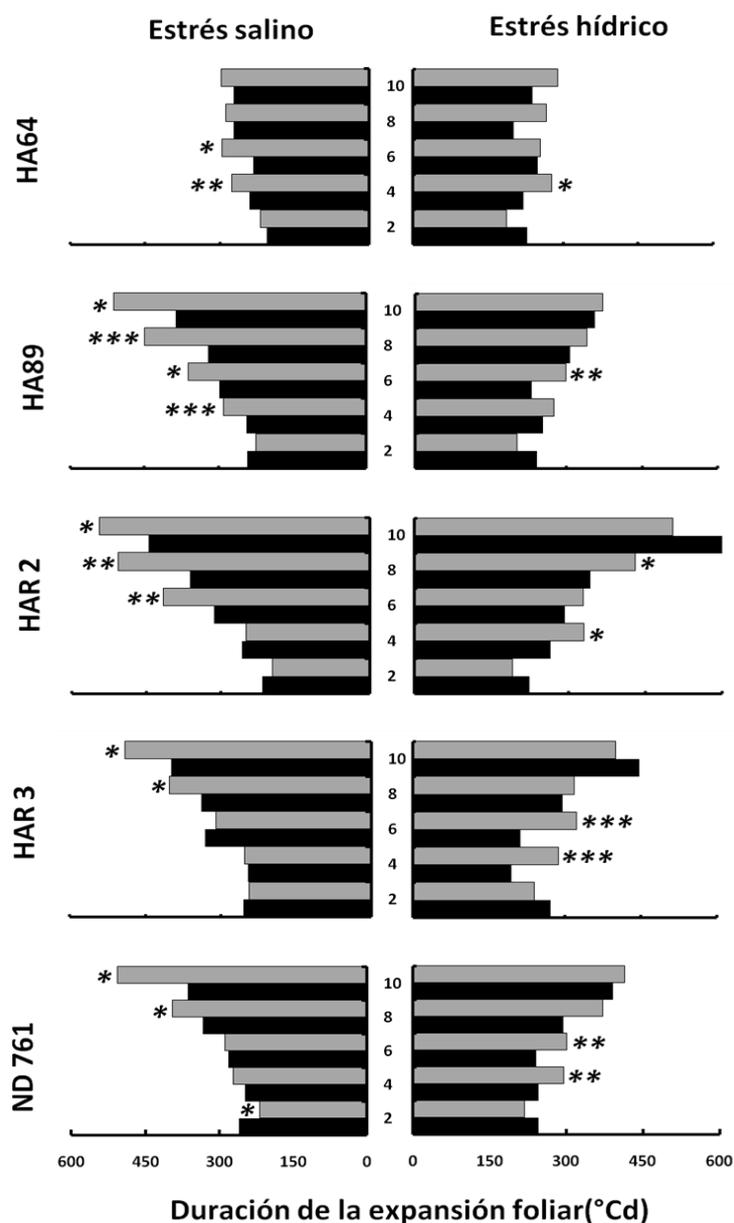


Fig. A.36. Parámetro “duración de la expansión foliar” de las hojas 2, 4, 6, 8 y 10 en 5 genotipos de girasol. Los graficos de la izquierda son de estrés salino y los de la derecha, de estrés hídrico. Barras negras indican los valores para plantas controles y las grises, para plantas tratadas. (*): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). (**): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). Se utilizó test LSD de Fisher de diferencias mínimas significativas.

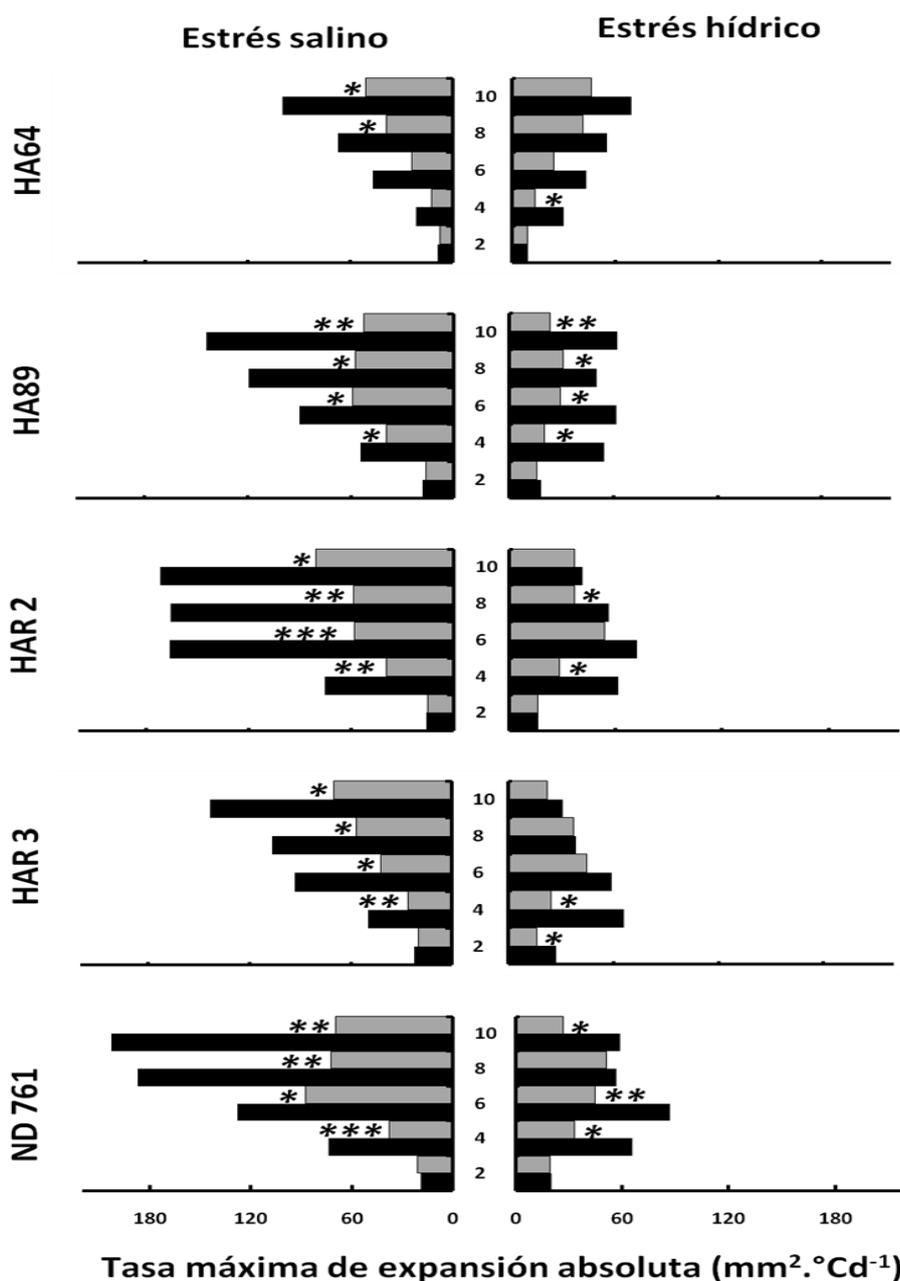


Fig. A.37. Parámetro “Tasa máxima de expansión absoluta” de las hojas 2, 4, 6, 8 y 10 en 5 genotipos de girasol. Los graficos de la izquierda son de estrés salino y los de la derecha, de estrés hídrico. Barras negras indican los valores para plantas controles y las grises, para plantas tratadas. (*): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). (**): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). Se utilizó test LSD de Fisher de diferencias mínimas significativas.

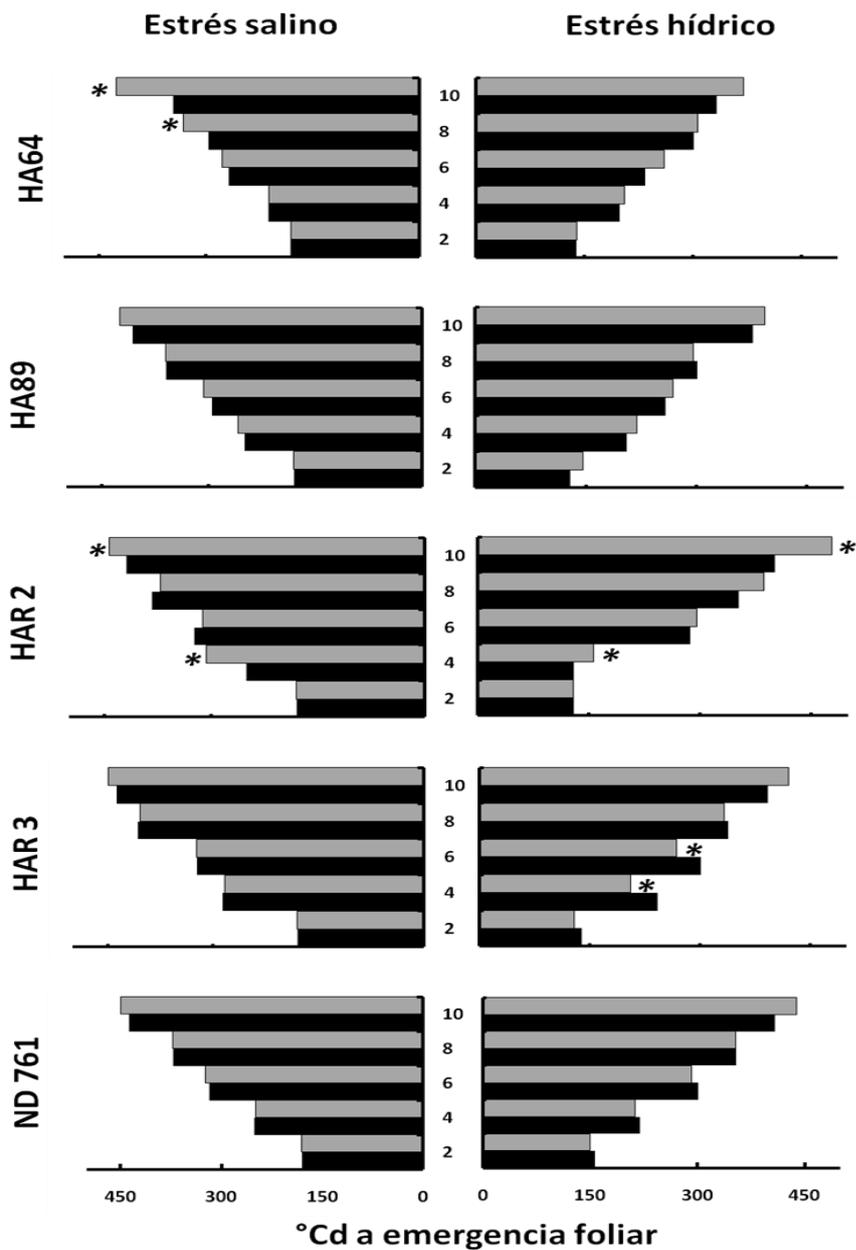


Fig. A.38. Parámetro “°Cd a emergencia foliar” de las hojas 2, 4, 6, 8 y 10 en 5 genotipos de girasol. Los gráficos de la izquierda son de estrés salino y los de la derecha, de estrés hídrico. Barras negras indican los valores para plantas controles y las grises, para plantas tratadas. (*): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). (**): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). Se utilizó test LSD de Fisher de diferencias mínimas significativas.

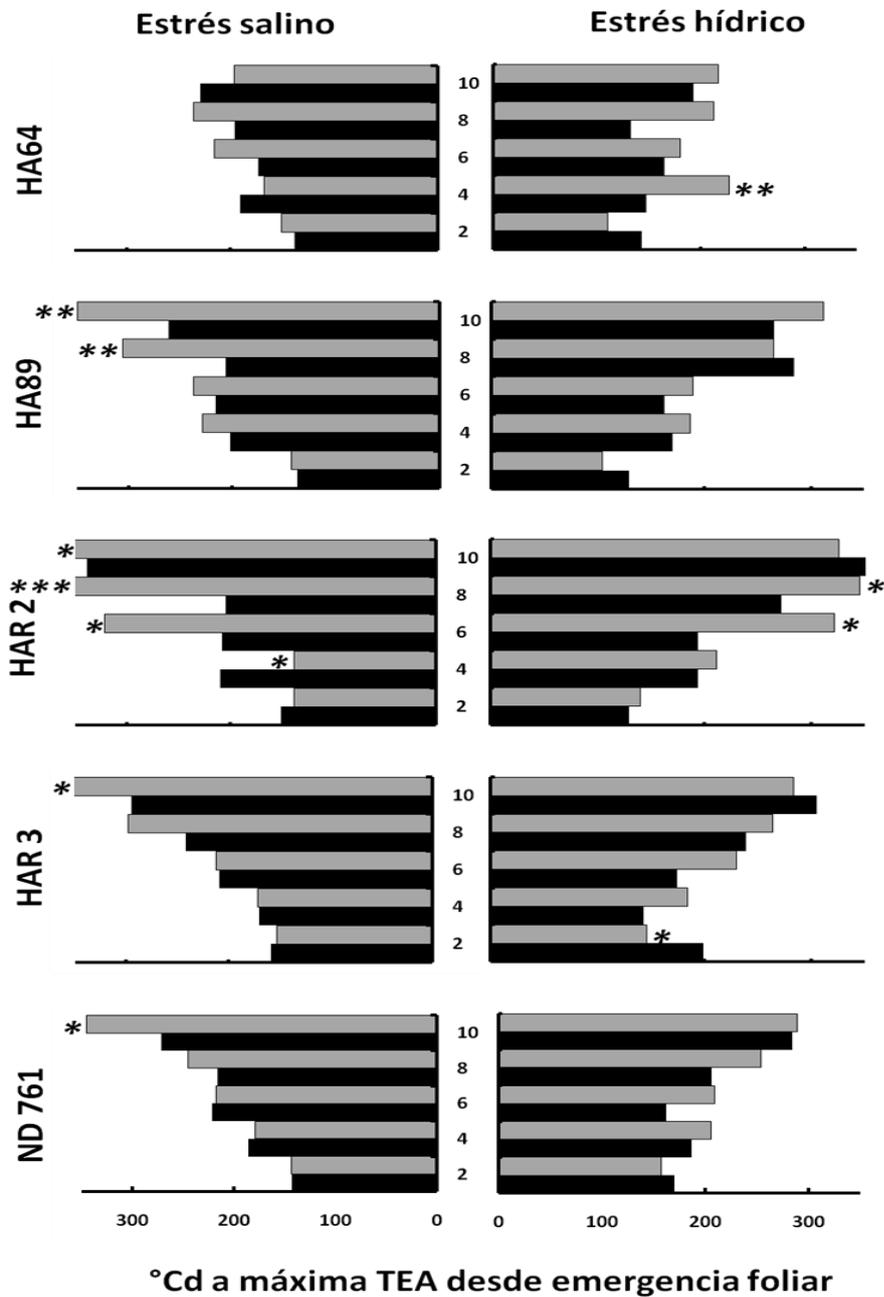


Fig. A.39. Parámetro “°Cd a máxima TEA desde emergencia de plántulas” de las hojas 2, 4, 6, 8 y 10 en 5 genotipos de girasol. Los graficos de la izquierda son de estrés salino y los de la derecha, de estrés hídrico. Barras negras indican los valores para plantas controles y las grises, para plantas tratadas. (*): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). (**): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Se utilizó test LSD de Fisher de diferencias mínimas significativas.

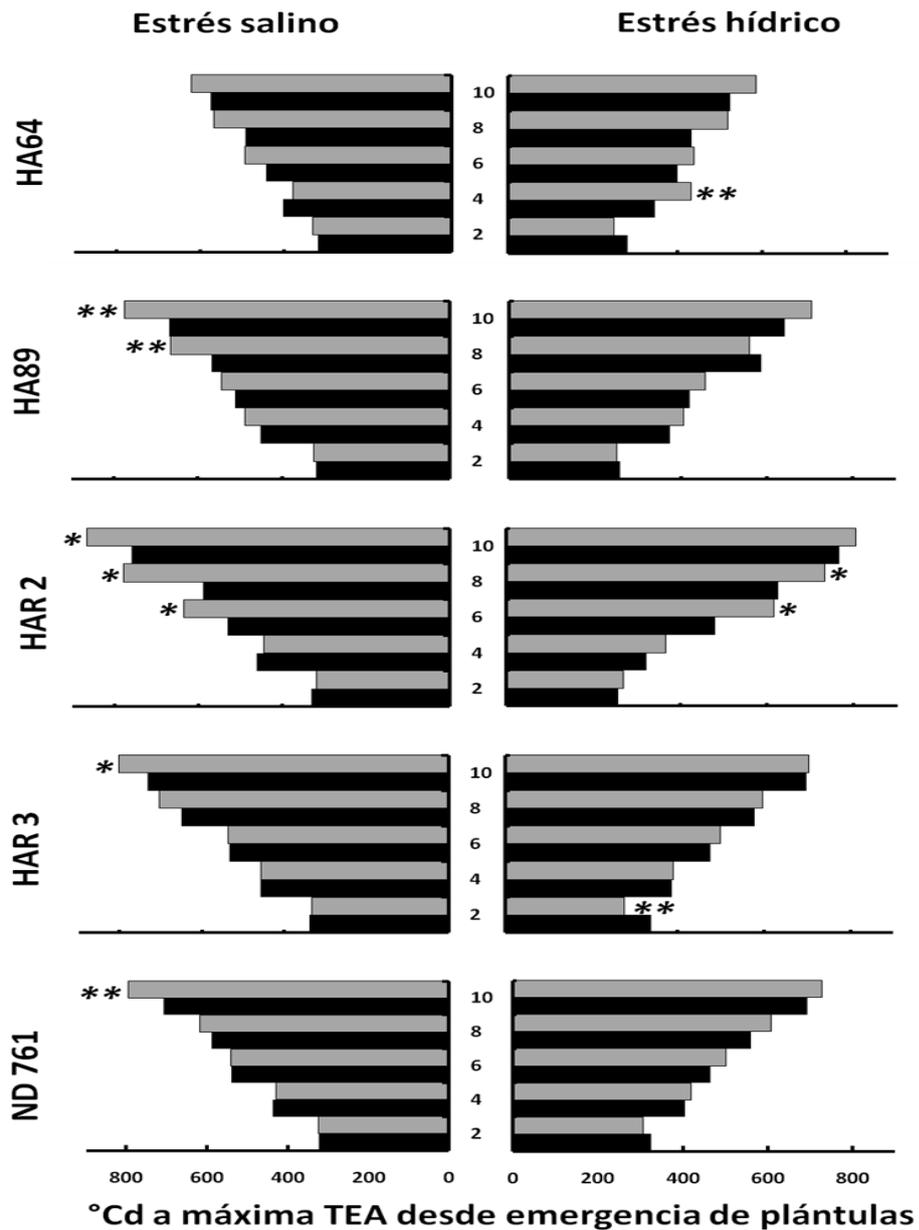


Fig. A.40. Parámetro “°Cd a máxima TEA desde emergencia foliar” de las hojas 2, 4, 6, 8 y 10 en 5 genotipos de girasol. Los graficos de la izquierda son de estrés salino y los de la derecha, de estrés hídrico. Barras negras indican los valores para plantas controles y las grises, para plantas tratadas. (*): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). (**): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Se utilizó test LSD de Fisher de diferencias mínimas significativas.

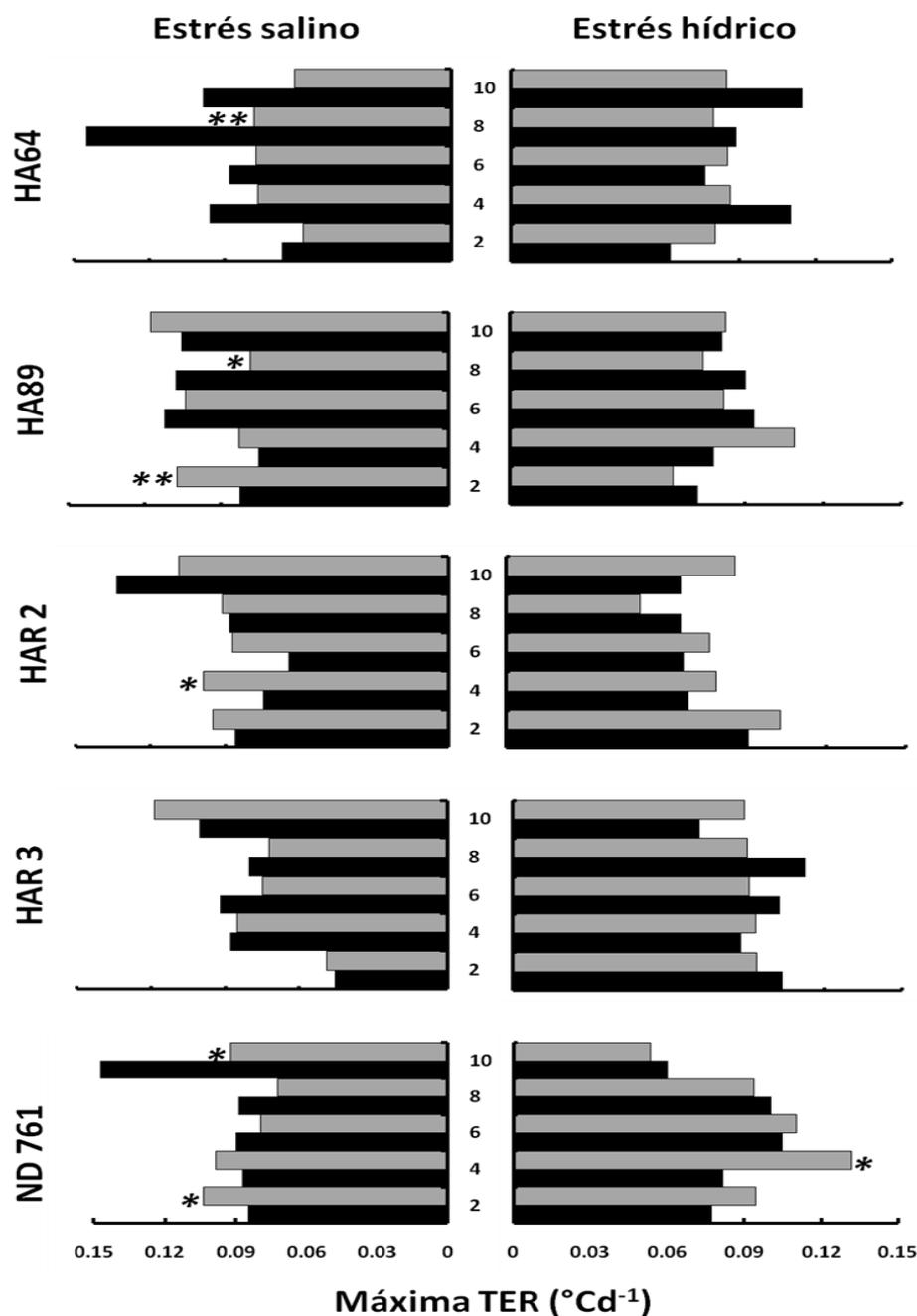


Fig. A.41. Parámetro “máxima tasa relativa de expansión foliar” de las hojas 2, 4, 6, 8 y 10 en 5 genotipos de girasol. Los graficos de la izquierda son de estrés salino y los de la derecha, de estrés hídrico. Barras negras indican los valores para plantas controles y las grises, para plantas tratadas. (*): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). (**): diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). Se utilizó test LSD de Fisher de diferencias mínimas significativas.

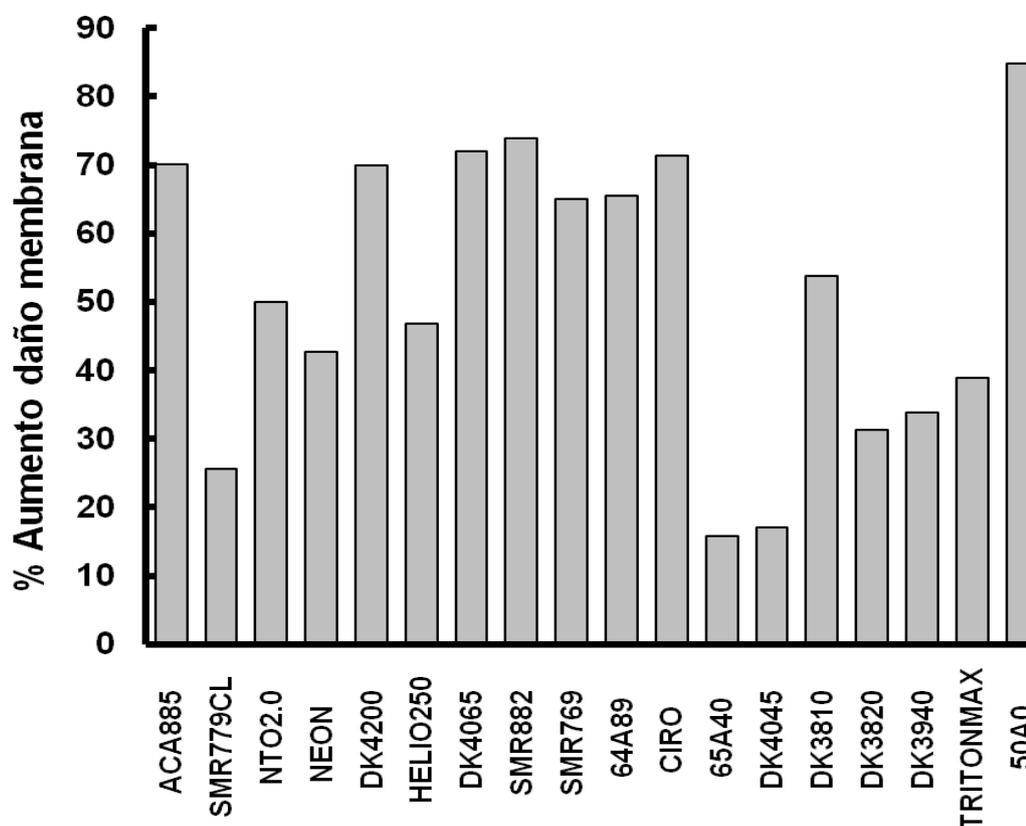
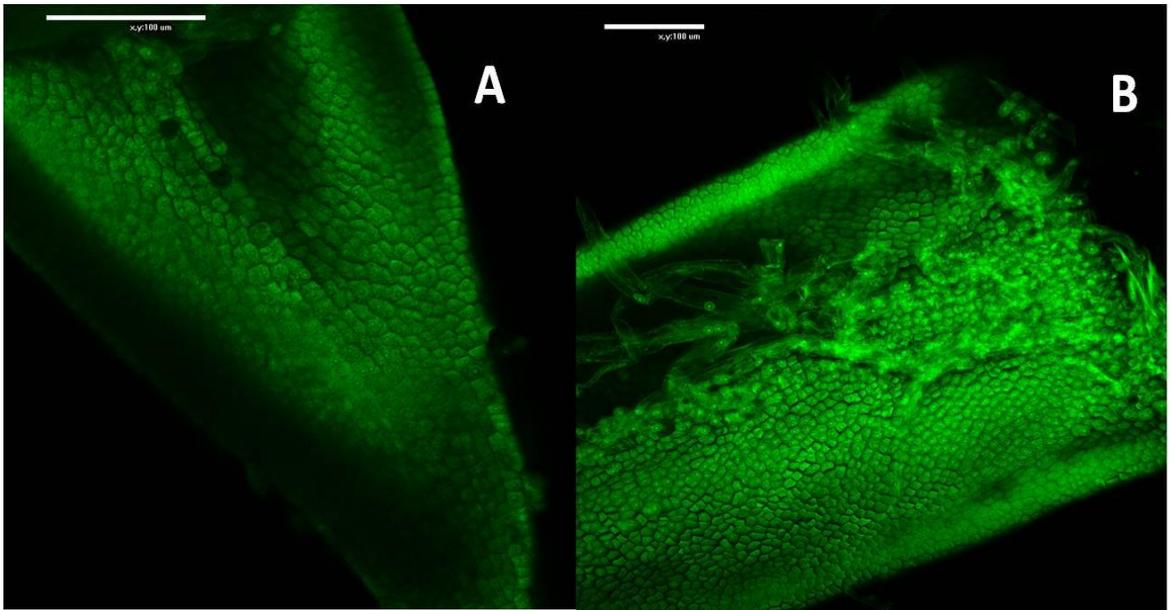


Fig. A.42. Porcentaje de aumento de daño en membranas por efectos de la adición de 130 mM de NaCl en la solución de riego. Se estudiaron 18 híbridos y el daño de membranas se cuantificó como porcentaje respecto a las plantas controles. El ensayo se condujo durante 1141,95 °Cd en cámara de crecimiento con condiciones controladas de radiación y temperatura.



A: genotipo HAR2. B: genotipo HAR1. Cada barra indica 100 μm

Fig. A.43. Fotomicrografía electrónica confocal de meristemas de hoja 8 luego de su iniciación.

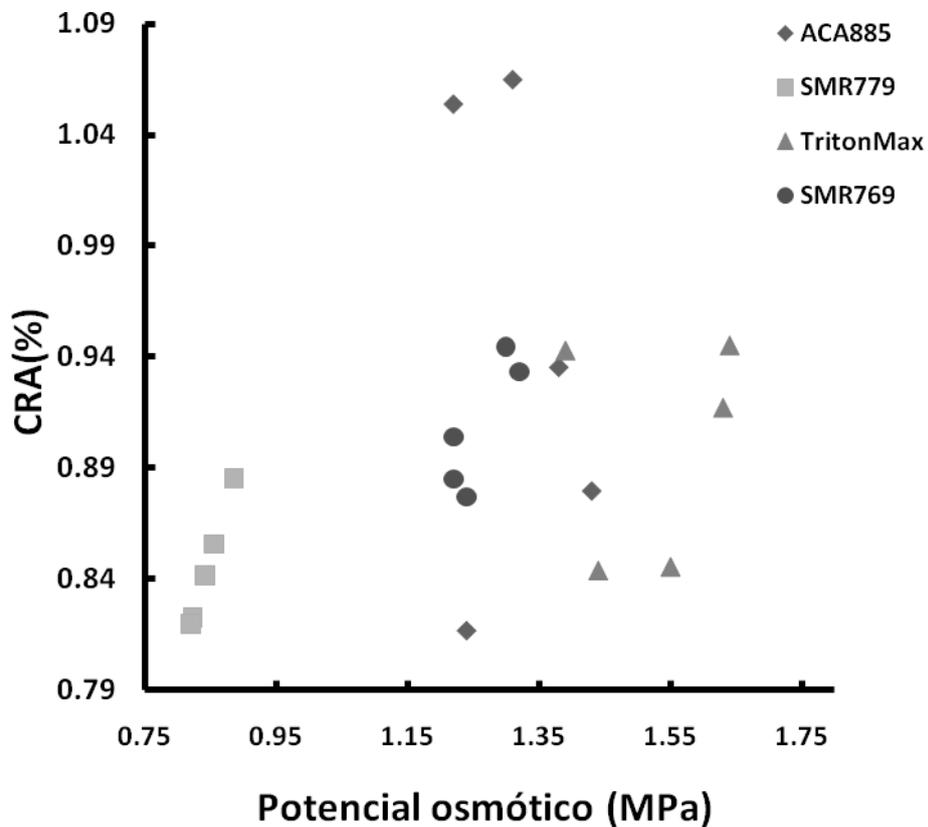


Fig. A.44. Efecto de la salinidad (130 mM) sobre el ajuste osmótico de cada híbrido. La determinación del ajuste osmótico se realizó graficando el contenido relativo de agua (CRA) en función del potencial osmótico. Cada símbolo indica una planta en condiciones tratadas. Símbolos diferentes indican híbridos diferentes. El CRA relativo para cada planta se calculó con la razón entre el CRA de esa planta sobre el CRA promedio de las plantas testigos para ese híbrido. El potencial osmótico en el eje de abscisas indica el valor en MPa para cada planta (símbolo) salinizada.

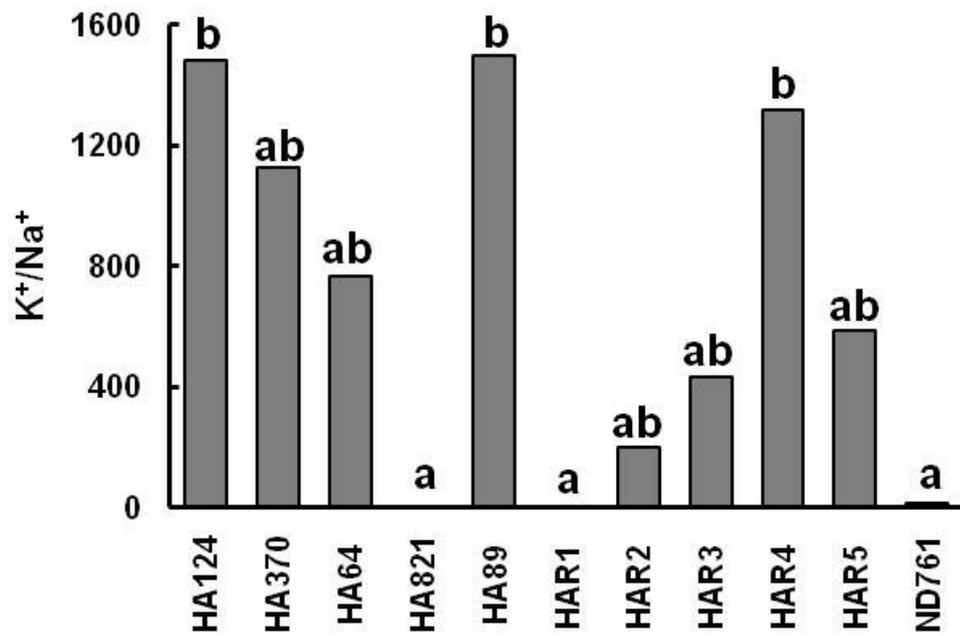


Figura A.45. Relación K^+/Na^+ en once líneas de girasol sometidas a 130 mM de NaCl. El ensayo se llevó a cabo durante 978,17 °Cd en cámara de crecimiento con condiciones ambientales semicontroladas (invernadero en CIAP, INTA. Córdoba).